



## ORIGINAL ARTICLES

## 천연 제초활성물질 KR-0008 배양여액의 환경생물 급성독성

윤창영 · 전경미\* · 방준형 · 임정현 · 오진아 · Bala Murali Krishna Vasamsetti · 최정섭<sup>1</sup> · 김영숙<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과, <sup>1</sup>한국화학연구원 친환경물질연구센터

## Acute Toxicity of Natural Herbicidal Substance KR-0008 Broth Filtrate to Environmental Organisms

Chang-Young Yoon, Kyongmi Chon\*, Jun-Hyoung Bang, Jeong-Hyun Lim, Jin-A Oh, Bala Murali Krishna Vasamsetti, Joung-Sup Choi<sup>1</sup>, Young-Sook Kim<sup>1</sup>

Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-food safety, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 166, Nongsaeogmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

<sup>1</sup>Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, 141, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34114, Republic of Korea.

(Received on April 5, 2023. Revised on May 18, 2023. Accepted on May 22, 2023)

**Abstract** Due to industrialization and increased exchanges between countries, exotic plants brought into Korea threaten biodiversity and cause economic damage. Since these exotic plants are distributed around rivers, mountains, and the environmental of living, herbicide application could be hazardous to both the environment and humans. Therefore, it is necessary to remove exotic plants effectively and to develop more environmentally friendly herbicides than conventional ones. Accordingly, Korea research Institute of Chemical Technology selected KR-0008 as a candidate material based on soil microorganisms and confirmed the control effect on some exotic plants. To determine whether KR-0008 is hazardous to environmental organism, we conducted a series of acute aquatic and terrestrial toxicity tests for fish (*Oryzias latipes*, *Cyprinus carpio*), daphnia (*Daphnia magna*), earthworm (*Eisenia fetida*), and honey bees (*Apis mellifera*). The result of two acute fish toxicity tests showed that the LC<sub>50</sub> values of KR-0008 were > 100 mg/L at 48 and 96 hours. Similarly, the acute toxicity test of daphnia also showed that the EC<sub>50</sub> values of KR-0008 to daphnia were > 100 mg/L at 24 and 48 hours. Acute toxicity tests on earthworm showed that the LC<sub>50</sub> values of KR-0008 were > 1,000 mg/kg on 7 and 14 days. The LD<sub>50</sub> values of KR-0008 to honey bee in acute contact and oral toxicity studies were > 100 µg/bee at 48 and 96 hours. These findings demonstrate that the KR-0008 is acutely nontoxic to fish, daphnia, earthworms, and honeybees.

**Key words** daphnia, earthworm, fish, honeybee, KR-0008

## 서론

산업화의 진행과 외국간의 교류가 급증하면서 선박이나 비행기를 통해 외래생물종의 유입이 증가하고 있으며, 이에 따른 토착종과의 경쟁, 서식지 파괴 등으로 국내 생태계가 영향을 받고 있다(Kim, 2018). 외래생물은 외국에서 인위적

또는 자연적으로 유입되어 본래의 서식지나 원산지가 아닌 곳에서 존재하게 된 생물이다(ME, 2019). 국내에 유입된 외래생물은 2,167종으로 그 중 외래식물은 334종이다(NIE, 2020). 외래식물 중에서 생태계교란 생물로 돼지풀, 가시박, 환삼덩굴 등 17종이 지정되어 있다(ME, 2019). 이러한 외래식물들은 산지나 하천뿐만 아니라 도로, 생활주변 및 농경지 등으로 빠르게 확산하고 있다. 증가하는 외래식물들은 국내의 식생과 서식환경을 변화시키며 생물 다양성을 위협하고, 경제적인 피해를 주고 있다(Choi, 2017).

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

농경지에 유입된 외래식물이나 비농경지, 도로변에 발생하는 외래식물은 제초제를 처리하여 방제가 가능하다. 하지만 주요 하천, 호수 또는 주택가는 환경 및 사람에게 독성 우려가 있어 화학농약의 제초제를 사용하기에는 적합하지 않다. 이 때문에 생태계 교란 외래식물을 제거하기 위해 뿌리를 뽑거나 베어버리는 물리적인 방법을 이용하지만 이는 노동력이 많이 소요되고 방제효과가 낮은 뿐만 아니라 번식 속도가 제거속도보다 빨라 확산을 막는 데는 역부족이다 (Choi, 2017). 따라서 외래식물을 효과적으로 제거하고 기존 제초제보다 안전하며 친환경적인 제초제 개발이 필요하다.

