

## 국내 꿀벌 반야외시험법 유효성 검증을 위한 무처리군 및 양성대조군 주요 데이터 분석

전경미<sup>1\*</sup> · 김주영<sup>1</sup> · 김보선<sup>1</sup> · 이 환<sup>1</sup> · 박흥현<sup>1</sup> · 오진아<sup>1</sup> · 김광수<sup>2</sup> · 최용수<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

### Main Data Analysis of Control and Positive Reference for the Test Validity of Honeybee Brood Test under Semi-field Conditions in Korea

Kyongmi Chon<sup>1\*</sup>, Juyeong Kim<sup>1</sup>, Bo-Seon Kim<sup>1</sup>, Hwan Lee<sup>1</sup>, Hong-Hyun Park<sup>1</sup>, Jin-A Oh<sup>1</sup>, Kwang-Soo Kim<sup>2</sup>, Yong-Soo Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea

<sup>2</sup>Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Muan, Korea

<sup>3</sup>Sericulture and Apiculture Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea

(Received on March 5, 2021. Revised on April 20, 2021. Accepted on May 7, 2021)

**Abstract** Honeybee semi-field tests were carried out to assess the effect of pesticides from 2016 to 2020 in Korea. The experiments included three treatment groups (control, toxic reference (diflubenzuron or dimethoate), and test chemicals), each with three replicate tunnels. The dimethoate emulsifiable concentrate (EC) 46% (400 g, 600 g dimethoate a.i./ha) and diflubenzuron wettable powder (WP) 25% (600 g, 800 g diflubenzuron a.i./ha) were used as reference chemicals. The mortality of honey bees, flight activity, brood termination rate (BTR), brood index (BI), and compensation index (CI) from 5 year experiments were analyzed for this study. The dimethoate treatment group had a significant impact on the mortality of honeybees and flight activity compared to the control groups, but there were no significant differences in honey bee mortality and foraging activity between the control and the diflubenzuron group, as it is not acutely toxic to adult bees. The mean BTR values ranged from 20.5 to 47.3% in the control groups from 2016 to 2020. The toxic reference treatment with dimethoate or diflubenzuron led to a drastic reduction in the brood development, resulting in mean BTRs ranging from 68.0 to 100.0%. These two chemicals could be appropriate as toxic reference compounds, depending on the study aims, for semi-field tests in Korea. According to the results of the five-year test, it is assumed that  $BTR \leq 40\%$  for controls and  $BTR \geq 70\%$  for the reference groups could be the appropriate test validity standards. Since the number of available domestic studies (15 repetitions) were very low, and have been conducted only in one place, it is necessary to accumulate more data sets to present reasonable test validity standards by conducting a ring test of semi-field test with other domestic institutions in the near future.

**Key words** Brood termination rate (BTR), Honey bees, Positive reference, Semi-field test

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

## 서 론

전세계적으로 약 300여종의 작물 중 84%가 곤충에 의한 화분매개를 필요로 하는데(Williams, 1994; Klein et al., 2007) 이 중 꿀벌이 약 90%의 높은 비중을 차지하고 있다(Allsopp et al., 2008). 꿀벌은 주요 작물 생산에 중요한 화분매개 서비스를 제공하며 특히 양봉산업에서 매우 가치 있는 화분매개곤충이다. 우리나라에서도 과수 및 채소작물에서 꿀벌 화분매개의 경제적 가치를 약 5.9조원으로 추정하고 있다(Jung, 2008). 봉군 내 꿀벌의 50% 이상이 벌통으로부터 약 6 km 이상 비행하여 화분활동을 하기 때문에 꿀벌은 여러 가지 경로를 통하여 다양한 오염물질에 더 쉽게 노출될 수 있다(Beekman and Ratnieks, 2000).

최근 미국을 비롯한 유럽 각국에서 명확한 이유 없이 꿀벌의 30% 이상이 갑자기 사라지는 ‘봉군 붕괴증상(CCD: colony collapse disorder)’이 발생하면서(Vanengelsdorp et al., 2007; Potts et al., 2010a) 꿀벌 개체수의 감소가 생태계 및 농업생산량에 부정적 영향을 줄 수 있다는 우려가 커지고 있다(Gallai et al., 2009; Lebuhn et al., 2013).

꿀벌 개체수 감소 요인으로 병원체, 해충, 기후변화, 서식지 손실, 영양부족, 바이러스 감염 등을 보고하고 있는데(Carrecek et al., 2002; Potts et al., 2010b; Smith et al., 2013; Vanbergen et al., 2013; Staveley et al., 2014) 그 중 농약을 주요 원인 중 하나로 지목하고 있다(Johnson et al., 2010; Blacquière et al., 2012). 이에 각국에서는 농약에 대한 꿀벌 독성시험법을 구축하고 위해성평가를 실시하여 꿀벌에 영향을 미치는 농약을 규제하고 있다(OEPP/EPPO, 2010a).

유럽과 미국에서는 꿀벌 위해성 평가 Tier 1 단계에서 꿀벌 및 유충의 급성독성시험, Tier 2단계에서는 반야외시험(semi-field test), Tier 3단계에서는 야외시험(full-field test)을 수행하도록 되어있다(EFSA, 2012; USEPA, 2014).

현재 국내 꿀벌 위해성평가는 총 3단계로 이루어져 있으며, Tier 1단계에서는 꿀벌 급성독성(접촉 및 섭식)시험, Tier 2단계에서는 엽상잔류독성시험, Tier 3단계에서는 야외시험을 수행하도록 고시되어 있다(농촌진흥청 고시 제 2021-4호, 농약 및 원제의 등록기준). 최근 국립농업과학원에서는 꿀벌 반야외시험법을 국내 최초 구축하여 양성대조군 설정 연구 및 농약독성평가 연구결과를 발표하였다(Chon et al., 2017, 2018). 또한 꿀벌 반야외시험법은 2019년 3월 농약관리법(농촌진흥청 고시 제 2021-4호, 농약 및 원제의 등록기준)에 고시화되었다.

농약이 꿀벌에 미치는 영향을 반야외(semi-field) 수준에서 평가하는 시험법으로는 현재 EPPO No. 170(4) (2010b), OECD No. 75 (2007) 및 Oomen et al. (1992) 시험법이 있다. Oomen 시험법은 시험물질이 포함된 자당 용액을 벌통

내부에 직접 공급함으로써 농약 노출을 최대화시킨다. 반면 다른 두 시험법은 Oomen 시험법과 달리 밀원 식물이 있는 땅사 터널 내부에 농약을 살포하여 벌들이 화분매개활동을 하며 농약에 노출될 수 있는 좀 더 현실적인 농약 노출 시나리오를 제공한다.

최근 OECD No.75에 기반한 반야외시험 관련 논문들이 유럽을 중심으로 발표되고 있다. 독일과 스위스에서는 2011년부터 2014년까지 수행한 62개 반야외시험의 brood termination rate (BTR) 값을 분석하고 OECD 반야외시험법의 개선 사항을 발표하였다(Becker et al., 2015). Lückmann and Tänzler (2020)은 1997년부터 2019년까지 독일, 스위스, 프랑스 등에서 수행된 Oomen 및 OECD No.75 시험법의 BTR 값을 비교 분석하였다.

