



ORIGINAL ARTICLES

천연제초활성 소재 AN-2064 배양여액의 급성독성 및 자극성 평가

임정현* · 박수진 · 신지영 · 홍소혜 · 윤창영 · 김민숙 · 길근환 · 김영숙¹ · 최정섭¹
 농촌진흥청 국립농업과학원 독성위해평가과, ¹한국화학연구원 친환경신물질연구센터

Evaluation of a Natural Herbicidal Material, AN-2064 Culture Broth Filtrate in Acute and Irritation Toxicity

Jeong-Hyun Lim*, Soo-Jin Park, Ji-Young Shin, So-Hye Hong, Min-Sook Kim, Chang-Young Yoon, Geun-Hwan Gil, Jung-Sup Choi¹, Young-Sook Kim¹

Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

¹Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

(Received on November 11, 2022. Revised on December 8, 2022. Accepted on December 12, 2022)

Abstract A newly developed herbicidal substance, AN-2064 culture broth filtrate, is derived from soil actinomycetes *Streptomyces achromogenes*. The aims of this study were to evaluate the acute toxicity of AN-2064 culture broth filtrate in Sprague-Dawley rats using single oral and dermal toxicity tests, as well as dermal and eye irritations in New Zealand White rabbits. We determined the medium lethal dose of AN-2064 culture broth filtrate by acute oral and dermal toxicity tests using the OECD test guidelines 423 and 402, respectively. The potential local effects of dermal and eye irritation tests were investigated according to the OECD test guidelines (404 and 405). There was no mortality and no evidence of treatment-related toxicity in acute oral and dermal toxicity tests. No dermal responses, including erythema/eschar or edema, were found in rabbits treated with AN-2064 culture broth filtrate. A minimum response was observed after eye application of test substance. The LD₅₀ value of single-dose oral and dermal toxicity tests was over 2,000 mg/kg bw in both. The test substance was identified to be non-irritant to the rabbit skin, and only slightly irritant to the rabbit eye. In this study, we confirmed the safety of the new herbicidal substance of natural product AN-2064 culture broth filtrate through animal testing.

Key words Natural herbicidal substance, Single oral toxicity, Single dermal toxicity, Irritation test, Safety

서 론

농약은 작물의 생산성 향상을 위하여 병, 해충, 잡초의 침입으로부터 작물을 보호하기 위하여 사용되고 있는 물질로 가장 직접적이고 효과가 빠르며, 적은 경비로 농업생산성을 높일 수 있는 물질이다. 그러나, 유기합성 농약을 기초로 한 화학적 방제 시스템은 그 본래의 효과 이외에 농약의 오남용, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 부정적 영향과 약제 내성 및 제초제 저항성잡초의 출현으로 인한 약효의 감소

등의 부작용을 초래하고 있다(Riches et al., 1996).

이러한 화학농약의 잠재적 인체 및 환경에 미치는 유해영향에 대한 사회적 관심이 증가함에 따라 농작물의 안정적 생산을 유지하면서 농약의 부정적 영향을 최소화할 수 있는 새로운 관리법으로써 친환경 소재들에 대한 관심이 커지고 있는 실정이다. 특히, 국내 생태계를 교란하고 있는 가시박 등의 외래 잡초의 방제에 저항성 우려가 적고, 환경오염이나 사람과 가축의 독성 측면에서 안전한 새로운 천연제초제 개발의 요구가 지속되고 있다(Choi, 2017; Kim et al., 2018).

외국에서는 최근 화학농약에 대한 규제 강화 등의 여러 이유로 인해 천연물질을 이용한 제초제의 개발과 탐색이 활

*Corresponding author
 E-mail: jhlim0531@korea.kr

발히 추진되고 있으며, 세계적으로 시장규모 역시 연평균 10% 이상씩의 높은 성장률이 예상되고 있다(Duke et al., 2000; Mitchell et al., 2001; Chaimovitsh et al., 2010; Bailey and Falk, 2011; Bailey, 2014). 그러나, 세계적으로 천연식물보호제 시장의 장기적인 성장 전망에도 불구하고, 국내의 제초제를 포함한 작물보호제 시장은 영농인구 감소와 소비 위축, 경지면적 감소 등으로 인해 침체되어 있다. 우리나라의 천연식물보호제 시장은 벤처기업이나 중소기업들을 중심으로 소수 제품만으로 시장이 구성되어 있으며, 연구와 개발이 계속해서 이루어지고 있으나 산발적이며, 장기적이며 지속적인 개발계획이 부족하다(Kim et al., 1996; Kim et al., 1997; Park et al., 2012; Lee et al., 2013; Won et al., 2015; Kim et al., 2015).