외국에서는 화학농약의 제초제를 대신할 수 있는 천연제초활성물질로 식물 추출물이나 미생물이 생산하는 물질인 2차 대사산물을 활발히 연구하고 있다. 예를 들어 *Piper sarmentosum* 잎과 줄기에서 추출한 piperine, sarmentine, sarmentosine, pellitorine (Feng et al., 2019), 곰팡이 *Nectria* sp.의 발효 추출물인 cinnacidin (Irvine et al., 2008), 식물병원균인 *Ascochyta caulina*에서 추출한 ascaulitoxin과 aglycone (Duke et al., 2011), 그리고 해양 균류 *Aspergillus versicolor*에서 유래한 cyclopeptides (Posada et al., 2022) 등 다양한 식물 및 미생물에서 유래한 제초활성물질을 발굴하였다. 이렇게 개발된 제초활성물질은 환경이나 사람에게 안전해야 하기 때문에 이와 관련된 독성 연구가 필수적이다. 하지만 아직까지 이러한 천연 제초활성물질에 대한 독성연구는 많이 부족한 실정이다.

국내에서도 토양 미생물인 *Streptomyces scopuliridis*에서 유래한 herbicidin (Won et al., 2015), *Pseudomonas koreensis*의 대사산물인 Hydrogen Cyanide (Yoo et al., 2018), *Streptomyces drozdowiczii*에서 추출한 KRA16-334 (Kim et al., 2021) 등 2차 대사산물을 이용한 제초제 연구가 진행되고 있지만, 제품화된 사례는 거의 없는 상황이다. 국내에 등록된 농약현황으로는 총 3,386 제품이며 (RDA, 2022), 이중 미생물 및 생화학 농약은 25 제품에 불과하다 (RDA, 2021a).

최근 한국화학연구원에서 토양미생물기반 제초활성물질 후보 소재를 연구하고 있으며, 토양 방선균인 *Streptomyces achromogenes*가 생산하는 대사산물인 KR-0008을 선발하여 외래식물인 가시박과 돼지풀 등에 대한 방제효과를 확인하였다.

국내 농약등록 신청자료로 환경생물에 대한 독성성적서를 제출해야 하며, 수생생물인 어류, 물벼룩 및 녹조류 그리고 육상생물인 조류, 지렁이 및 꿀벌 등에 대한 위해성평가를 하고 있다 (RDA, 2021b). 이에 본 연구에서 제초활성물질 후보소재를 실용화하기 위해 환경독성 기초 연구로 KR-0008 배양여액을 사용하여 송사리 및 잉어, 물벼룩, 지렁이 그리고 꿀벌에 대한 급성독성시험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

토양 방선균 유래 제초활성 후보소재인 KR-0008 배양여액을 한국화학연구원에서 제공받아 시험을 진행하였다. KR-0008 배양여액은 토양 방선균 *Streptomyces achromogenes*를 GSS 액체배지 (Glucose 2%, soluble starch 1%, beef ext. 0.1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, CaCO<sub>2</sub> 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025%)에 접종하여 7일간 27°C에서 160 rpm으로 배양하였다.

### KR-0008에 대한 어류 급성독성 평가

#### 시험생물

본 독성시험에서 사용한 어류는 국립농업과학원에서 계대 사육 중인 송사리 (*Oryzias latipes*)와 오창 양어장 (충북 소재)에서 구입한 잉어 (*Cyprinus carpio*)를 사용하였다. 송사리는 1~2 cm, 잉어는 2~4 cm 크기의 건강하고 외형상 기형이 없는 균일한 개체를 사용하였다. 외부로부터 입수한 잉어의 경우 실험실 환경과 동일한 조건에서 1주일 이상 순화시켰다. 먹이는 매일 공급하였으며 시험물질 노출 24시간 전에 공급을 중단하였다.

#### 어류 급성독성시험

어류를 이용한 KR-0008의 급성독성시험은 EPA와 OECD test guideline (EPA, 2016a; OECD, 2019) 그리고 농촌진흥청 「농약 및 원제의 등록기준」의 환경생물 독성 시험기준과 방법 (RDA, 2021b)의 담수어류 급성독성시험에 준하여 시험하였다.

시험용기는 송사리와 잉어 모두 15 L (ø 24 × 높이 30 cm) 원통형 유리 수조를 사용하였으며, 유리 수조에 시험용수 5 L를 채운 후 KR-0008을 농도 100 mg/L로 처리하였다. 음성대조군과 시험 농도 100 mg/L에서 각 7마리의 시험생물을 투입하였고, 반복구는 두지 않았다. 수온은 송사리인 경우 26°C, 잉어는 22°C로 설정하였다. 광주기는 16시간(명): 8시간(암)로 조도 800 lux를 유지하였고, 먹이는 시험기간 동안 공급하지 않았다.

시험 기간 중 시험용액을 교체하지 않는 지수식으로 시험을 진행하였으며, 96시간 동안 24시간마다 치사 개체와 이상증상 등을 관찰하여, 48시간 및 96시간의 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)을 산출하였다. 치사 개체가 발생한 경우 발견 즉시 수조에서 제거하였다. 수온, pH 및 용존산소량은 24시간 간격으로 측정하였으며, 시험 시작 전 순화 수조에서 어류 10마리와 시험 종료 후 음성대조군에서 어류의 전장 및 무게를 측정하였다.