꿀벌 반야외시험은 시험물질 처리군, 무처리군, 양성대조군을 포함하는데 EPPO 170(4)(2010b)에서는 양성대조군으로 꿀벌 급성독성에 기인한 dimethoate과 IGR(insect growth regulator) 계열인 fenoxycarb를 사용할 수 있다고 명시하고 있고 OECD No.75에서는 fenoxycarb를, Oomen et al. (1992)에서는 fenoxycarb와 diflubenzuron을 양성대조군으로 제시하고 있다.

IGR 계열 농약은 꿀벌 급성독성에는 영향을 미치지 않지만 꿀벌 brood에 영향을 미친다(Tasei, 2001). IGR 계열의 fenoxycarb와 diflubenzuron을 야외수준에서 평가한 시험결과에 따르면 fenoxycarb를 200-600 g/ha 수준으로 살포한 과수원에서 꿀벌 봉군의 피해가 관찰되었다(Gerig, 1991). 또한 Thompson et al. (2005)에 의하면 fenoxycarb는 단기간에 난과 유충 치사를 초래하였으며 월동능력을 감소시켰다.

Diflubenzuron은 곤충 성장조절제로, 키틴 합성 억제제로 작용하며, 주로 나비목(Lepidoptera) 해충 등을 방제하는데 사용된다(EPA, 1997). Diflubenzuron 수화제 110-400 g/ha가 처리된 구역에서 성체 꿀벌이나 유충의 생존은 영향을 받지 않았지만(Emmett and Archer, 1980), diflubenzuron은 여왕벌의 산란성(ovicidal)을 감소시키고 brood 치사율에 단기적으로 심각한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Thompson et al., 2005).

국내 꿀벌 반야외시험법은 OECD No. 75를 기준으로 시험법을 구축하였다. OECD 시험법에서는 양성대조군으로 fenoxycarb를 사용하도록 제시되어 있지만 국내에서는 농약 규제에 의해 fenoxycarb를 사용할 수 없기 때문에 dimethoate 유제와 diflubenzuron 수화제를 사용하여 시험데이터를 축적하였다.

OECD No. 75 시험은 독일 등 유럽에서 과셀리아 작물과 mini-Plus 벌통을 사용하여 디자인된 시험법으로 현재까지 관련 시험데이터는 주로 유럽지역에 한정되어 있다. 따라서 기후 및 환경조건이 유럽과 매우 다른 국내에서 유체를 밀원식물로 재배하여 수행한 반야외시험의 무처리군 및 양성

대조군의 주요 데이터를 비교 분석하는 것은 매우 의미있는 작업이다.

따라서, 본 논문에서는 2016-2020년도에 수행된 국내 꿀벌 반야외시험의 무처리군 및 양성대조군(dimethoate 유제, diflubenzuron 수화제)의 주요 데이터(꿀벌 치사 개체수, 비행활동 개체수, brood termination rate (BTR), brood index, compensation index)를 비교 분석하여 국내 시험 유효성 기준을 제안하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 터널 및 시험 디자인

국립농업과학원(NAS)(35°49'40.7 "N, 127°02'44.9"E) 야외 시험 포장에 9동의 망사 터널을 설치하였다(Fig. 1). 각 터널은 크기가 14 × 5 × 3 m (L × W × H)이었고 너비가 3 mm 이하인 망사로 씌웠다. 시험작물은 국내에서 흔히 볼 수 있고 화분활동에 적합한 유채꽃으로 선정하였다. 국립식량과학원 바이오에너지작물 연구소에서 유채(담미) 종자를 분양 받아 매년 10월에 파종하였으며 다음 해 유채가 약

1 m 높이로 자라고 80% 이상 만개할 때 시험을 시작하였다. 각 처리군은 무처리군, 양성대조군, 시험물질 처리군으로 구성하였으며 각 처리군별 3반복 시험하였다. 죽은 벌의 수집이 용이하게 땅을 고르게 하고 터널의 앞, 뒤, 중간에 길을 만들어 흰 부직포로 덮어주었다. 각 터널 안에 수조를 배치하여 꿀벌에게 물을 공급하였고 농약 살포 시에는 수조를 터널 밖으로 이동시켜 오염되지 않도록 하였다. 꿀벌 반야외시험은 2016년부터 2020년까지 매년 1회씩 진행하였으며 무처리군은 수돗물을, 양성대조군은 dimethoate 유제 46%와 diflubenzuron 수화제 25%를 사용하였다. Dimethoate는 유기인계 살충제이며 acetylcholinesterase (AChE) 저해제이다. 꿀벌 접촉 및 섭식독성 LD<sub>50</sub> 값은 각각 0.1 µg/bee로 꿀벌 독성이 매우 높다(Pesticide Properties DataBase, PPDB). Diflubenzuron은 benzoylurea계통의 IGR계 살충제로 키틴 합성 저해제로 작용하며, 유충의 정상적인 탈피를 방해하여 살충효과를 낸다(EFSA, 2015). 꿀벌 접촉 및 섭식독성 LD<sub>50</sub> 값은 각각 > 74.2 µg/bee, > 9.1 µg/bee 이다(Pesticide Properties DataBase, PPDB).