한국화학연구원 친환경신물질센터에서는 생태계 교란 외래잡초의 친환경적 방제를 위해 미생물 대사체 기반 후보 소재들을 개발하고 분석해오고 있다(Won et al., 2015; Park et al., 2019; Park et al., 2020). 방제효과나 분석이 끝난 후보 소재들은 제품의 안전성을 확보하기 위해 2019년 이래 국립농업과학원과 공동연구를 수행하고 있다. 이에, 본 연구에서는 한국화학연구원 친환경신물질센터에서 천연제조활성 성분으로 개발된 AN-2064 배양여액에 대한 안전성을 평가하기 위하여, 농촌진흥청 고시 제2021-127호, 농약 및 원제의 등록기준에 준하여 랫드와 토끼를 이용한 급성독성과 자극성을 평가하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 연구에 사용한 시험물질은 천연제조활성 소재 AN-2064 배양여액으로 건조된 분말상태를 한국화학연구원으로부터 제공받아 사용하였다. AN-2064 배양여액은 토양방선균 균주(*Streptomyces achromogenes*)로 GSS 액체배지(Glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, beef ext. 0.1%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₂ 0.2%)에 접종하여 27°C에서 7일간 진탕배양(160 rpm)하였다.

실험동물

급성독성 및 자극성시험에 사용한 SPF 랫드(Sprague Dawley rat, 8주령 암컷)와 토끼(New Zealand White rabbit, 12주령 암컷)는 한림실험동물센터(경기도 화성 소재)에서 구입 후 7일 이상의 순화기간을 거쳐 정상적인 동물만을 시험에 사용하였다. 독성시험은 국립농업과학원 동물실험윤리위원회 승인 후(승인번호: NAS-202103) 국립농업과학원 동물사육시설(전북, 완주군)에서 수행되었으며, 동물보호법을 준수하였다.

사육환경

동물사육실은 온도 20 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(형광등 조명 오전 8시~오후 8시), 조도 200~300 Lux로 유지하였다. 랫드의 경우 랫드용 스테인레스 망사육장(300 W × 500 L × 200 H mm)에 개별 사육하였다. 토끼는 토끼용 스테인레스 사육상자(380 W × 500 D × 300 H mm)에 1마리씩 넣어 사육하였고, 랫드와 토끼 모두 음수와 사료는 자유로이 급여하였다. 사료는 랫드용 고형사료(5053 Pico Lab Rodent Diet, Richmond, USA)와 토끼용 고형사료(38302 Purina rabbit Diet, Seoul, Korea)를 각각 자유 섭취시켰으며, 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

급성경구독성시험(독성등급법)

랫드에 대한 급성경구독성시험은 OECD TG423 (OECD, 2001) 'Acute oral toxicity - acute toxicity class method' 및 농촌진흥청 고시(RDA, 2021) '농약 및 원제의 등록기준, [별표12] 인축 독성 시험기준과 방법'의 급성경구독성시험에 준하여 시험하였다. 순화기간을 거친 후 건강한 암컷 랫드 12마리를 4단계로 나누어 시험하였으며, 단계별로 300, 300, 2,000, 2,000 mg/kg bw 용량을 순차적으로 투여하였다. 투여액은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여용량은 절식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 준대를 이용하여 위내에 단회 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전 약 16시간 이상 절식하였으며, 투여 후 4시간 후에 사료를 급여하였다. 시험물질 투여 후 30분, 1, 2, 3, 4시간에, 그리고 14일 동안 1일 1회씩 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유·무를 관찰하였으며 시험물질 투여 전과 투여 후 2일, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정하였다. 실험종료 후, 모든 동물은 이산화탄소 흡입마취 후 회복하여 랫드의 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 검체는 animal blood counter (scil Vet ABC, France)를 활용하여 complete blood count (CBC) 항목으로서 total leukocyte count (WBC), RBC count, hematocrit (HCT), (HGB), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), RBC distribution width (RDW), platelet (PLT), mean platelet volume (MPV), hemoglobin (Hb), lymphocyte (LYM), monocyte (MON), 및 granulocyte (GRA)을 측정하였다.

급성경피독성시험

랫드에 대한 급성경피독성시험은 OECD TG402 (OECD, 2017) 'Acute dermal toxicity' 및 농촌진흥청 고시 농촌진흥청 고시(RDA, 2021) '농약 및 원제의 등록기준, [별표12] 인축 독성 시험기준과 방법'의 급성경피독성시험에 준하여 시험하였다. 순화기간을 거친 후 건강하고 깨끗한 피부를