**KR-0008에 대한 물벼룩 급성독성 평가**

시험생물

독성시험에서 사용한 시험생물로 국립농업과학원에서 계대 사육 중인 물벼룩을 사용하였다. EPA, OECD 및 우리나라의 시험법에서 추천하는 국제 표준종인 *Daphnia magna*로 시험을 진행하였으며, 최소한 3번 이상의 새끼를 출산한 건강한 어미에서 나온 출산 후 24시간 이내의 개체를 사용하였다.

물벼룩 급성독성시험

물벼룩을 이용한 KR-0008의 급성독성시험은 EPA와 OECD test guideline (EPA, 2016b; OECD, 2004) 그리고 농촌진흥청 「농약 및 원제의 등록기준」의 환경생물 독성 시험기준과 방법(RDA, 2021b)의 물벼룩급성독성시험에 준하여 시험하였다.

독성시험은 125 mL 원통형 유리수조(ø 7 × 높이 5 cm)에 시험용수인 M4 배지 100 mL를 채운 후 KR-0008을 처리하여 농도 100 mg/L를 조제하였다. 시험은 3반복으로 시험하였고, 물벼룩을 무작위로 10마리씩 투입하여 한 농도당 30마리의 물벼룩을 사용하였다. 지수식으로 48시간 동안 실시하였으며 시험기간 동안 수온은 20°C, 광도는 640 lux, 광조건은 16시간(명) : 8시간(암)으로 유지하고, 먹이는 공급하지 않았다.

개체 투입 후 24시간 및 48시간에 유영저해 및 치사 개체를 관찰하고 기록하여, 반수영향농도(EC<sub>50</sub>)을 산출하였다. 시험용기를 가볍게 흔들거나 유리막대로 저어주어 15초 이내에 물벼룩이 유영하지 못하거나 움직임이 없는 개체를 유영저해 및 치사 개체로 판정하였다.

**KR-0008에 대한 지렁이 급성독성 평가**

시험생물

독성시험에서 사용한 지렁이는 국립농업과학원에서 계대 사육 중인 줄지렁이(*Eisenia fetida*)를 사용하였다. 2개월 이상 된 개체 중 체중 300~600 mg로 건강하고 균일한 개체를 선발하였다.

인공토양제조

인공토양의 제조로 sphagnum peat (Sungro Horticulture, USA), kaolin clay (Coveris, USA)와 공업사를 사용하였다. 사용한 sphagnum peat는 pH가 5.5~6.0의 분말형태이고 건조된 식물이 남아있지 않은 것, kaolin clay는 카올린 함량이 30% 이상인 것을 구입하였고, 공업사는 50~200 µm의 입자가 50% 이상 함유된 산업용 모래를 사용하였다. 위 sphagnum peat, kaolin clay 및 공업사를 1 : 2 : 7의 비율로 투입 후 실험용 믹서를 이용하여 완전히 혼합하였다. 제조한 토양에 CaCO<sub>3</sub>를 일정량 가하여 pH 6.0 ± 0.5로 조정하였다.

지렁이 급성독성시험

지렁이에 대한 KR-0008의 급성독성시험은 EPA와 OECD test guideline (EPA, 2012; OECD, 1984) 그리고 농촌진흥청 「농약 및 원제의 등록기준」의 환경생물 독성 시험기준과 방법(RDA, 2021b)의 지렁이 급성독성시험에 준하여 시험하였다.

시험용기는 3 L 원통형의 유리로 된 용기(ø 15 × 높이 16.5 cm)를 사용하였으며, 유리 용기에 인공토양 500 g을 담고, KR-0008을 농도 1,000 mg/kg (건조 인공토양)로 첨가한 후 실험용 믹서로 잘 혼합하였다. 인공토양의 수분 함량이 35%가 되도록 증류수 200 mL를 첨가하였다. 수분 함량은 토양오염공정시험기준(NIER, 2022)에 준하여 측정하였다. 시험은 4반복으로 시험하였고, 지렁이를 무작위로 10마리씩 투입하여 처리군당 40마리의 지렁이를 사용하였다. 토양 건조를 막기 위해 시험용기를 통풍 구멍이 뚫린 플라스틱 뚜껑으로 덮었다. 시험기간 동안 먹이를 공급하지 않았으며 온도는 20°C, 광도는 600 lux로 유지하였다. 개체 투입 후 7일 및 14일에 형태이상과 치사 개체를 관찰하고 기록하였으며 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)을 산출하였다.

**KR-0008에 대한 꿀벌 급성독성 평가**

시험생물

독성시험에서 사용한 꿀벌은 *Apis mellifera* L.을 사용했으며 국립농업과학원 양봉장에서 관리하는 활동성이 좋은 일벌을 선발하여 사용하였다.

꿀벌 급성독성시험(접촉 및 섭식)

꿀벌에 대한 KR-0008의 급성 접촉 및 섭식독성시험은 OECD test guideline (OECD, 1998a; OECD, 1998b) 그리고 농촌진흥청 「농약 및 원제의 등록기준」의 환경생물 독성 시험기준과 방법(RDA, 2021b)의 꿀벌급성독성시험에 준하여 시험하였다.