양성대조군 dimethoate 유제의 경우 선행연구(Miles et al.,

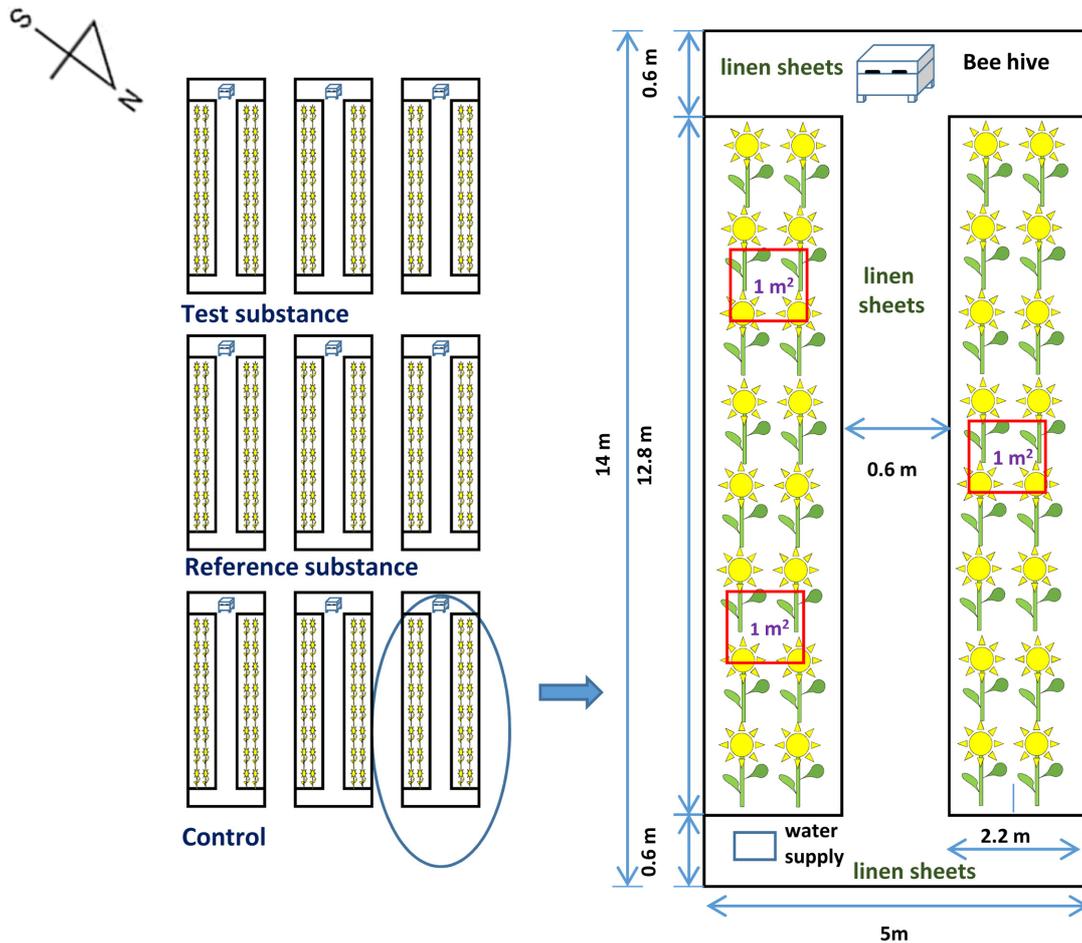


Fig. 1. Design of the tunnel (modified from Chon et al., 2017)

2012)에서 사용한 약량을 기준으로 살포량을 설정하였으며 diflubenzuron 수화제의 경우 꿀벌 반야외시험에서 사용한 선행연구가 없었기 때문에 야외시험에서 diflubenzuron 400 g a.i./ha를 처리하였을 때 꿀벌 brood에 대한 영향이 없었다는 연구결과(Tasei, 2001)를 바탕으로 살포량을 설정하였다. 무처리군은 꿀벌 비행활동이 활발한 시간에 수돗물(400 L/ha)을 살포하였다. 2016년에는 양성대조군으로 dimethoate 유제(400 g a.i./ha in 400 L tap water/ha), diflubenzuron 수화제(600 g a.i./ha in 400 L tap water/ha)를 사용하였다. 2017, 2018, 2019년에는 양성대조군으로 diflubenzuron 수화제(800 g a.i./ha in 400 L tap water/ha)를 사용하였다. 2020년에는 dimethoate 유제(600 g a.i./ha in 400 L tap water/ha)를 살포하였다. 농약 살포시에는 충전식 농약 분무기를 사용하였고(MSB-100S, Maruyama, Japan) 시험작물에 고르게 농약이 살포되도록 충분한 연습을 하였다. 농약살포 후 7일 동안 터널 안에서 관측하고 마지막 터널 관측일 날 저녁에 9개의 벌통을 2 km 떨어진 터널 밖 장소로 이동하였다. 꿀벌의 치사 개체 수, 비행활동, 난 유충 발육도를 28일의 시험기간 동안 평가하였다.

#### 기후 조건

9동의 터널 구역과 약 1 km 떨어진 국립농업과학원 내 기상 관측소의 온도, 상대습도, 강우량 데이터를 시험기간 동안 매일 기록하였다.

**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"> <li>• Shortly before application</li> <li>• 2 h after application</li> <li>• In the evening after daily flight activity of the bees</li> </ul>
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
Day of application (day 0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shortly before application</li> <li>• 0.5 h after application</li> <li>• 1 h after application</li> <li>• 2 h after application</li> <li>• 4 h after application</li> <li>• 6 h after application</li> </ul>
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

#### 봉군 준비

시험 봉군은 약 7000~9000마리의 건강하고 상태가 좋은 벌을 양봉농가(의령)에서 구입하여 사용하였다. 시험봉군은 양봉농가에서 월동기간부터 시험 시작 하루 전까지 전문적으로 관리하였으며 각 봉군은 2-3장의 산란판, 1개의 봉판, 1-2장의 먹이판으로 구성하였다. 시험 시작 한 달 전부터 응애 및 질병방제를 위한 약제 및 화학물질 처리를 금지하였고 시험물질 살포 최소 3-4일 전부터 망사 터널에 입식하여 터널 환경에 적응하도록 하였다. 터널 입식 후 각 벌통 입구에 dead bee trap을 설치하였다.

#### 꿀벌 치사 개체 수

Table 1에 제시된 일정(Chon et al., 2018)에 따라 죽은 일벌은 터널 중간, 앞, 뒤 시트 및 벌통 앞과 dead bee trap에서 수집하였다.

#### 비행활동

각 터널 당 3개의 1 m<sup>2</sup> 구획을 지정하여 꿀벌 비행활동을 관찰하였다. Table 2에 제시된 일정(Chon et al., 2018) 따라 꽃 주위를 날아다니는 벌(flying)과 화분매개 활동하는 벌(flowering)를 짧은 시간 동안(예: 10-15초) 측정하였다.

#### 산란 평가(Brood assessment)

난 유충 발육도 관측을 위해 포토박스를 이용하여 각 봉군당 BFD (brood area fixing day) 0일 날 알 200개를 지정

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

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

BFD = Brood area fixing day

한 소비판을 촬영하였다. 포토박스에서 촬영한 소비판 이미지는 Microsoft PowerPoint 2010로 분석하였다. 난 유충 발육도를 평가하기 위해 알을 원 모양의 셀로 지정하였다. 처음 촬영한 사진(BFD 0)에서 지정된 셀을 그룹으로 설정한 후 다음 BFD 관측일 날(BFD +5, +10, +16, +22(±1))에 촬영한 소비판 이미지 위에 겹쳐놓아 셀 분석을 수행하였다. 지정된 셀의 난 유충 발육단계를 평가하기 위해 0에서 5의 점수를 다음과 같이 부여하였다. 0: 발달 종료, 1: 알(egg), 2: 어린유충(L1-L2), 3: 노숙유충(L3-L5), 4: 번데기, 5: 우화 후 빈 셀, 알 또는 어린 유충으로 채워진 셀, N: 꿀(nectar), P: 화분(pollen). Table 3에 평가일 별 예상 산란 단계를 나타내었다(Chon et al., 2018).

**포토박스(Photobox)**

포토박스는 선행연구 Chon et al. (2017, 2018)에서 묘사한대로 소비판 관찰을 위해 제작하였다. 포토박스 크기는 1.2 × 0.6 × 1.5 m (L × W × H)이었고 소비판 홀더로 소비판을 고정하였다. NIKON D300S 카메라(AF-S NIKKOR 18-105 mm 1:3.5-5.6G ED 렌즈)를 이용하여 소비판을 촬영하였다. 카메라는 exposure time 1/6s, aperture 4.5, ISO 200, F-number F/5.0, focal length 50 mm로 설정하였다.

터널 당 봉군에서 소비판을 이동하여 사진촬영을 한 후 다시 벌통에 넣을 때까지 5분 이내의 시간이 걸렸다.

**Brood termination rate (BTR)**

BTR은 꿀벌 반야외시험의 유효성을 나타내는 중요한 지표로서 지정된 알의 발달 실패율을 나타내며 아래 식과 같이 계산하였다.

$$BTR = \frac{\text{관측일자에 예상 난 유충 발달단계에 도달하지 못한 셀의 수}}{\text{관찰한 셀의 총수}} \times 100$$

**Brood index (BI) and compensation index (CI)**

BI는 난 유충 발달의 지표이며 각 봉군마다 BFD 관측 일자에 계산을 하였다. BFD 평가 일정에 예상되는 발달 단계에 도달한 셀은 1부터 5까지 점수를 부여하였다. 지정된 알

이 각 BFD 관측 일자에 따른 정상 발달 단계에 도달하지 못했다면 다시 셀이 산란에 이용되는 여부와 상관없이, BFD 평가일과 평가일 이후에도 0점 처리하였다. 각 봉군의 BI는 BFD 관찰 일자 별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 전체 셀의 수로 나누어 구하였다.