지닌 암컷 랫드 5마리를 4단계로 나누어 시험하였으며, 단계별로 200, 1,000, 2,000, 2,000 mg/kg bw 용량을 순차적으로 투여하였다. 투여전일 제모기((주)조아스, 경기 남양주)를 이용하여 등쪽 피모를 넓게 제모하였으며(약 6×6 cm), 제모부위의 5×5 cm 넓이를 투여부위로 하였다. 시험물질을 거즈에 도포한 후 투여하였으며 비자극성 의료용 테이프(Tegaderm, 3M)로 부착하고, Coban™ tape ((주)한국쓰리엠, 서울)으로 고정하였다. 첩포 24시간 경과 후, 시험물질 첩포를 제거하고 피부에 남은 잔류물을 멸균미온수를 이용하여 닦아내었다. 시험물질 첩포 제거 후 30분, 1, 2, 3, 4시간에, 그리고 14일 동안 1일 1회씩 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였으며 시험물질 투여 전과 투여 후 2일, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정하였다. 실험종료 후, 모든 동물은 이산화탄소 흡입마취 후 개복하여 랫드의 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 검체는 animal blood counter (scil Vet ABC, France)를 활용하여 complete blood count (CBC) 항목으로서 total leukocyte count (WBC), RBC count, hematocrit (HCT), (HGB), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), RBC distribution width (RDW), platelet (PLT), mean platelet volume (MPV), hemoglobin (Hb), lymphocyte (LYM), monocyte (MON), 및 glanulocyte (GRA)을 측정하였다.

토끼 피부자극성시험

토끼에 대한 피부자극성시험은 OECD TG404 (OECD, 2015) ‘Acute Dermal Irritation/Corrosion’ 및 농촌진흥청 고시(RDA, 2021) ‘농약 및 원제의 등록기준, [별표12] 인축

독성 시험기준과 방법’의 피부자극성시험에 준하여 시험하였다. 순화기간을 거친 후 시험물질 투여 24시간 전에 전기 제모기((주)조아스, 경기 남양주)를 이용하여 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 15 cm × 15 cm 넓이로 제모하여, 건강하고 깨끗한 피부를 지닌 암컷 토끼 3마리를 1군으로 구성하였다. 토끼 1마리를 이용한 초기시험에서 피부부식성을 나타내지 않아, 토끼 2마리를 추가로 이용해 확인시험을 수행하였다. 시험물질은 시험물질 5 g에 멸균증류수를 이용하여 총량을 5 mL로 맞추고 교반하여 현탁시킨 후 투여부위 당 0.5 mL씩을 사용하였다. 시험물질 처치 후 비자극성 의료용 테이프(Tegaderm, 3M)로 부착하였으며, Coban™ tape ((주)한국쓰리엠, 서울)으로 고정하였다. 첩포 4시간 경과 후, 시험물질 첩포를 제거하고 피부에 남은 잔류물을 멸균미온수를 이용하여 닦아내었다. 피부반응은 첩포를 제거한 후 홍반과 가피형성, 부종의 정도를 관찰하여 농촌진흥청 고시 ‘피부반응평가표’에 따라 평가한 후 1차 자극지수(P.I.I., primary irritation index)를 산출하였으며, 피부반응의 평가는 농촌진흥청 고시 ‘피부반응평가기준’에 준하여 실시하였었다.

피부반응의 정도는 첩포를 제거한 후 1, 24, 48, 및 72시간에 관찰하였다. 24시간과 72시간의 자극정도를 시험물질 첩포 제거 후 3일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였으며, 시험물질 투여 전과 투여 후 1일, 2일 및 3일 후의 개체별 체중을 측정하였다.

토끼 안점막자극성시험

토끼에 대한 안점막자극성시험은 OECD TG405 (OECD, 2021) ‘Acute Eye Irritation/Corrosion’ 및 농촌진흥청 고시(RDA, 2021) ‘농약 및 원제의 등록기준, [별표12] 인축 독

Table 1. Number of dead or clinical abnormal in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Group (Step)	Dose (mg/kg bw)	Items	Hours after administration					Days after administration																
			0.5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1	300	Dead animals	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	300	Dead animals	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	2,000	Dead animals	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	2,000	Dead animals	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

(G1-G4 n=3)

성 시험기준과 방법'의 안점막자극성시험에 준하여 시험하였다. 순화기간을 거친 후 안구에 각막, 결막 및 홍채 등에 손상이 없는 건강한 암컷 토끼 3마리를 1군으로 구성하였다. 토끼 1마리를 이용한 초기시험에서 눈 부식성 또는 심각한 자극성이 나타나지 않아, 토끼 2마리를 추가로 이용해 확인 시험을 수행하였다. 시험물질은 시험물질 5 g에 멸균증류수를 이용하여 총량을 5 mL로 맞추고 교반하여 현탁시킨 후 사용하였다. 시험물질의 투여는 토끼를 고정된 후 우안의 하안검을 가볍게 잡아당기고 결막낭 내에 시험물질 0.1 mL 씩을 투여하였으며, 좌안은 대조로 투여하지 않았다. 시험물질 투여 후 시험물질의 누출을 방지하기 위해 양안검을 잡아 약 1초간 폐안시켰으며, 세안을 실시하지 않았다. 안점막 반응의 평가는 농촌진흥청 고시 내 '안반응 평가표'에 준하여 실시하였고, 시험물질 투여 후 실험종료일까지 각막, 홍

채 및 결막 등의 이상 유무를 관찰하였다. 각 관찰시기의 개체별안점막자극지수(0~110점 범위, The individual Index of Ocular Irritation (I.O.I))를 산출하였고, 이를 이용하여 각 시기별 평균안점막자극지수(M.O.I., Mean Ocular Irritation Index)를 산출하여 평균안점막자극지수 중 최고치를 급성안점막자극지수(A.O.I., Acute Ocular Irritation Index)로 하였다. 시험물질 투여 후 9일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였으며, 시험물질 투여 전과 투여 후 1일, 2일 및 3일 후의 개체별 체중을 측정하였다.