꿀벌 급성접촉독성시험은 활동성이 좋은 일벌을 통풍 구멍이 있는 밀폐된 용기에 넣어 실험실에 가져와 CO<sub>2</sub> 가스로 마취를 하였다. 마취된 꿀벌을 여과지 위에 놓고 피펫을 사용하여 조제한 KR-0008 용액을 꿀벌 흉부에 1 µL씩 처리하여 100 µg/bee가 되도록 하였다. 약제를 처리한 꿀벌을 사각 철제 케이지(가로 8.5 × 세로 4.5 × 높이 6.5 cm)에 10마리씩 넣었고, 시험은 3반복으로 처리군당 30마리의 꿀벌을 사용하였다. 팁이 제거된 3 mL 주사기(Norm-Ject, HSW, Tuttlingen, Germany)에 50% 자당용액 2 mL를 채운 후 시험용기에 꽂아 주었다. 시험기간 동안 온도는 25°C, 습도는 60%를 유지하였고 암실에서 시험하였다. 약제 처리 후 4, 24, 48, 72, 96시간에 행동이상 및 치사 개체를 관찰하여 48시간 및 96시간의 반수치사약량(LD<sub>50</sub>)을 산출하였다.

꿀벌 급성섭식독성시험의 경우 활동성이 좋은 일벌을 통



**물벼룩 급성독성시험**

물벼룩 급성독성시험 기간 동안 측정된 온도, DO, pH의 평균값을 나타내었다(Table 1).

급성독성시험 결과, KR-0008의 100 mg/L 농도에서 24시간에는 유영저해 및 치사 개체는 나타나지 않았다. 48시간에서는 꼬리에 이물질이 부착된 개체 1마리가 관찰되었지만 유영저해 및 치사 개체는 관찰되지 않았다(Table 6). 이에 따라 물벼룩의 24시간 및 48시간의 EC<sub>50</sub>은 > 100 mg/L이었다(Table 7).

**지렁이 급성독성시험**

지렁이 급성독성시험 시작과 종료시점에 측정된 pH와 토양수분함량 값을 나타내었다(Table 8). 시험 시작과 종료시점에 지렁이의 무게를 측정하였으며, 시험 시작과 종료시점

의 체중변화율은 대조군에서 -3.7 ~ -0.9%이었고, 1,000 mg/kg에서 -3.4 ~ +1.8%이었다(Table 9).

급성독성시험 결과, KR-0008 처리농도 1,000 mg/kg에서 7일과 14일에 형태이상 및 치사 개체는 나타나지 않았다(Table 10). 이에 따라 지렁이의 7일 및 14일의 LC<sub>50</sub>은 > 1,000 mg/kg이었다(Table 11).

**꿀벌 급성독성시험**

꿀벌 급성접촉 및 섭식독성시험동안 측정된 온도와 습도를 나타내었다(Table 12).

급성접촉독성시험 결과, KR-0008 대조군 및 처리농도 100 µg/bee에서 72시간까지 행동이상 및 치사 개체는 관찰되지 않았다. 96시간에 대조군과 처리군에서 각각 1마리씩 치사 개체가 관찰되었다(Table 13). 급성섭식독성시험 결과,

**Table 6.** The mortalities and abnormalites of *D. magna* during the daphnia acute toxicity test of KR-0008

| Conc. (mg/L) | No. | Cumulative immobilized/dead daphnia |       |     |               |       |     |
|--------------|-----|-------------------------------------|-------|-----|---------------|-------|-----|
|              |     | 24 h                                |       |     | 48 h          |       |     |
|              |     | Symptom                             | Total | %   | Symptom       | Total | %   |
| Control      | 30  | N (30)                              | 0     | 0.0 | N (30)        | 0     | 0.0 |
| 100          | 30  | N (30)                              | 0     | 0.0 | N (29), S (1) | 0     | 0.0 |

N = Normal, S = Swimming with the test substance on the tail

**Table 7.** The EC<sub>50</sub> values of KR-0008 to *D. magna*

| Test substance | Test species    | Period (hour) | EC <sub>50</sub> (mg/L) |
|----------------|-----------------|---------------|-------------------------|
| KR-0008        | <i>D. magna</i> | 24            | > 100                   |
|                |                 | 48            | > 100                   |

**Table 8.** The values of pH and water content measured in the earthworm acute toxicity test

| Conc. (mg/kg) | pH                    |                   | Water content (%)     |                   |
|---------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
|               | Before the experiment | End of experiment | Before the experiment | End of experiment |
| Control       | 6.37 ± 0.08           | 6.27 ± 0.12       | 35.2                  | 35.8              |
| 1000          | 6.41 ± 0.04           | 6.23 ± 0.09       | 36.5                  | 37.0              |