CI는 봉군 회복의 지표이며 각 봉군마다 BFD 관측 일자에 계산하였다. 셀은 평가일에 확인된 발달단계만을 토대로 1부터 5점까지 점수를 부여하였다. BI와 달리 셀이 BFD 평가일에 해당하는 정상 발달단계에 도달하지 못해도 셀 안에 다른 산란이 있어 발육단계(알, 유충, 번데기)가 있으면 해당 점수를 부여하였다. 각 봉군의 CI는 BFD 관찰 일자별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 전체 셀의 수로 나누어 구하였다.

**통계**

통계분석은 IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 데이터는 Shapiro-Wilk's test을 사용하여 정규성 검정을 수행하였고, Levene의 등분산 검정 (Levene's test) 하였다. Dunnett's t-test을 사용하여 처사 개체수(> control), 비행활동 개체수(< control), BTR (> control), BI (< control), CI (< control)을 비교하기 위해 다중비교(α = 0.05)를 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**기상조건**

Table 4는 꿀벌 반야외시험을 수행한 5년(2016-2020) 동안의 기상데이터를 보여준다. 2016년은 4월 15일부터 5월 13일까지, 2017년은 4월 18일부터 5월 17일까지, 2018년은 4월 23일부터 5월 21일까지, 2019년은 4월 16일부터 5월 14일까지, 2020년은 4월 7일부터 5월 6일까지 시험을 진행하였다. 시험기간 동안 2016년은 12회, 2017년은 8회, 2018년은 9회, 2019년은 5회, 2020년은 6회 비가 내렸다. 터널 노출기간 동안 낮 기온은 15.9-24.9°C (2016년), 18.8-24.2°C (2017년), 15.5-25.9°C (2018년), 10.1-28.3°C (2019년), 11.3-23.8°C (2020년)이었다. 2016년도에는 농약 살포일 날 밤에

**Table 4.** Climatic conditions during honeybee semi-field study from 2016 to 2020

## (a) 2016

2016 date	Days of experiment	Temperature (°C)		Rel. humidity (%)		Rain (mm)
		mean	max	mean	max	
15-Apr ~ 17-Apr	-3 ~ -1	11.8 ~ 15.0	17.8 ~ 23.9	70.9 ~ 76.5	93.2 ~ 98.4	D-2: 13.5, D-1: 9.0
18-Apr ~ 25-Apr	0 ~ 7	11.7 ~ 17.0	15.9 ~ 24.9	58.9 ~ 92.6	87.9 ~ 96.6	D0: 1.0, D3: 31.0
26-Apr ~ 13-May	8 ~ 25	13.2 ~ 19.5	15.1 ~ 27.2	51.1 ~ 89.4	82.4 ~ 95.4	D8: 0.5, D9: 29.5, D10: 3.0, D14: 8.0, D15: 16.0, D18: 0.5, D22: 18.0, D25: 0.5

## (b) 2017

2017 date	Days of experiment	Temperature (°C)		Rel. humidity (%)		Rain (mm)
		mean	max	mean	max	
18-Apr ~ 20-Apr	-3 ~ -1	11.6 ~ 13.5	15.2 ~ 21.9	60.2 ~ 81.0	90.9 ~ 97.5	D-3: 0.5, D-1: 3.0
21-Apr ~ 28-Apr	0 ~ 7	12.1 ~ 16.9	18.8 ~ 24.2	54.1 ~ 96.0	81.2 ~ 97.4	D3: 0.5, D4: 5.5, D5: 0.5
29-Apr ~ 17-May	8 ~ 26	14.9 ~ 20.0	17.2 ~ 28.3	49.6 ~ 88.0	81.6 ~ 95.7	D14: 11.5, D18: 15.5, D19: 2.5

## (c) 2018

2018 date	Days of experiment	Temperature (°C)		Rel. humidity (%)		Rain (mm)
		mean	max	mean	max	
23-Apr ~ 25-Apr	-3 ~ -1	13.8 ~ 15.3	15.1 ~ 21.4	59.3 ~ 89.0	92.5 ~ 94.5	D-3: 18.5, D-2: 3.0
26-Apr ~ 03-May	0 ~ 7	12.0 ~ 20.4	15.5 ~ 25.9	63.7 ~ 88.3	86.2 ~ 98.7	D6: 38.0
04-May ~ 21-May	8 ~ 25	14.0 ~ 26.1	18.7 ~ 29.7	48.4 ~ 94.8	65.1 ~ 98.6	D10: 12.5, D11: 16.5, D16: 17.5, D17: 5.5, D21: 0.5, D22: 5.0

## (d) 2019

2019 date	Days of experiment	Temperature (°C)		Rel. humidity (%)		Rain (mm)
		mean	max	mean	max	
16-Apr ~ 18-Apr	-3 ~ -1	12.8 ~ 14.3	22.0 ~ 22.9	45.5 ~ 68.0	81.9 ~ 92.3	
19-Apr ~ 26-Apr	0 ~ 7	9.0 ~ 17.7	10.1 ~ 28.3	66.8 ~ 90.1	87.1 ~ 96.3	D4: 20.0, D5: 0.5, D6: 6.0, D7: 1.5
27-Apr ~ 14-May	8 ~ 25	11.0 ~ 20.3	13.6 ~ 28.2	46.6 ~ 88.7	79.5 ~ 95.8	D10: 31.0

## (e) 2020

2020 date	Days of experiment	Temperature (°C)		Rel. humidity (%)		Rain (mm)
		mean	max	mean	max	
07-Apr ~ 09-Apr	-3 ~ -1	7.1 ~ 9.3	13.8 ~ 16.4	58.0 ~ 66.3	86.6 ~ 91.4	
10-Apr ~ 17-Apr	0 ~ 7	7.1 ~ 14.6	11.3 ~ 23.8	49.3 ~ 74.9	78.8 ~ 92.7	D7: 4.5
18-Apr ~ 06-May	8 ~ 26	7.1 ~ 20.7	10.7 ~ 28.1	46.9 ~ 89.8	63.8 ~ 96.1	D8: 3.5, D9: 15.5, D22: 0.5, D23: 22.5, D25: 1.0

약 1 mm의 비가 내렸고 3일 후 31 mm의 비가 내렸다. 2017년도에는 농약 살포 후 3일 날 0.5 mm의 매우 적은 양의 비가 내렸고 4, 5일날에 비가 내렸다. 2018년도에는 농약 살포 후 6일 날 비가 38 mm 내렸고 2019년은 4일 후에 20 mm의 비가 내리고 살포 후 5, 6, 7일날 비가 내렸다. 2020년에는 농약 살포 후 7일에 4.5 mm의 비가 내렸다. OECD No.75 시험법에서는 기상조건 항목에 낮 시간 동안 기온이 < 15°C, > 30°C 인 날을 피하고 우기(rainy periods)를 피하라고 명시되어있다. 국내에서 시험한 5년 동안의 기상조건은 대부분 OECD 시험조건에 부합하였다. 2016년의 경우 갑작스럽게 농약살포 10시간 후에 비가 1 mm 내렸지

만 나머지 수행년도에서는 살포 후 최소 3일 이후에 비가 내렸다. 또한 2019년, 2020년 터널 관찰 기간 동안 낮 최고 기온이 10.1°C, 11.3°C 인 날 하루를 제외하고 6일 동안은 모두 15°C 이상이었다. 농약 살포 후 터널 노출 기간 동안 최대한 비를 피해야하지만 국내 4-5월 날씨의 경우 비를 피해서 시험일정을 정하는 것은 매우 어려운 일이다. 따라서 농약 살포일 당일이나 다음날까지는 최대한 비를 피할 수 있도록 일정을 조절해야한다.