결 과

급성경구독성평가

8주령 암컷 랫드에 시험물질 AN-2064 배양여액을 약량

Table 2. Body weights changes in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Group (Step)	Dose (mg/kg bw)	Sex	Days after administration					(change) 0-14
			0	1	2	7	14	
1	300	Female	208.6 ± 2.7 ^{a)}	220.9 ± 2.5	227.0 ± 5.7	236.2 ± 3.2	245.8 ± 6.8	37.2 ± 4.2
2	300	Female	226.3 ± 13.8	237.0 ± 15.2	242.2 ± 11.4	252.3 ± 14.0	265.6 ± 14.7	39.3 ± 1.1
3	2000	Female	228.4 ± 4.9	229.7 ± 3.1	224.9 ± 3.5	251.7 ± 5.8	263.7 ± 11.9	35.3 ± 13.5
4	2000	Female	235.6 ± 10.2	237.7 ± 8.3	229.6 ± 9.0	248.6 ± 3.2	253.6 ± 5.3	18.0 ± 15.4

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (n=3)

Table 3. Hematological findings in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Parameters	Group (mg/kg)				
	Negative control	G1 (300)	G2 (300)	G3 (2,000)	G4 (2,000)
WBC (10 ³ /μL)	6.2 ± 1.1 ^{a)}	5.8 ± 0.7	5.3 ± 2.1	3.4 ± 0.3	9.3 ± 6.6
RBC (10 ⁶ /μL)	7.7 ± 0.2	7.4 ± 0.4	7.4 ± 0.2	7.0 ± 0.1	7.2 ± 0.4
HGB (g/dL)	16.1 ± 0.2	14.8 ± 1.1	15.1 ± 0.2	14.3 ± 0.2	14.3 ± 0.6
HCT (%)	45.2 ± 0.2	42.1 ± 2.6	42.2 ± 1.1	40.5 ± 1.3	41.1 ± 2.2
MCV (fL)	58.7 ± 1.5	56.7 ± 0.6	57.7 ± 0.6	57.7 ± 1.2	57.3 ± 3.1
MCH (pg)	20.9 ± 0.8	19.9 ± 0.4	20.6 ± 0.6	20.4 ± 0.3	19.9 ± 0.6
MCHC (g/dL)	35.7 ± 0.5	35.2 ± 0.6	35.9 ± 0.5	35.4 ± 0.8	34.8 ± 0.6
RDW (%)	11.9 ± 0.2	12.0 ± 0.2	12.1 ± 0.1	12.9 ± 0.6	12.6 ± 0.5
PLT (10 ³ /μL)	790.0 ± 36.0	804.0 ± 83.2	791.3 ± 100.8	772 ± 43.2	590.7 ± 414.3
MPV (fL)	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.6
LYM (%)	65.5 ± 5.9	61.8 ± 4.6	59.3 ± 3.9	62.0 ± 6.2	57.4 ± 9.9
MON (%)	10.7 ± 0.7	11.5 ± 0.7	11.9 ± 1.3	12.4 ± 1.1	11.3 ± 1.9
GRA (%)	23.8 ± 6.5	27.4 ± 5.3	28.8 ± 3.9	25.6 ± 5.5	31.3 ± 11.4
LYM (10 ³ /μL)	4.0 ± 0.7	3.6 ± 0.7	3.2 ± 1.5	2.0 ± 0.1	4.9 ± 2.7
MON (10 ³ /μL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.6
GRA (10 ³ /μL)	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.3	3.5 ± 3.3

Total leukocyte count; WBC, red blood cell; RBC, hematocrit; HCT, hemoglobin; HGB, mean cell volume; MCV, mean cell hemoglobin; MCH, mean cell hemoglobin concentration; MCHC, RBC distribution width; RDW, platelet; PLT, mean platelet volume; MPV, hemoglobin; Hb, lymphocyte; LYM, monocyte; MON, and glanulocyte; GRA

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (n=3)

수준 300 및 2,000 mg/kg bw으로 경구투여 결과, 4단계 시험까지 사망한 개체는 없었으며, 모든 실험동물에서 특이한 일반증상 또는 시험물질과 관련된 이상 증상은 관찰되지 않았다(Table 1). 체중측정 결과, 2000 mg/kg 용량으로 투여된 3단계와 4단계 시험에서 시험물질 투여 후 2일까지 체중감소가 나타났으나 이후 정상적으로 회복되었다(Table 2). 실험종료 시 부검 결과, 모든 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며, 혈액학적 변화 역시 관찰되지 않았다(Table 3).