**Table 9.** The mean body weight of *E. fetida* on day 0 and 14 of the earthworm acute toxicity test

| Treatment (mg/kg) | No. | 0 day      | 14 day     | Loss of body weight (mg) | Loss of body weight (%) |
|-------------------|-----|------------|------------|--------------------------|-------------------------|
| Control           | 10  | 417 ± 73.8 | 407 ± 62.9 | -10                      | -2.4                    |
|                   | 10  | 422 ± 63.1 | 409 ± 68.8 | -13                      | -3.1                    |
|                   | 10  | 423 ± 57.3 | 419 ± 59.4 | -4                       | -0.9                    |
|                   | 10  | 429 ± 29.5 | 413 ± 39.3 | -16                      | -3.7                    |
| 1000              | 10  | 388 ± 28.6 | 390 ± 34.6 | +2                       | +0.5                    |
|                   | 10  | 417 ± 40.3 | 404 ± 37.2 | -13                      | -3.1                    |
|                   | 10  | 435 ± 92.8 | 443 ± 93.7 | +8                       | +1.8                    |
|                   | 10  | 415 ± 50.8 | 401 ± 51.9 | -14                      | -3.4                    |

**Table 10.** The mortalities and symptoms of *E. fetida* during the earthworm acute toxicity test of KR-0008

| Conc.<br>(mg/kg) | No. | 7 day   |      | 14 day  |      |
|------------------|-----|---------|------|---------|------|
|                  |     | Symptom | Dead | Symptom | Dead |
| Control          | 40  | N (40)  | 0    | N (40)  | 0    |
| 1000             | 40  | N (40)  | 0    | N (40)  | 0    |

N = Normal

**Table 11.** The LC<sub>50</sub> values of KR-0008 to *E. fetida*

| Test substance | LC <sub>50</sub> (mg/dry soil kg) |        |
|----------------|-----------------------------------|--------|
|                | 7 day                             | 14 day |
| KR-0008        | > 1000                            | > 1000 |

**Table 12.** The values of temperature and humidity measured in the honeybee acute toxicity tests

| Test species        | Temperature (°C) | Humidity (%) |
|---------------------|------------------|--------------|
| <i>A. mellifera</i> | 24.4 ± 0.5       | 57.8 ± 0.75  |

**Table 13.** The mortalities and symptoms of *A. mellifera* during the honeybee acute contact toxicity test of KR-0008

| Dose<br>(µg/bee) | No. | Exposure time (hour) |             |             |             |             |
|------------------|-----|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                  |     | 4 h                  | 24 h        | 48 h        | 72 h        | 96 h        |
|                  |     | No. of dead          | No. of dead | No. of dead | No. of dead | No. of dead |
| Control          | 30  | 0                    | 0           | 0           | 0           | 1           |
| 100              | 30  | 0                    | 0           | 0           | 0           | 1           |

N = Normal, D = Dead

**Table 14.** The mortalities and symptoms of *A. mellifera* during the honeybee acute oral toxicity test of KR-0008

| Dose<br>(µg/bee) | No. | Exposure time (hour) |             |             |             |             |
|------------------|-----|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                  |     | 4 h                  | 24 h        | 48 h        | 72 h        | 96 h        |
|                  |     | No. of dead          | No. of dead | No. of dead | No. of dead | No. of dead |
| Control          | 30  | 0                    | 0           | 0           | 1           | 1           |
| 100              | 30  | 0                    | 0           | 0           | 1           | 2           |

N = Normal, D = Dead

**Table 15.** The LD<sub>50</sub> values of KR-0008 to *A. mellifera*

| Test substance | Contact<br>(LD <sub>50</sub> µg/bee) |       | Oral<br>(LD <sub>50</sub> µg/bee) |       |
|----------------|--------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
|                | 48 h                                 | 96 h  | 48 h                              | 96 h  |
|                | KR-0008                              | > 100 | > 100                             | > 100 |

KR-0008 대조군 및 처리군 100 µg/bee에서 48시간까지 행동이상 및 치사 개체가 관찰되지 않았다. 대조군에서 72시간에 1마리의 치사 개체가 관찰되었으며(Table 14), 처리군에서는 72시간에 치사 개체 1마리, 96시간에 1마리의 치사 개체가 추가로 관찰되었다. 이에 따라 48시간 및 96시간의 접촉 및 섭식독성 LD<sub>50</sub>은 > 100 µg/bee이었다(Table 15).

## 고 찰

본 연구에서는 친환경적으로 외래식물을 제거할 수 있는 천연 제초활성소재의 환경독성 스크리닝으로 제초활성소재인 KR-0008 배양여액에 대한 어류(송사리 및 잉어), 물벼룩, 지렁이 및 꿀벌 급성독성시험을 수행하였다.