**꿀벌 치사 개체수**

Table 5는 2016~2020년 꿀벌 반야외시험 무처리군, 양성

**Table 5.** Mortality of worker bees during the experimental phase

Year	Treatment	daily mean day -3 to day -1 <sup>b.a.</sup>	daily mean day 0 to day 7 <sup>a.a.</sup>	daily mean day 8 to day 25 <sup>a.a.</sup>	daily mean day 0 to day 25 <sup>a.a.</sup>
2016	Control	73.3±16.0	70.8 ± 44.5	104.1 ± 38.2	93.5 ± 42.4
	Toxic reference (dimethoate 400 g a.i./ha)	75.4 ± 5.9	607.7(*) ± 778.0	67.7 ± 29.4	240.5(*) ± 493.2
	Toxic reference (diflubenzuron 600 g a.i./ha)	63.7 ± 31.2	58.1 ± 49.6	99.4 ± 46.0	86.2 ± 50.2
2017	Control	219.6 ± 72.3	241.1 ± 70.9	24.4 ± 20.6	93.7 ± 111.4
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	142.3 ± 83.5	128.0 ± 43.5	19.4 ± 22.1	54.1 ± 59.6
2018	Control	188.0 ± 126.4	154.1 ± 83.8	23.7 ± 13.6	67.2 ± 83.4
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	190.7 ± 72.6	174.8 ± 94.7	19.0 ± 10.6	70.9 ± 94.3
2019	Control	159.9 ± 137.7	90.6 ± 51.0	9.7 ± 5.7	34.6 ± 46.9
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	140.3 ± 129.4	96.8 ± 40.5	15.0 ± 12.6	40.2 ± 45.2
2020	Control	269.4 ± 228.4	207.6 ± 119.4	8.7 ± 5.7	67.6 ± 111.5
	Toxic reference (dimethoate 600 g a.i./ha)	78.3(*) ± 57.3	257.6 ± 125.0	5.7(*) ± 3.8	80.3 ± 134.0

b.a = before application; a.a=after application

대조군의 꿀벌 치사 개체수를 보여준다. 무처리군은 터널 내부에서 평균 치사 개체수가 70.8~269.4마리였다. Dimethoate 처리군은 터널 내 관찰기간 동안 농약살포 후 평균 치사 개체수가 각각 257.6, 607.7마리였다. Diflubenzuron 처리군은 터널 내 평균 치사 개체수가 58.1~190.7마리였다. 2016년에 수행된 시험의 dimethoate 처리군은 터널 노출기간 동안 평균 꿀벌 치사개체수가 607.7마리로 무처리군에 비해 약 9배 이상 증가하였다. Diflubenzuron 처리군의 평균 꿀벌 치사 개체수는 무처리군과 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 이는 diflubenzuron이 IGR 계열 농약으로 꿀벌 성체 치사 개체수에 영향을 주지 않았기 때문이다. 꿀벌 반야외시험은 땅사 터널 안에 벌통을 배치하여 시험을 하기 때문에 벌들이 닫힌 공간에 대한 스트레스를 받게 된다. 따라서 벌들 중 일부는 회분매개 활동을 하지 않고 터널 밖으로 나가려는 이상 탈출행동을 보이게 되며 결국 터널 천장에서 머물다가 죽게된다. 2020년 시험의 경우 시험물질 살포 전 무처리군의 평균 치사개체수가 양성대조군보다 통계적으로 유의하게 많았다. 이는 무처리군에서 외역벌 개체수가 다른 처리군보다 많아 상대적으로 터널을 탈출하려는 개체수가 많아서 기인한 것으로 추측하였다. 최근 SynTech Research (2019)에서는 꿀벌 반야외시험 수행시 터널 내 꿀벌의 스트레스를 감소시키는 방법으로 무처리군에서 벌통을 터널 중앙과 터널 끝(OECD 시험법 기준)에 배치하여 꿀벌 치사개체수를 비교하였다. 시험결과 터널 중앙에 벌통을 배치하였을 때 꿀벌 치사개체수가 통계적으로 유의하게 감소하여 봉군을 터널 중앙에 배치하는 것을 제안하였다. 2020년 시험의 무처리군에서 농약 살포 전 3일 동안 평균 치사 개체수가 양성대조군보다 상대적으로 많아 농약 살포 후 무처리군과 양성대조군의 치사 개체수를 비교하기가 어려웠다. 하지만 양성대조군(dimethoate)의 농약 살포 전과 후의 평균 치사 개

체수를 비교할 때 살포 후에 치사 개체수가 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다.

Miles (2003)은 spinosad 액상수화제(SC)의 꿀벌 영향을 평가하기 위해 꿀벌 반야외시험을 수행하였으며 dimethoate (400 g a.i./ha)를 양성대조군으로 처리하였을 때 평균 꿀벌 치사 개체수가 무처리군에 비해 살포 후 2일까지 통계적으로 유의하게 증가하였고, Dinter and Samel (2015)은 cyantraniliprole 유현탁제(SE)의 꿀벌 영향을 평가 하기 위해 반야외 시험에서 양성대조군을 dimethoate 유제를 사용하였으며 dimethoate (400 g a.i./ha)을 처리 후 7일 동안 꿀벌 치사 개체수가 무처리군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. Schur et al. (2003)은 독일에서 수행된 꿀벌 반야외시험 중 양성대조군으로 fenoxycarb (Insega 25WG)를 사용한 5개의 시험결과를 분석하였다. Fenoxycarb 처리 후 꿀벌 치사개체수는 영향을 받지 않았지만 농약 살포 2주 후에 번데기 치사 개체수는 크게 증가하였다.