급성경피독성평가

8주령 암컷 랫드에 시험물질 AN-2064 배양여액을 약량 수준 200, 1,000 및 2,000 mg/kg bw으로 경피투여 결과, 4 단계 시험까지 사망한 개체는 없었으며, 모든 실험동물에서 특이한 일반증상, 체중변화 또는 시험물질과 관련된 이상 증상은 관찰되지 않았다(Table 4, 5). 실험종료 시 부검 결과, 모든 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며, 혈액학적 변화 역시 관찰되지 않았다(Table 6).

피부자극성평가

토끼 1마리를 이용한 피부 부식시험 결과, 시험물질 철폐 제거 후 3분, 1시간 및 4시간에 투여부위에서 부식 또는 자극이 관찰되지 않았다. 초기시험에서 부식 영향이 보이지 않아 토끼 2마리를 추가로 이용하여 확인시험을 수행하였다. 확인시험 결과, 시험물질 철폐 제거 후 4시간에 투여부위에 홍반, 부종 및 가피의 피부자극이 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 결과로, 시험물질의 1차 피부자극성을 Draize의 피부 자극정도에 따라 분류하면, 투여 후 24시간 및 72시간의 평균점수는 모두 0.0으로 1차 피부자극지수(P.I.I.)는 0.0으로 비자극성(Non irritant)을 나타내는 물질로 판단된다. 실험기간 동안 사망 또는 특이적인 변화를 나타내는 동물은 없었으며, 시험물질에 기인한 체중 감소가 나타나지 않았다(Table 7, 8).

안점막자극성평가

토끼 1마리를 이용한 눈 부식시험 결과, 시험물질 적용 후 1시간에 투여 부위에 심한 눈 손상 및 부식이 관찰되지 않았다. 초기시험에서 부식 영향이 보이지 않아 토끼 2마리

Table 4. Number of dead or clinical abnormal in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Group (Step)	Dose (mg/kg bw)	Items	Hours after administration					Days after administration																	
			0.5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
1	200	Dead animals	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		Clinical signs	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
2	1,000	Dead animals	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		Clinical signs	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
3	2,000	Dead animals	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
		Clinical signs	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
4	2,000	Dead animals	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		Clinical signs	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

(n=3)

Table 5. Body weights changes in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Group (Step)	Dose (mg/kg bw)	Sex	Days after administration						(change) 0-14
			0	1	2	7	14		
1	200	Female	246.7	221.2	233.2	247.0	260.7	14.01	
2	1,000	Female	227.7	226.4	232.1	248.8	270.0	42.33	
3	2,000	Female	239.9	223.2	230.7	248.0	265.4	25.50	
4	2,000	Female	228.1	215.7	238.3	256.9	270.2	42.1 ± 10.6 ^{a)}	

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (G1/G2/G3 n=1, G4 n=2)

Table 6. Hematological findings in female rats of acute oral toxicity experiment using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Parameters	Group (mg/kg bw)				
	Negative control	G1 (200)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (2,000)
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6.2 ± 1.1 ^{a)}	5.7	4.7	4.7	4.4 ± 6.6
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.7 ± 0.2	7.07	7.15	7.7	6.8 ± 6.5
HGB (g/dL)	16.1 ± 0.2	14.3	14.6	15	14.7 ± 13.4
HCT (%)	45.2 ± 0.2	39.7	42	42.6	41.5 ± 37.5
MCV (fL)	58.7 ± 1.5	56	59	55	61.0 ± 57
MCH (pg)	20.9 ± 0.8	20.2	20.4	19.5	21.7 ± 20.6
MCHC (g/dL)	35.7 ± 0.5	36.0	34.7	35.2	35.4 ± 35.9
RDW (%)	11.9 ± 0.2	12.4	13.9	12.9	15.6 ± 13.0
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	790.0 ± 36.0	804	762	900	873.0 ± 624.0
MPV (fL)	6.0 ± 0.2	5.7	6.1	6.2	5.7 ± 5.7
LYM (%)	65.5 ± 5.9	60.6	52.6	52.5	54.5 ± 45.1
MON (%)	10.7 ± 0.7	13.1	12	10.4	14.7 ± 14.9
GRA (%)	23.8 ± 6.5	26.3	35.4	37.1	30.8 ± 40
LYM ($10^3/\mu\text{L}$)	4.0 ± 0.7	3.4	2.4	2.4	2.4 ± 2.9
MON ($10^3/\mu\text{L}$)	0.6 ± 0.1	0.7	0.5	0.4	0.6 ± 0.9
GRA ($10^3/\mu\text{L}$)	1.6 ± 0.6	1.6	1.8	1.9	1.4 ± 2.8