어류를 이용한 급성독성시험 결과 송사리, 잉어 모두 48시간 및 96시간의  $LC_{50}$ 은  $> 100$  mg/L이었다. 물벼룩 급성독성시험 결과도 마찬가지로 24시간 및 48시간의  $EC_{50}$ 은  $> 100$  mg/L이었다. 미국 EPA에서 수서생물에 대한 독성 분류로 매우 고독성은  $LC_{50} < 0.1$  mg/L, 고독성은  $0.1 \leq LC_{50} \leq 1$  mg/L, 중간독성은  $1 < LC_{50} \leq 10$  mg/L, 저독성은  $10 < LC_{50} \leq 100$  mg/L, 마지막으로 무독성은  $LC_{50} > 100$  mg/L로 구분한다. 또한 화학물질 구분 기준인 GHS에서 수서환경유해성 분류로 수서생물에 대한 구분 1(급성 1)은  $LC_{50} \leq 1$  mg/L, 구분 2(급성 2)는  $1 < LC_{50} \leq 10$  mg/L, 구분 3(급성 3)은  $10 < LC_{50} \leq 100$  mg/L로 구분하게 되어있다. 이 기준에 어류 및 물벼룩 독성을 적용하면 EPA 기준으로는 무독성, GHS는 급성 구분에 대해 해당없음이다. 따라서, KR-0008은 어류 및 물벼룩에 대한 독성이 낮으며, 하천이나 호수에 노출이 되더라도 어류와 물벼룩에 급성적인 영향을 줄 가능성이 낮을 것으로 판단된다.

지렁이의 7일 및 14일의  $LC_{50}$ 은  $> 1,000$  mg/kg으로 한계 시험 농도인 1,000 mg/kg에서 형태이상 및 치사 개체가 관찰되지 않았다. 이에 따른 KR-0008의 독성은 낮을 것으로 나타났고, 산지나 농경지 및 비농경지에 노출되더라도 지렁이에 급성적인 영향을 줄 가능성이 낮을 것으로 판단된다.

꿀벌의 급성접촉 및 섭식독성시험 결과 48시간 및 96시간의  $LD_{50}$ 은  $> 100$   $\mu$ g/bee이었다. 미국 EPA에서 꿀벌에 대한 독성 분류로 고독성은  $LD_{50} < 2$   $\mu$ g/bee, 중간독성은  $2 \leq LD_{50} < 11$   $\mu$ g/bee, 무독성은  $LD_{50} \geq 11$   $\mu$ g/bee로 구분한다. 따라서 EPA 기준에 의하면 KR-0008은 무독성으로 꿀벌에 대한 독성이 낮은 것으로 나타났다.

기존 연구사례로 *Ascochyta caulina*에서 추출한 제초활성물질의 어류 96시간  $LC_{50}$ 은  $> 100$  mg/L이었으며, 물벼룩의 48시간  $EC_{50}$ 은 20.1 mg/L이었으며, 지렁이의 14일  $LC_{50}$ 은  $\geq 1,000$  mg/kg이었다(Fumagalli et al., 2013). 모기에 살충효과를 보이는 *Zanthoxylum monophyllum*의 추출물 essential oil은 어류 *Gambusia affinis*에 대해 48시간  $LC_{50}$ 으로 4,234.07  $\mu$ g/mL이었으며(Pavela and Govindarajan, 2017), 약용식물인 창포 *Artemisia absinthium*에서 추출한 살선충제 성분들은 물벼룩 24시간  $EC_{50}$ 으로 0.093~0.103 mg/L이었다(Pino-Otín et al., 2019). 살충 성분인 *Piper betle*의 추출물은 지렁이 *Eudrilus eugeniae*와 *Eisenia fetida* 2종에 대해 7일의  $LC_{50}$ 은 각각 3,149 mg/L, 4,081 mg/L이었으며(Vasanth-Srinivasan et al., 2018), 국화과에서 추출한 essential oil 두가지 성분의 꿀벌 24시간  $LD_{50}$ 은 197~252  $\mu$ g/bee이었다(Umpiérrez et al., 2017). 또한 식물 추출물로 짜임화이트, 라벤더, 마늘 추출액 등의 어류 96시간  $LC_{50}$ 은 3.0~10 mg/L, 물벼룩의 48시간  $EC_{50}$ 은 2.5~10 mg/L, 지렁이의 14일  $LC_{50}$ 은 149~743 mg/kg, 꿀벌의 48시간  $LD_{50}$ 은 44.3~115  $\mu$ g/bee이었다(You et al., 2011; You et al., 2012). 제초활성물질로

*Streptomyces scopuliridis*에서 추출한 herbicidin에 대한 어류의 96시간  $LC_{50}$  및 물벼룩의 48시간  $EC_{50}$ 은 모두  $> 100$  mg/L이었으며, 지렁이의 14일  $LC_{50}$ 은 1,000 mg/kg이었으며 꿀벌의 48시간  $LD_{50}$ 은  $> 100$   $\mu$ g/bee로 보고된 바 있다(Park et al., 2019). 본시험에서도 토양미생물 *Streptomyces achromogenes* 대사물질인 KR-0008 배양여액에 대한 어류 및 물벼룩의  $LC_{50}$  및  $EC_{50}$ 은  $> 100$  mg/L, 지렁이  $LC_{50}$ 은  $> 1,000$  mg/kg, 꿀벌  $LD_{50}$ 은  $> 100$   $\mu$ g/bee이므로 선행 연구와 비교하였을 때 천연제초물질로 환경생물에 안전한 것으로 판단된다.