**비행활동**

Table 6은 2016~2020년 꿀벌 반야외시험 무처리군과 양성대조군의 비행활동 개체수를 나타낸다. 무처리군의 수돗물 살포 전 평균 비행활동 개체수는 14.7~24.5 마리였으며 살포 후 7일 동안 평균 비행활동 개체수는 13.7~25.4 마리였다. 양성대조군 dimethoate 처리군은 농약살포 후 비행활동 개체수가 2016년, 2020년에 각각 1.3, 0.5마리로 살포 전과 비교했을 때 현저하게 비행활동 개체수가 줄어들었다. 반면 diflubenzuron 처리군의 경우 비행활동 개체수가 살포 전 후 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 무처리군과 비교할때도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 dimethoate은 꿀벌 성체에 직접적으로 노출될 경우 치사를 일으키지만 diflubenzuron은 IGR계열로 꿀벌 성체보다 유충발달에 영향

**Table 6.** Flight activity of honey bees during the exposure phase in the treatments

Year	Treatment	daily mean day -3 to day -1 <sup>b.a</sup>	daily mean day 0 to day 7 <sup>a.a</sup>
2016	Control	14.7 ± 6.0	13.7 ± 6.8
	Toxic reference (dimethoate 400 g a.i./ha)	17.3 ± 5.4	1.3(*) ± 1.3
	Toxic reference (diflubenzuron 600 g a.i./ha)	14.8 ± 5.7	15.4 ± 7.6
2017	Control	19.4 ± 13.4	19.2 ± 4.5
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	13.5 ± 9.9	17.7 ± 5.7
2018	Control	15.4 ± 7.0	19.1 ± 8.1
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	17.0 ± 8.5	17.4 ± 6.7
2019	Control	24.5 ± 6.0	14.9 ± 10.4
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	19.3(*) ± 3.1	13.2 ± 9.4
2020	Control	22.8 ± 3.7	25.4 ± 12.1
	Toxic reference (dimethoate 600 g a.i./ha)	18.0(*) ± 2.5	0.5(*) ± 0.9

b.a = before application; a.a=after application

**Table 7.** Brood termination rates of the marked cells in the case of eggs at BFD 0

Year	Treatment	Brood termination rate (BTR)	
		Mean	SD
2016	Control	31.33	12.85
	Toxic reference (dimethoate 400 g a.i./ha)	83.50(*)	28.58
	Toxic reference (diflubenzuron 600 g a.i./ha)	68.00(*)	14.18
2017	Control	29.33	6.53
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	77.33(*)	26.63
2018	Control	20.50	14.57
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	100(*)	0
2019	Control	47.3	13.5
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	75.2	22.5
2020	Control	29.8	8.6
	Toxic reference (dimethoate 600 g a.i./ha)	97.3(*)	4.6

을 주는 농약이기 때문이다.

Miles et al. (2012)는 spinosad가 꿀벌에 미치는 영향을 평가하기 위해 독일, 프랑스 등 유럽에서 수행한 10개의 꿀벌 반야외시험을 분석하였다. 분석결과 무처리군의 비행활동 개체수는 평균 15-20마리였지만 양성대조군 dimethoate 유제(400-600 g a.i./ha) 살포 후 7일 동안 비행활동 개체수가 5마리 이내로 크게 감소하였으며 이는 국내 시험결과와 비슷한 양상을 나타내었다.

#### Brood termination rate (BTR)

Table 7은 2016~2020년 꿀벌 반야외시험 무처리군과 양성대조군의 BTR 값을 나타낸다. 무처리군 BTR값은 20.5~47.3%이었다. 양성대조군 dimethoate 처리군의 BTR은 83.5, 97.3%이었다. Diflubenzuron 처리군의 BTR은 68.0~100% 이었다. 2019년은 무처리군의 BTR이 47.3%이었고 양성대조군(diflubenzuron)의 BTR 값은 75.2%이었으며 통

계적으로 유의한 차이가 없었다. 2019년 시험수행 시 유채 균핵병 발생으로 만개한 유채 꽃 면적이 상대적으로 작았으며 먹이 부족으로 인해 무처리군의 BTR 값이 높게 나온 것으로 예측한다. 총 5회의 시험 중 4회의 무처리군 BTR 값이 약 30%의 값을 나타냈으며 이는 선행연구 결과와 비슷한 값을 나타내었다. 양성대조군 dimethoate 유제와 diflubenzuron 수화제 처리군 모두 BTR값이 68.0% 이상 나왔고 양성대조군 6개 시험의 평균 BTR 값이 83.5%가 나와 국내 양성대조군 물질로 적절하다고 판단된다.

독일과 스위스에서는 2011년에서 2014년까지 54개의 시험이 수행되었고 사용된 반복수(터널 수)는 208개였다. 무처리군과 양성대조군(fenoxycarb)의 BTR 값은 각각 29.2 ± 21.6%, 70.7 ± 27.4% 이었다. 무처리군의 BTR값이 30% 이하인 반복수는 전체의 61.5% 이었고 40% 이하는 76.9% 이었다. 양성대조군은 BTR 값이 70% 이상인 데이터가 전체 반복수 중 56.6% 이었다(Becker et al., 2015). Szczesniak

et al. (2018)은 2014년부터 2017년까지 독일, 프랑스, 스페인, 미국에서 수행한 꿀벌 반야외시험의 무처리군 BTR 값을 분석하였으며 그 결과 독일(61개 시험), 프랑스(3개 시험), 스페인(5개 시험), 미국(17개 시험)의 BTR 값은 각각 30.2%, 19.4%, 41.8%, 50.6% 이었다. 미국과 스페인의 무처리군 BTR 값은 상대적으로 독일과 프랑스에 비해 높게 나타났다. 국내 무처리군(5개 시험, 15개 터널) 평균 BTR 값은 31.65%로 독일의 무처리군 BTR 값과 비슷한 결과를 나타내었다.

BTR은 시험의 유효성을 나타내는 중요한 결과 값이다. 무처리군에서 낮은 BTR 값은 좋은 시험 유효성을 나타낸다. 하지만 OECD 시험법에서는 시험유효성에 대한 구체적인 BTR 값을 제시하지 않고 있다. 유럽에서 무처리군의 유효성 기준으로 BTR < 30% 또는 BTR < 40% 기준은 여전히 논의 중에 있다.

**Brood index (BI) and compensation index (CI)**

Table 8은 꿀벌 반야외시험 5년 동안의 무처리군과 양성대조군의 BI 값을 보여준다. 무처리군 BI 값은 2.34~3.98이었다. 양성대조군 dimethoate 처리군의 BI값은 0.13~1.17이었다. Diflubenzuron 처리군의 BI 값은 0.00~1.75 이었다. 2019년은 무처리군의 BTR이 47.3%이었던기 때문에 BFD+22 BI 값이 2.63으로 상대적으로 다른 년도에 수행한 시험 값보다 낮게 나왔다.

Table 9는 꿀벌 반야외시험 5년 동안의 무처리군과 양성대조군의 CI 값을 보여준다. 무처리군 CI 값은 2.52~4.55이었다. 양성대조군 dimethoate 처리군의 CI값은 0.67~1.95이었다. Diflubenzuron 처리군의 CI 값은 0.00~3.38 이었다. 다른 년도에 수행된 반야외시험에서 diflubenzuron처리군은 BFD+5에서 BFD+22까지 CI 값이 2이상으로 증가하는 경향을 나타냈지만 2018년도 diflubenzuron 처리군은 BTR 값