Total leukocyte count; WBC, red blood cell; RBC, hematocrit; HCT, hemoglobin; HGB, mean cell volume; MCV, mean cell hemoglobin; MCH, mean cell hemoglobin concentration; MCHC, RBC distribution width; RDW, platelet; PLT, mean platelet volume; MPV, hemoglobin; Hb, lymphocyte; LYM, monocyte; MON, and glanulocyte; GRA

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (G1/G2/G3 n=1, G4 n=2)

Table 7. Mortality and clinical abnormal in rabbits of dermal or eye irritation study using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Item	Dermal irritation study	Eye irritation study
Mortality	0/3	0/3
Clinical abnormal	Normal	Normal

(n=3)

Table 8. Body weights changes in rabbits of dermal or eye irritation study using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Test	Days after administration				
	0	1	2	3	(change) 0-3
Dermal irritation test	2096.7 ± 130.5 ^{a)}	2153.3 ± 130.1	2183.3 ± 115.0	2176.7 ± 125.0	80.0 ± 34.6
Eye irritation test	2113.3 ± 161.7	2200.0 ± 103.9	2156.7 ± 37.9	2196.7 ± 92.9	83.3 ± 76.4

^{a)} Values are presented as mean ± S.D.

Table 9. Eye irritation study using AN-2064 Culture Broth Filtrate

Time (h)	M.O.I.				A.O.I.
	1	24	48	72	
Score	0.0	0.7	8.7	6.7	8.7

Mean ocular irritation index; M.O.I., acute ocular irritation index; A.O.I.

를 추가로 이용하여 확인시험을 수행하였다. 확인시험 결과, 1마리에서 시험물질 적용 24시간에 투여부위에 발적의 자극이 관찰되었으며, 48시간에 3마리 모두에서 투여부위에 결

막 발적, 부종, 배출물의 안점막자극이 관찰되었다. 관찰된 자극들은 9일째 모두 회복되었다. M.O.I.는 시험물질 적용 부위에서 1시간, 24시간, 48시간 및 72시간에, 각각 0.0,

Table 10. Draize scoring scale of eye irritation study

Index of acute ocular irritation (A.O.I.)	Classification
0.0 - 0.5	Non irritant
5 - 15	Mild irritant
15 - 30	Moderate irritant
30 - 60	Severe irritant
60 - 80	Extreme irritant
80 - 110	Maximal irritant

Table 11. Safety evaluation of primary dermal irritation in rabbits

Primary irritation index (P.I.I.)	Classification
0.0 - 0.5	Non irritant
0.6 - 2.0	Weak irritant
2.1 - 5.0	Moderate irritant
5.1 - 8.0	Severe irritant

0.7, 8.7, 6.7로 산출되었으며, A.O.I.는 8.7로 판정되었다 (Table 9). 실험기간 동안 사망 또는 특이적인 변화를 나타내는 동물은 없었으며, 시험물질에 기인한 체중 감소가 나타나지 않았다(Table 7, 8).

고 찰

천연식물보호제 중 제초활성을 가진 물질은 잡초방제를 위한 천연유래 생산물로서, 살아있는 미생물 또는 미생물 유래의 생산물, 성장과 발육과정에서 이들 유기체에 의해 생산된 천연대사물질을 포함한다(Bailey, 2014). 본 연구의 시험물질인 AN-2064 배양여액은 토양방선균 *Streptomyces achromogenes*에서 생산된 천연대사물질 성분으로 안전성을 확인하고자 랫드와 토끼를 이용하여 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성 및 안점막자극성 시험을 실시하였다. 시험물질은 살아있는 유기체에서 유래된 생산물로 자연환경에 이미 존재하는 천연물질로부터 얻기 때문에 기존 화학농약보다 안전할 것으로 예상된다. 하지만, 미생물에 의해 생산된 일부 천연독소는 포유동물을 포함한 동물에 위협할 수 있으므로 주의 깊게 평가되어야 할 것이다.

랫드를 이용한 급성경구 및 급성경피 독성시험과 결과, 최고 한계용량인 2,000 mg/kg bw까지 모두 사망례가 관찰되지 않았다. 두 시험 모두에서 투여군 부검 결과 특이적인 이상소견이 관찰되지 않았으며, 체중변화 및 혈액검사 결과 대조군에 비해 유의미한 증상이 나타나지 않았다. 따라서, 랫드를 이용한 급성경구 및 급성경피 독성시험에서 시험물질의 반수치사량(LD₅₀)은 모두 2,000 mg/kg bw 이상으로 판단된다. 토끼를 이용한 피부자극성시험 결과, 시험물질 투여 후 72시간까지 모든 동물에서 홍반, 부종 및 가피의 피부

