

식물추출물 마늘 추출액, 잔톡실럼 정유, 레몬그라스 정유 함유 유제 3종의 생태독성평가

유아선* · 홍순성 · 정미혜 · 박경훈 · 장희섭 · 이재봉 · 박재음

국립농업과학원 농산물안전성부

(Received on October 11, 2012. Revised on November 1, 2012. Accepted on November 16, 2012)

Acute Ecotoxicity Evaluation of 3 Emulsifiable Concentrates Containing Garlic Extract, Zanthoxylum Extract, and Lemon Grass Oil Originated from Plant

Are-Sun You, Mihye Jeong, Soon-Sung Hong, Kyung-Hun Park, Hee-Seop Chang, Je Bong Lee and Jae-Yup Park

Department of Agro-food Safety, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea

Abstract Environment-friendly agro-materials are likely to be preferred to chemical insecticides recently. For this reason, many studies are conducted to develop environment-friendly insecticides containing natural materials. This study was also conducted so as to assess ecotoxicity for Emulsifiable concentrate (EC) containing 30% of garlic extract or two plant essential oils (Zanthoxylum, Lemongrass) expected to prevent from pests and be used for agro-materials. Target species used to assess acute toxicity were invertebrate (*Daphnia magna*), fish (*Oryzias latipes*), honeybee (*Apis mellifera* L.) and earthworm (*Eisenia fetida*). The EC₅₀ values for of garlic extract 30% EC, Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC to *Daphnia magna* were 3.3, 10, and 10 mg L⁻¹, respectively. The category of garlic extract 30% EC was moderately toxic, while those of Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC were slightly toxic according to standard of USEPA. EC₅₀ for both of Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC were more than 10 mg L⁻¹ then they were considered as slightly toxicity. In case of acute toxicity test to fish, LC₅₀ of garlic extract 30% EC was 3.3 mg L⁻¹. Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC indicated LC₅₀ > 10 mg L⁻¹. Classification of acute toxicity to all test substances was in Korea criteria. Acute contact and oral toxicity test to Honeybee were conducted. As a result, LD₅₀ of all test substances were more than 100 a.i. µg bee⁻¹ in the acute contact test while LD₅₀ of garlic extract 30% EC was 4.4 a.i. µg bee⁻¹ and LD₅₀ of Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC were more than 100 a.i. µg bee⁻¹. In case of acute toxicity test to earthworm, LC₅₀ of garlic extract 30% EC, Zanthoxylum oil 30% EC and lemongrass oil 30% EC were 267, 592, and 430 mg kg⁻¹, respectively. In conclusion, if the safety for earthworm is confirmed, these substances are expected to be use for environment-friendly insecticide materials with low risk against ecosystem and contribute to developing environment-friendly agro-materials.

Key words Plant Essential Oils, Ecotoxicity

서론

화학합성 살충제의 오남용으로 인한 환경오염문제와 더불어

어 국민들의 삶의 질 향상으로 환경 친화적인 농약과 안전한 농산물에 대한 관심이 증대되고 있다(유, 2011). 먹거리 안전에 대한 소비자의 관심이 날로 높아지면서 유기농 제품을 선호하는가 하면 환경을 보호하는 제품에 대한 욕구가 늘어나고 있어 농산물을 생산하는 과정에서 사용하는 농약에 대하여 천연물질을 함유한 친환경 살충제의 개발들이 이루어지고 있다. 그런 이유로 광범위한 살충효과를 보이며

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-0594, Fax: +82-31-290-0508

E-mail: aresun@korea.kr

환경에는 큰 영향을 주지 않는 친환경자재를 탐색하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(Saxena, 1989). 그 중 식물추출물을 이용한 친환경 작물보호제는 살충제, 곤충기피제 및 십식저해제로서 성공적으로 개발 및 이용되어지고 있으며 (Schmutterer, 1980), 식물추출 화합물은 다양한 생물활성물질을 함유하고 있고(Wink, 1993), 포유류인 사람과 가축에는 거의 해가 없기 때문에 친환경 농업에서는 새로운 해충방제 자재로 인식되고 있다(Arnason 등, 1989). Pyrethrin이나 rotenone과 같은 식물체 유래 살충 물질들은 160여 년 전부터 상업화되어 이용되고(Isman, 1999), 님(neem) 유래 식물살충제는 세계 39개국에서 150종 이상의 제품이 생산되고 있다(Koul, 2004).