**Table 8.** Brood index during the observation period

Year	Treatment	Brood indices during the observation period (±1 day)				
		BFD 0	BFD+5	BFD+10	BFD+16	BFD+22
2016	Control	1	2.52 ± 0.07	2.98 ± 0.33	2.80 ± 0.42	3.43 ± 0.59
	Toxic reference (dimethoate 400 g a.i./ha)	1	1.17 ± 1.00	0.66(*) ± 1.02	0.66(*) ± 1.02	0.84(*) ± 1.29
	Toxic reference (diflubenzuron 600 g a.i./ha)	1	1.51 ± 0.47	1.57 ± 0.67	1.28(*) ± 0.51	1.53(*) ± 0.57
2017	Control	1	2.54 ± 0.12	2.92 ± 0.33	2.89 ± 0.32	3.52 ± 0.35
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	1.75(*) ± 0.23	0.97(*) ± 1.16	0.91(*) ± 1.07	1.13(*) ± 1.33
2018	Control	1	2.63 ± 0.22	3.15 ± 0.58	3.19 ± 0.56	3.98 ± 0.73
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	0.09(*) ± 0.15	0.00(*)	0.00(*)	0.00(*)
2019	Control	1	2.38 ± 0.26	2.34 ± 0.51	2.27 ± 0.53	2.63 ± 0.68
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	1.48 ± 1.24	1.24 ± 1.08	1.08 ± 0.97	1.24 ± 1.13
2020	Control	1	2.68 ± 0.21	3.14 ± 0.15	3.03 ± 0.18	3.52 ± 0.42
	Toxic reference (dimethoate 600 g a.i./ha)	1	0.95(*) ± 0.97	0.15(*) ± 0.25	0.15(*) ± 0.27	0.13(*) ± 0.23

BFD = Brood area fixing day

**Table 9.** Brood compensation index during the observation period

Year	Treatment	Compensation indices during the observation period (±1 day)				
		BFD 0	BFD+5	BFD+10	BFD+16	BFD+22
2016	Control	1	2.52 ± 0.07	2.99 ± 0.33	2.83 ± 0.43	3.61 ± 0.60
	Toxic reference (dimethoate 400 g a.i./ha)	1	1.18 ± 1.00	0.67(*) ± 1.02	1.18(*) ± 0.88	1.95 ± 1.33
	Toxic reference (diflubenzuron 600 g a.i./ha)	1	1.55 ± 0.42	1.72 ± 0.53	1.77(*) ± 0.05	2.12(*) ± 0.04
2017	Control	1	2.60 ± 0.07	3.38 ± 0.12	3.71 ± 0.14	4.26 ± 0.20
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	1.75(*) ± 0.23	2.16 ± 0.43	3.07 ± 0.44	3.38(*) ± 0.32
2018	Control	1	2.68 ± 0.24	3.40 ± 0.39	3.67 ± 0.22	4.55 ± 0.25
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	0.09(*) ± 0.15	0.00(*)	0.34(*) ± 0.58	0.67(*) ± 1.15
2019	Control	1	2.52 ± 0.18	2.84 ± 0.48	3.05 ± 0.67	3.84 ± 0.49
	Toxic reference (diflubenzuron 800 g a.i./ha)	1	1.90 ± 0.88	1.77 ± 1.18	1.68 ± 1.21	2.53 ± 1.55
2020	Control	1	2.72 ± 0.19	3.46 ± 0.05	3.52 ± 0.18	4.21 ± 0.12
	Toxic reference (dimethoate 600 g a.i./ha)	1	1.14(*) ± 1.04	0.70(*) ± 0.90	0.96(*) ± 1.01	1.41(*) ± 1.70

BFD = Brood area fixing day

이 100%로 BI 값도 0.00이었으며 CI값도 0.00~0.67로 난 유충 발육이 전혀 되지 않고 있었음을 알 수 있었다.

Miles et al. (2012)의 유럽에서 수행된 꿀벌 반야외시험 분석결과에 의하면 양성대조군으로 fenoxycarb와 dimethoate를 사용하였을 때 두처리군 모두 CI가 BFD +6, +10, +15, +21에 모두 1보다 작거나 2 이하로 나와 무처리군에 비해 통계적으로 유의하게 작았다.

Schur et al. (2003)은 독일에서 수행된 5개 꿀벌 반야외시험 ring test 결과를 분석하였다. 5개의 시험분석 결과 BTR 값은 무처리군이 8-43%이었고 양성대조군이 94-100%이었다. 난 유충 발육도 분석결과 시험 3개의 무처리군에서 BI가 BFD+10일까지 증가하였지만 BFD+16, BFD +22 일에는 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 여름에 기상악화로 비가 예상보다 자주 와서 벌통 내 먹이 부족현상으로 기인한다고 예측하였다. 양성대조군은 fenoxycarb (Insega 25WG)를 살포하였으며 무처리군에 비해 통계적으로 유의하게 BI 값이 작았다. Brood에 심각하게 영향을 준 경우에는 양성대조군에서 BFD+5에서 BFD+22까지 BI 값이 0.00을 유지하였다.

국내에서 2016-2020년에 수행된 꿀벌 반야외시험 분석 결과 양성대조군은 시험목적에 따라 dimathoate 유제 또는 diflubenzuron 수화제를 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 두 양성대조군 모두 평균 BTR 값은 70%이상 나타났으며 무처리군의 BTR 값은 20.50~47.3%를 나타냈다. 꿀벌 반야외시험 무처리군 BTR 값은 2019년을 제외하고 약 31% 이하를 유지하였다. 하지만 반야외시험은 야외에서 진행되는 시험으로 날씨 등 다양한 변수들이 존재하기 때문에 2019년에 수행한 시험에서는 무처리군의 BTR 값이 45%이상 나왔으며 양성대조군과도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 5년간의 시험결과를 볼 때 국내 꿀벌 반야외시험의 경우 BTR 값은 무처리군의 경우 40% 이하, 양성대조군은 70% 이상을 적절한 유효성 기준이라고 보여진다. 하지만 국내 데이터는 현재까지 시험횟수가 5회(반복수 15회)로 매우 적고 한 장소에서만 수행되었기 때문에 향후 국내 타기관과 함께 꿀벌 반야외시험 ring-test를 수행하여 합리적인 시험 유효성 기준을 제시하기 위한 국내 데이터 축적이 필요하다고 생각된다.

## 저자정보 및 기여

Kyongmi Chon, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Conceptualization; Methodology; Investigation; Data Curation; Writing-Original Draft preparation; Funding Acquisition; Project Administration, <https://orcid.org/0000-0003-2143-2614>

Juyeong Kim, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Master student, Investigation, <https://orcid.org/0000-0002-6413-1822>

Bo-Seon Kim, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Research assistant, Investigation, <https://orcid.org/0000-0001-6053-6366>

Hwan Lee, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Research assistant, Investigation, <https://orcid.org/0000-0002-4487-8929>

Hong-Hyun Park, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Doctor of Philosophy, Supervision, <https://orcid.org/0000-0003-1213-0665>

Jin-A Oh, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Researcher, Supervision, <https://orcid.org/0000-0002-1166-4377>

Kwang-Soo Kim, Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Doctor of Philosophy, Resources, <https://orcid.org/0000-0002-1297-3964>

Yong-Soo Choi, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Doctor of Philosophy, Resources, <https://orcid.org/0000-0001-8453-5165>