반응이 전혀 관찰되지 않았다. 피부자극표와 Draize의 산출방법에 따른 피부자극성을 판정한 결과, 1차 피부자극지수(P.I.)은 0.0으로 산출되었다. 따라서, 토끼를 이용한 피부자극시험에서 시험물질은 무자극물(non irritant)로 판단된다. 토끼를 이용한 안점막자극성시험 결과, 시험물질 적용 후 24시간에 1마리에서 발적이 관찰되었으며, 48시간 이후 3마리 모두에서 발적과 부종, 유두의 자극이 관찰되었다. 관찰된 자극들은 9일째 회복되어, 가역적인 반응으로 판단된다. 안점막자극표와 Draize의 산출방법에 따른 안점막자극성을 판정한 결과, 평균안점막자극지수(M.O.I.)는 1, 24, 48 및 72시간에 각각 0.0, 0.7, 8.7, 및 6.7로 산출되었으며, 급성안점막자극지수(A.O.I.)는 8.7으로 산출되었다. 따라서, 토끼를 이용한 안점막자극시험에서 시험물질은 약한 자극성 물질(Mild irritant)로 판단된다(Table 10).

이전 연구사례에서 Meher et al. (2002)은 설치류와 어류에 미생물살충제 *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae*를 단회 투여하였을 경우, 설치류 LD₅₀은 2.5 × 10⁷ spores/mL 이상이며, 어류 LC₅₀은 1000 mg/L 이상으로 나타남을 보고하였다. Farag et al. (2022)의 보고에 따르면, 곤충병원균으로 잘 알려진 *Beauveria bassiana*의 대사원료와 2.5% 수화제에 대한 단회 경구투여독성 결과, Sprague Dawley 랫드의 LD₅₀은 5,000 mg/kg 이상으로 나타났다. 또한, Park et al. (2020)은 herbicidin을 설치류에 단회경구 또는 경피투여하였을 경우, LD₅₀ 값이 2,000 mg/kg 이상이며 피부자극 및 안점막자극이 나타나지 않는 안전한 물질로 나타났다고 보고한바 있다. 본 시험에서도 AN-2064 배양여액의 LD₅₀ 값이 2,000 mg/kg bw 이상으로 안전한 물질로 확인되었다. 피부자극성시험 결과, 무자극물로 나타났으며 안점막자극성시험 결과, 급성안점막자극지수(A.O.I.)가 8.7로 약한 자극성 물질로 판단되어 천연제초제로서 안전한 것으로 나타났다.

이상의 시험결과, 토양방선균 유래의 천연제초성분 AN-2064 배양여액은 급성경구 및 경피 독성이 매우 낮으며, 피부자극성이 없고 안점막자극성이 미약한 것으로 판단된다. 향후 외래 잡초 제거에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대되며, 천연제초제의 경우 직접적인 독성뿐만 아니라 간접적인 독성도 강하게 나타날 수 있으므로 추후 피부감작성 영향 평가도 이루어져야 할 것으로 판단된다.

Author Information and Contributions

Jeong-Hyun Lim, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-1166-4377>, Conceptualization, Methodology, Writing-original draft preparation, Project administration.

Soo-Jin Park, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-2522-3185>, Data curation and Review

Ji-Young Shin, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3177-161X>, Visualization and review

So-Hye Hong, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9958-5552>, Data analysis

Chang-Young Yoon, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-7220-5425>, Experimental planning

Min-Sook Kim, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-6914-8001>, Experimental planning

Geun-Hwan Gil, Toxicity and Risk assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-3721-2707>, Conceptualization

Young-Sook Kim, Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Doctor of Philosophy, Preparation of herbicidin, <https://orcid.org/0000-0002-7233-4806>, Conceptualization

Joung-Sup Choi, Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Doctor of Philosophy, Preparation of herbicidin, <https://orcid.org/0000-0001-7978-8985>, Conceptualization

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구사업 ‘토양미생물 기반 제초활성소재 인축 및 환경독성평가’(PJ01612802)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

저자 이해상충관계

저자 모두는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature cited

Bailey KL, Falk S, 2011. Turning research on microbial

bioherbicides into commercial products - a Phoma story. *Pest Technol.* 5(1):73-79.

Bailey KL, 2014. The bioherbicides approach to weed control using plant pathogens. Pp. 245-266. In: Abrol DP (Eds). *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, Elsevier (Academic Press), USA.

Chaimovitch D, Abu-Abied M, Belausiv E, Rubin B, Dudai N, et al., 2010. Microtubules are an intracellular target of the plant terpene citral. *Plant J.* 61(3):399-408.

Choi JS, 2017. Strategy for control of invasive alien weeds based on secondary metabolite(s) from a natural substances. *Weed Turf. Sci.* 37(2):10-12. (In Korean)

Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM, 2000. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. *Weed Res.* 40(1):99-111.

Farag AAG, Sahar SA, 2022. Acute oral toxicity of two products from a microbial pest control agent (*Beauveria bassiana*) on physiological status aspects of male albino rats. *Egypt. J. Hospital Medicine* 86(1):943-951.