마늘의 대표적 성분인 allicin은 항균(Leuter 등, 1996) 및 약물내성균 제거(Gupta 등, 2010), 항바이러스(Weber 등, 1992), 항진균(Mahmoudabadi 등, 2009, Kim 등 2004), 기생충 제거 효과(Dkhil 등, 2011)가 있다고 보고되었다. 또한 마늘에서 추출한 polysulfide를 함유한 제품이 영국과 EU에서는 선충 및 해충 제거 효과가 있다고 알려져 있다(Anwar 등, 2009). 잔톡실림(Zanthoxylum)은 초피나무로서 열매의 추출물은 유충제거 효과가 있다고 알려져 있다(Tiway 등, 2007). 또한, 살충 및 항진균 효과가 있다고 알려져 있는데 각 strain별로 효과가 있는 해충과 곰팡이에 대한 연구가 보고되었다(Owusu 등, 2007; Gómez 등, 2007; Bafi-Yeboa 등, 2005). 레몬그라스의 주요성분인 citral(Zhu 등, 2001)는 65-85%가 레몬그라스에 함유되어 있으며(Fenaroli 등, 2004; Lawless, 2002) 강한 항균효과와 해충에 페로몬 효과가 있다고 알려져 있다(Kuwahara 등, 1983; Robacker 등, 1977). 이러한 식물유래 추출물을 이용한 친환경 농자재 제품개발에 앞서 식물추출물의 환경생물에 대한 영향을 평가함으로써 제품으로 활용가능성을 알아볼 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 마늘추출액, 잔톡실림 정유, 레몬그라스 정유를 함유한 유제의 수서생물과 육상생물에 대한 급성독성시험을 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

시험에 사용된 시료는 마늘추출액 정유(30%), 잔톡실림 정유(30%), 레몬그라스 정유(30%)가 각각 함유된 유제로 (주)내츄로바이오텍(전남 장흥군 안양면 기산리)으로부터 제공받아 사용하였다.

식물추출물의 물벼룩에 대한 독성평가

시험생물

물벼룩 급성독성 시험에 사용된 물벼룩(*Daphnia magna*)

은 국립농업과학원 농자재평가과에서 계대 사육하고 있는 물벼룩을 사용하였다. 사육조건은 수온이 20 ± 1 , 광조건 16 시간, 암조건 8시간으로 하였으며 물벼룩 먹이로는 순수배양 시킨 녹조류(*Chlorella vulgaris*)를 $1 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ cells mL⁻¹의 농도로 공급하였다. 물벼룩 사육수(M4)는 인공으로 조제하여 사용하였다(OECD, 2011).

물벼룩 급성 유영저해시험

식물추출물의 물벼룩에 대한 급성유영저해시험은 우리나라의 농약등록 시험기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에 준하여 시험하였다. 시험에 사용한 물벼룩은 생후 24시간미만의 건강한 어린개체를 채집하여 사용하였다. 시험방법은 125 mL 원형 유리 비이커에 사육수 100 mL을 채운 후 농도별로 아세톤(acetone)에 희석 조제한 시험용액을 처리하고 대조군에는 용매인 아세톤을 처리하여 각 수조에 물벼룩을 10 마리씩 3반복으로 하여 시험농도 당 총 30마리의 물벼룩을 사용하였다. 노출방식은 지수식(static)으로 하였으며 노출시간은 48시간이었다. 수온은 대조군에서 매일 측정하였고 광조건은 16시간, 암조건은 8시간으로 하였다. 시험기간 중에는 산소와 먹이는 공급하지 않았다. 시험시작 후 24시간과 48시간에 치사 또는 유영저해(immobilisation)를 받은 개체와 이상증상을 관찰하였다. 유영저해의 판정은 유리막대로 시험수를 시계방향으로 1~2회 저어준 후 약 15초간 관찰하여 움직이지 않거나 정상적인 유영을 하지 못하는 개체는 영향을 받은 것으로 간주하였고, 독성증상은 육안으로 관찰하여 기록하였다. 시험기간 동안 시험용액의 pH는 시험시작 전과 종료 시에 측정하였다(유 등, 2010). 처리전 및 48 시간 후 수질 pH 변화를 측정한 결과, 마늘추출액 30% 유제의 pH는 7.9~8.0, 잔톡실림 30% 유제에서는 pH 7.7~8.0, 레몬그라스 정유 30%에서는 pH 7.4~7.9였다.

식물추출물의 어류에 대한 독성평가

시험생물

담수어류 급성독성시험에 사용한 시험어종은 송사리(*Oryzias latipes*)로서 국립농업과학원 농자재평가과에서 실내 계대 사육중인 송사리를 사용하였으며, 개체 중 전장 2~3 cm의 건강하고 균일한 개체를 사용하였다.