시험결과 KR-0008은 어류(송사리 및 잉어), 물벼룩, 지렁이 그리고 꿀벌에 대해 급성 독성이 낮은 것으로 나타났다. 이에 따라 KR-0008은 환경생물에 안전한 천연제초활성물질로 강이나 호수 또한 비농경지에 발생하는 외래 잡초에 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 KR-0008이 생활주변에서 생태계 교란 식물 및 외래 잡초 제거를 위해 사용할 수 있도록 인축독성에 대한 안전성 평가도 필요할 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 ‘토양 미생물 기반 제초활성소재 인축 및 환경독성평가’(과제번호: PJ01612802)의 지원으로 이루어진 것입니다.

## 이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

## Author Information and Contribution

Chang-Young Yoon, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, Investigation, data analysis & writing-original draft preparation, <https://orcid.org/0000-0001-7220-5425>

Kyongmi Chon, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Data analysis, writing-review & editing, <https://orcid.org/0000-0003-2143-2614>

Jun-Hyoung Bang, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Master, Investigation, <https://orcid.org/0000-0002-2232-6330>

Jeong-Hyun Lim, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of

Philosophy, Project administration, <https://orcid.org/0000-0003-4524-9689>

Jin-A Oh, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Supervision, <https://orcid.org/0000-0002-1166-4377>

Bala Murali Krishna Vasamsetti Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Writing-review & editing, <https://orcid.org/0000-0001-5529-418X>

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

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

## Literature Cited

- Choi JS, 2017. Strategy for control of invasive alien weeds based on secondary metabolite(s) from a natural substance. *Weed Turf. Sci.* 37(2):10-12. (In Korean)
- Duke SO, Evidente A, Fiore M, Rimando AM, Dayan FE, et al., 2011. Effects of the aglycone of ascaulitoxin on amino acid metabolism in *Lemna paucicostata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100(1):41-50.
- EPA (2012) Ecological Effects Test Guidelines; OCSPP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test.
- EPA (2016a) Ecological Effects Test Guidelines; OCSPP 850.1075: Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test.
- EPA (2016b) Ecological Effects Test Guidelines; OCSPP 850.1010: Acute Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- Feng G, Chen M, Ye HC, Zhang ZK, Li H, et al., 2019. Herbicidal activities of compounds isolated from the medicinal plant *Piper sarmentosum*. *Ind. Crops Prod.* 132: 41-47.
- Fumagalli P, Andolfi A, Avolio F, Boari A, Cimmino A, et al., 2013. Ecotoxicological characterisation of a mycoherbicide mixture isolated from the fungus *Ascochyta caulina*. *Pest. Manag. Sci.* 69(7):850-856.
- Irvine NM, Yerkes CN, Graupner PR, Roberts RE, Hahn DR, et al., 2008. Synthesis and characterization of synthetic analogs of cinnacidin, a novel phytotoxin from *Nectria* sp. *Pest. Manag. Sci.: formerly Pesticide Science.* 64(9):891-899.
- Kim DE, 2018. Management system of invasive alien species threatening biodiversity in Korea and suggestions for the improvement. *J. Environ. Impact Assess.* 27(1):33-55. (In Korean)
- Kim JD, Kim YS, Jang KS, Lim HK, Park KW, et al., 2021. Herbicidal activity of KRA16-334 broth filtrate against ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Turf. Sci.* 10(3): 309-318. (In Korean)
- Ministry of Environment (ME), 2019. Act on the Conservation and Use of Biological Diversity, Sejong, Korea. (In Korean)
- National Institute of Ecology (NIE), 2020. List of exotic organisms and ecological characteristics in Korea. <https://www.data.go.kr/data/15012927/fileData.do> (Accessed Sep. 23. 2020).
- National Institute of Environmental Research (NIER), 2022. Standard for water pollution process test. <https://www.law.go.kr/admRuIsc.do?menuId=5&subMenuId=41&tabMenuId=183&query=#liBgcolor4> (Accessed Feb. 21.2022).
- OECD (1984) OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests.
- OECD (1998a) OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test.
- OECD (1998b) OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test.
- OECD (2004) OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test.
- OECD (2019) OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 203: Fish Acute Toxicity Test.
- 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)
- Pavela R, Govindarajan M, 2017. The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *J. Pest Sci.* 90(1):369-378.
- Pino-Otín MR, Ballester D, Navarro E, González-Coloma A, Val J, et al., 2019. Ecotoxicity of a novel biopesticide from *Artemisia absinthium* on non-target aquatic organisms. *Chemosphere.* 216:131-146.
- Posada L, Rey L, Villalba J, Colombo S, Aubriot L, et al., 2022. Cyclopeptides natural products as herbicides and inhibitors of cyanobacteria: Synthesis of versicotides E and F. *ChemistrySelect.* 7(27):e202201956. <https://doi.org/10.1002/slct.202201956>
- Rural Development Administration (RDA), 2021a. Registration status of biopesticides. [https://www.rda.go.kr/board/board.do?boardId=openinfoboard&prgId=opp\\_openinfoboard&menu\\_id=opp&currPage=1&dataNo=100000769280](https://www.rda.go.kr/board/board.do?boardId=openinfoboard&prgId=opp_openinfoboard&menu_id=opp&currPage=1&dataNo=100000769280)