Kim CS, Kim JW, Oh YJ, Hong SH, Heo SJ, et al., 2018. Exotic weeds flora in crop fields in Republic of Korea. *Weed Turf. Sci.* 7(1):1-14. (In Korean)

Kim JD, Sin HT, Kim YS, Ko YK, Cho NK, et al., 2015. The influence of adjuvants on herbicide activity of *Streptomyces scopoliridis* KR-001. *Weed Turf. Sci.* 4(4):288-294. (In Korean)

Kim PK, Park DJ, Choi JS, Hwang IT, Hong KS, 1997. Biological control by *Penicillium* species. *Agri. Chem & Biotech.* 40(11):65-70. (In Korean)

Kim PK, Park DJ, Choi SY, Kim CJ, 1996. Screening of *Penicillium* sp. showing herbicidal activity on *Trifolium repens* L. *Applied Biological Chemistry.* 39(6):455-459. (In Korean)

Lee BY, Kim JD, Kim YS, Ko YK, Yon GH, et al., 2013. Identification of *Streptomyces scopoliridis* KR-001 and its herbicidal characteristics. *Weed Turf. Sci.* 2(1):38-46. (In Korean)

Meher SM, Bodhankar SL, Kumar A, Dhuley JN, Khodape DJ, et al., 2002. Toxicity studies of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* in rats, rabbits, and fish. *Int. J. toxicol.* 21(2):99-105.

Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TEM, Hawkes TR, Holt DC, et al., 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57(2):120-128.

OECD, 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris, France.

OECD, 2015. OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris, France.

OECD, 2017. OECD Guideline for The Testing Of Chemicals; Test Guideline No. 402: Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure. Paris, France.

- OECD, 2021. OECD Guideline for Testing Of Chemicals; Test Guideline No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Paris, France.
- Park HH, Kim N, You AS, Park YK, Chon K, et al., 2020. Toxicity evaluation of a natural herbicidal material, herbicidin to rodents and rabbits. Korean J. Pestic. Sci. 24(4):334-342. (In Korean)
- Park SW, Bae TO, Kim SB, 2012. Isolation and characterization of *Streptomyces* spp. from soil showing broad spectrum antibiotic activity. Korean J. Microbiol. 48(4): 270-274. (In Korean)
- Park YK, Chon KM, Lee H, Kim BS, Yang AL, et al., 2019. Acute toxicity of herbicidin to environmental organisms. Korean J. Pestic. Sci. 23(3):212-219. (In Korean)
- Riches CR, Caseley JC, Valverde BE, Down VM, 1996. Resistance of *Echinochloa colona* to ACCase inhibiting herbicides. Proc. International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides. EWRS, Cordoba, Spain, Pp. 14-16.
- Won OJ, Kim YT, Kim JD, Choi JS, Ko YK, et al., 2015. Herbicidal activity of herbicidin from a strain of soil actinomycete *Streptomyces scopuliridis*. Weed Turf. Sci. 4(3):219-224. (In Korean)

천연제초활성 소재 AN-2064 배양여액의 급성독성 및 자극성 평가

임정현* · 박수진 · 신지영 · 홍소혜 · 윤창영 · 김민숙 · 길근환 · 김영숙¹ · 최정섭¹

농촌진흥청 국립농업과학원 독성위해평가과, ¹한국화학연구원 친환경신물질연구센터

요약 새롭게 개발된 천연제초활성 소재인 AN-2064 배양여액은 토양방선균 *Streptomyces achromogenes*로부터 추출되었다. 본 연구의 목적은 AN-2064 배양여액의 SD 랫드에 대한 급성독성을 확인하고, NZW 토끼에 대한 국소 자극성을 평가하는 것이다. 급성 경구독성과 경피독성 시험은 약제의 반수치사량을 확인하기 위해 OECD 가이드라인 423과 402에 따라 수행하였다. 피부 및 안점막자극성 시험은 피부나 눈의 국소자극을 확인하기 위해 OECD 가이드라인 404와 405에 따라 수행하였다. 급성 경구독성 및 경피독성 시험 결과, 사망한 동물이나 투여에 의한 독성 영향이 관찰되지 않았으므로, AN-2064 배양여액의 반수치사량(LD₅₀)은 두 시험에서 모두 2,000 mg/kg bw 이상으로 판단된다. 피부자극성시험 결과, 홍반, 가피 또는 부종 등의 피부반응이 전혀 관찰되지 않았으며, 안점막자극성시험 결과, 가벼운 홍반과 부종의 최소자극이 나타났다. 본 연구에서는 새로운 제초활성소재인 AN-2064 배양여액의 급성독성과 자극성을 동물실험을 통해 확인하여 안전성을 확보하고자 하였다.

색인어 천연제초활성소재, 급성경구독성, 급성경피독성, 자극성, 안전성