## 감사의 글

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

## 이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다

## Literature Cited

- Allsopp MH, De Lange WJ, Veldtman R, 2008. Valuing insect pollination services with cost of replacement. *PLOS Biol.* 3(9):1-8, e3128.
- Becker R, Lückmann J, Pistorius J, 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, Ratnieks FLW, 2000. Long range foraging by the honey bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.* 14(4):490-496.
- Blacquièrre T, Smaghe G, Van Gestel CA, Mommaerts V, 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology.* 21(4):973-992.
- Carreck NL, Ball BV, Wilson JK, 2002. Virus succession in honeybee colonies infested with *Varroa destructor*. *Apiacta.* 37:33-38.
- Chon K, Lee H, Hwang HC, Im J, Park KH et al., 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.
- Chon K, Kim BS, Lee H, Park KH, Paik MK, et al., 2018. A study on the effect of carbaryl wettable powder on honeybee brood under semi-field conditions. *Korean J. Pestic. Sci.* 22(2):99-108. (In Korean)
- Dinter A, Samel A, 2015. Cyantraniliprole: pollinator profile of the novel insecticides under laboratory, semi-field and field conditions. *Julius-Kühn-Archiv.* 450:28-49.
- 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). Parma, Italy.
- Emmett BJ, Archer BM, 1980. The toxicity of diflubenzuron to honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in apple orchards. *Plant. Pathol.* 29(4):177-183.
- EPA, 1997. Reregistration Eligibility Decision (RED) Diflubenzuron, Washington, D.C. USA.
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.* 68(3): 810-821.
- Gerig L, 1991. Importance de l'Insegar pour l'apiculture et l'arboriculture, *J. Suisse Apic.* 88:235-238.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M, 2010. Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie.* 41(3): 312-331.
- Jung CE, 2008. Economic value of honeybee pollination on major fruit and vegetable crops in Korea. *Korean J. Apic.* 23(2):147-152. (In Korean)
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA et al., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.* 274(1608):303-313.
- Lebuhn G, Droege S, Connor EF, Gemmill-Herren B, Potts SG, et al., 2013. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. *Conserv. Biol.* 27(1):113-120.
- Lückmann, J, Tänzler V, 2020. Honeybee brood testing under semi-field and field conditions according to Oomen and OECD GD 75: is there a difference of the brood termination rate? *Julius-Kühn-Archiv.* 465:91-95.
- Miles M, 2003. The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the honeybee. *Bull. Insectol.* 56(1): 119-124.
- Miles MJ, Alix A, Bourgouin C, Schmitzer S, 2012. Effects of spinosad on honey bees (*Apis mellifera*): Findings from over ten years of testing and commercial use. *Julius-Kühn-Archiv.* 437:107-114.
- OECD, 2007. Guidance Document No. 75: Guidance document on the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field conditions. Paris, France.
- OEPP/EPPO, 2010a. EPPO Standards PP 3/10 (3): Environmental risk assessment for plant protection products. Chapter 10: honeybees. *OEPP/EPPO Bulletin.* 40:323-331.
- OEPP/EPPO, 2010b. EPPO Standards PP 1/170 (4): Efficacy evaluation of plant protection products: Side-effects on honeybees. *OEPP/EPPO Bulletin.* 40(3):313-319.
- Oomen PA, De Ruijter A, Van der Steen J, 1992. Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides. *EPPO Bulletin.* 22(4):613-616.
- Potts SG, Roberts SP, Dean R, Marris G, Brown MA, et al., 2010a. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49(1):15-22.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, et al., 2010b. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25(6):345-353.
- Schur A, Tornier I, Brasse D, Muhlen W, Von der Ohe W, et al., 2003. Honey bee brood ring-test in 2002: method for the assessment of side effects of plant protection products on the honey bee brood under semi-field conditions. *Bull. Insectology.* 56(1):91-96.
- Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, et al., 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth.* 10(4):434-445.
- Staveley JP, Law SA, Fairbrother A, Menzie CA, 2014. A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Hum. Ecol. Risk Assess.: Int. J.* 20(2):566-591.
- SynTech Research, 2019. Honeybees do not like be(e)ing confined. <https://www.syntechresearch.com/wp-content/uploads/2019/06/SynTech-Pollinator-Poster.pdf> (Accessed April. 5. 2021).
- Szczesniak B, Pilling E, Bocksch S, Becker R, Lückmann J, 2018. ICP-PR Bee Brood Working Group-variability of brood termination rates in reference to validity criteria and limited effectiveness of method improvement in honeybee semi-field studies (OECD GD 75). *Julius-Kühn-Archiv.* 462:111-115.
- Tasei JN, 2001. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-*Apis* bees. A review. *Apidologie.* 32(6):527-545.

Thompson HM, Wilkins S, Battersby AH, Waite RJ, Wilkinson D, 2005. The effects of four insect growth-regulating (IGR) insecticides on honeybee (*Apis mellifera* L.) colony development, queen rearing and drone sperm production. *Ecotoxicology*. 14(7):757-769.

USEPA, 2014. Guidance for assessing pesticide risks to bees. Washington, D.C. USA.

Vanbergen, AJ, 2013. Threats to an ecosystem service: pressures

on pollinators. *Front. Ecol. Environ.* 11(5):251-259.

Vanengelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes J, 2007. Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.* 147(7):599-603.

Williams IH, 1994. The dependences of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agric. Zool. Rev.* 6:229-257.

## ● ..... ●

### 국내 꿀벌 반야외시험법 유효성 검증을 위한 무처리군 및 양성대조군 주요 데이터 분석

전경미<sup>1\*</sup> · 김주영<sup>1</sup> · 김보선<sup>1</sup> · 이 환<sup>1</sup> · 박흥현<sup>1</sup> · 오진아<sup>1</sup> · 김광수<sup>2</sup> · 최용수<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

**요 약** 국내 꿀벌 반야외시험은 2016년부터 2020년도까지 국립농업과학원 반야외시험 포장에서 매년 4월부터 5월까지 약 한 달간 수행되었다. 시험은 무처리군, 양성대조군, 시험물질 처리군으로 각각 3반복 시험을 수행하였다. 양성대조군은 dimethoate 유제 46% (400 g, 600 g dimethoate a.i./ha)와 diflubenzuron 수화제 25% (600 g, 800 g diflubenzuron a.i./ha)를 사용하였다. 본 연구에서는 국내 꿀벌 반야외시험의 무처리군 및 양성대조군의 주요 데이터 (꿀벌 치사 개체수, 비행활동, brood termination rate (BTR), brood index, compensation index)를 비교 분석하였다. Dimethoate 처리군은 꿀벌 치사 개체수와 비행활동에 무처리군에 비해 현저한 영향을 주었지만 diflubenzuron은 IGR 계열 농약으로 꿀벌 치사 개체수 및 비행활동에 영향을 주지 않았다. 반야외시험의 주요 데이터인 BTR은 무처리군에서 20.5%~47.3%이었고 양성대조군의 BTR은 68.0%~100% 이었다. 따라서 국내 꿀벌 반야외시험의 양성대조군은 시험목적에 따라 dimethoate 유제 또는 diflubenzuron 수화제를 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 5년간의 시험 결과를 볼 때 국내 꿀벌 반야외시험의 경우 BTR 값은 무처리군의 경우 40% 이하, 양성대조군은 70% 이상을 적절한 유효성 기준이라고 보여진다. 하지만 국내 데이터는 현재까지 시험횟수가 5회(반복수 15회)로 매우 적고 한 장소에서만 수행되었기 때문에 향후 국내 타기관과 함께 꿀벌 반야외시험 ring-test를 수행하여 합리적인 시험 유효성 기준을 제시하기 위한 국내 데이터 축적이 필요하다고 생각된다.

**색인어** Brood termination rate(BTR), 꿀벌, 양성대조군, 반야외시험

● ..... ●