- &mode=updateCnt&searchKey=subject&searchVal=%EB%86%8D%EC%95%BD (Accessed Feb. 05. 2021).
- Rural Development Administration (RDA), 2021b. Pesticide Control Act. Wanju, Korea. (In Korean)
- Rural Development Administration (RDA), 2022. Registration status of pesticides. [https://www.rda.go.kr/board/board.do?boardId=openinfoboard&prgId=opp\\_openinfoboard&menu\\_id=opp&currPage=1&dataNo=100000769280&mode=updateCnt&searchKey=subject&searchVal=%EB%86%8D%EC%95%BD](https://www.rda.go.kr/board/board.do?boardId=openinfoboard&prgId=opp_openinfoboard&menu_id=opp&currPage=1&dataNo=100000769280&mode=updateCnt&searchKey=subject&searchVal=%EB%86%8D%EC%95%BD) (Accessed Jan. 13. 2022).
- Umpiérrez ML, Paullier J, Porrini M, Garrido M, Santos E, et al., 2017. Potential botanical pesticides from Asteraceae essential oils for tomato production: Activity against whiteflies, plants and bees. *Ind. Crops Prod.* 109:686-692.
- Vasanth-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Ponsankar A, Thanigaivel A, Chellappandian M, et al., 2018. Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). *Environ Sci Pollut Res.* 25(11): 10371-10382.
- 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)
- Yoo JY, Jang EJ, Park SY, Son HJ, 2018. Production of HCN, weed control substance, by *Pseudomonas koreensis* and its plant growth-promoting and termiticidal activities. *J. Environ. Sci.* 27(9):771-780. (In Korean)
- You AS, Choi YW, Jeong MH, Hong SS, Park YK, et al., 2011. Acute ecotoxicity evaluation of thyme white, clove bud, cassia, lavender, lemon eucalyptus essential oil of plant extracts. *Korean. J. Pestic. Sci.* 15(4): 350-356. (In Korean)
- You AS, Hong SS, Jeong MH, Park KH, Chang HS, et al., 2012. Acute ecotoxicity evaluation of 3 emulsifiable concentrates containing garlic extract, *Zanthoxylum* extract, and lemon grass oil originated from plant. *Korean. J. Pestic. Sci.* 16(4):376-382. (In Korean)

## 천연 제초활성물질 KR-0008 배양여액의 환경생물 급성독성

윤창영 · 전경미\* · 방준형 · 임정현 · 오진아 · Bala Murali Krishna Vasamsetti · 최정섭<sup>1</sup> · 김영숙<sup>1</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과, <sup>1</sup>한국화학연구원 친환경물질연구센터

**요약** 산업화와 국가간의 교류 증가로 국내에 유입된 외래식물은 생물다양성을 위협하고 경제적인 피해를 주고 있다. 이런 외래식물들은 하천, 산지 및 생활환경 주변 등에 이미 넓게 분포하고 있기에 외래식물 제거를 위해 농약을 살포할 경우 사람과 환경에 대한 독성평가를 통하여 위해성평가가 이루어져야 한다. 따라서 외래식물을 효과적으로 제거하면서 기존의 유기합성 제초제보다 안전하고 친환경적인 제초제 개발이 필요하다. 이에 한국화학연구원에서 토양 미생물 기반의 후보소재인 KR-0008을 선발하였으며 일부 외래식물에 대해 방제효과를 확인하였다. 이 후보 소재인 KR-0008에 대한 환경독성 기초 연구로 어류, 물벼룩, 지렁이 및 꿀벌에 대한 급성독성시험을 진행하였다. 잉어와 송사리를 이용한 어류 급성독성시험 결과 48시간 및 96시간의 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 > 100 mg/L이었다. 물벼룩 급성독성시험 결과 마찬가지로 24시간 및 48시간의 반수영향농도(EC<sub>50</sub>)는 > 100 mg/L이었다. 지렁이 급성독성시험으로는 지렁이의 7일 및 14일 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 > 1,000 mg/kg이었다. 꿀벌의 경우, 급성 접촉 및 섭식독성시험 결과 48시간 및 96시간의 반수치사약량(LD<sub>50</sub>)은 > 100 µg/bee이었다. 결론적으로 KR-0008의 어류, 물벼룩, 지렁이 및 꿀벌에 대한 급성 독성은 낮은 것으로 판단된다.

**색인어** 물벼룩, 지렁이, 어류, 꿀벌, KR-0008