어류 급성독성시험

식물추출물의 어류에 대한 급성독성시험은 우리나라의 농약 등록시험 기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에 준하여 시험하였다. 6 L 원형 유리수조(직경 20개 × 26 cm)에 농도별 시험용액 5 L를 채우고 농도별로 아세톤(acetone)에 희석 조제한 시험용액을 처리하였다. 대조군에는 용매인 아세톤을 처리시험농도당 10마리(암5:수5)씩 반복 없이 넣은 후 시험기간 동안 시험용액을 교체하지 않는 지수식(static)으로 시험

하였다. 시험기간 동안 먹이와 산소는 공급하지 않았으며, 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광주조건 16시간, 암조건 8시간으로 유지하였다. 시험시작 후 4시간 및 24시간 마다 치사율 및 독성증상을 관찰하여 기록하였고 치사한 개체는 발견 즉시 제거하였다. 시험기간 동안 시험용액의 pH는 24시간마다 모든 농도에서 측정하였으며 수온은 대조군에서만 측정하였다(유 등, 2012). pH 변화를 측정한 결과, 마늘추출액 30% 유제의 pH는 7.2~8.0, 잔독실림 30% 유제에서는 pH 7.5~7.9, 레몬그라스 정유 30%에서는 pH 7.5~7.9였다.

식물추출물의 꿀벌에 대한 독성평가

시험생물

급성독성시험에 사용한 시험종은 서양종 황색 꿀벌(*Apis mellifera* L.)로서 농업과학기술원 농자재평가과에서 관리하는 봉군에서 건강한 일벌을 채집하여 사용하였다.

꿀벌 급성접촉독성시험

식물추출물의 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험은 우리나라의 농약 등록시험 기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에 준하여 시험하였다.

벌통에서 채집한 건강한 일벌을 마취통(가로 $28 \times$ 세로 $28 \times$ 높이 23 cm^3)에 담아 CO_2 가스로 마취한 다음 5농도 3 반복으로 미리 준비한 원통형 스테인리스망 케이지(직경 $50 \times 150 \text{ mm}$)에 순차적으로 10마리씩 넣은 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 암조건에 3시간동안 두어 회복시킨 다음 시험에 사용하였다. 마취에서 깨어난 케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 다시 CO_2 가스로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고 각 꿀벌의 흉부에 농도별로 아세톤(Acetone)을 이용하여 희석 조절된 시험용액 $1 \mu\text{L}$ 를 미량국소처리주사기를 사용하여 처리하였으며 대조군에는 용매로 사용된 아세톤을 처리하였다. 약제 처리를 끝낸 꿀벌은 다시 케이지에 옮겨 담고 50% 자당용액 2 mL을 넣은 유리 급식관을 스펀지마개에 꽂아 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 습도 50~70%의 암실에 두면서 4시간 및 24시간과 48시간의 꿀벌 치사 및 이상증상을 관찰하였다(유 등, 2011).

꿀벌 급성섭식독성시험

식물추출물의 꿀벌에 대한 급성섭식독성시험은 우리나라의 농약 등록시험 기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에 준하여 시험하였다.

접촉독성과 동일한 방법으로 채집한 꿀벌을 원통형 스테인리스망케이지에 넣고 50% 자당용액에 증류수에 희석한 시험물질을 혼합하여 농도별로 조절된 시험용액을 사용하였고, 대조군에는 50% 자당용액을 이용하여 유리급식관에 0.2 mL씩 넣어 케이지 마개에 꽂아두고 4시간 후에 관찰하여 전량 섭취한 케이지에는 50% 자당용액으로 교체하고 섭

취가 끝나지 않은 케이지는 6시간까지 관찰한 뒤 새로운 50% 자당용액으로 교체한다. 실험 케이지는 암실에 두면서 24시간과 48시간의 꿀벌 치사율 및 이상증상을 관찰하였으며 시험용액의 섭취량은 시험시작 전과 종료 후에 기록하였다(유 등, 2011).

식물추출물의 지렁이에 대한 독성평가

시험생물

급성독성시험에 사용한 시험종은 줄지렁이(*Eisenia fetida*)로서 농업과학기술원 농자재평가과 생태독성 실험실에서 사육중인 지렁이 중 코균에서 부화하여 2개월 이상 성숙하고, 무게가 300~600 mg 정도의 건강하고 균일한 개체를 사용하였다.

인공토양 조제

인공토양은 sphagnum peat와 kaolin clay 및 산업용 모래를 각각 1:2:7의 비율로 500 g이 되게 조제하였다. sphagnum peat는 pH 5.5~6.0인 식물이 남아있지 않는 분말상으로 건조된 것 과 kaolin clay는 kaolinite 함량이 30% 이상인 것 그리고 산업용 모래는 입경이 50~200 μm 이고 함량이 50% 이상인 것을 시중에서 구입하여 사용하였다. 인공토양의 pH는 6.0 ± 0.5 가 되도록 CaCO_3 를 일정량 첨가하여 소형 믹서기를 이용하여 잘 혼합한 후 시험에 사용하였다(유 등, 2011).

지렁이 급성독성시험

식물추출물의 지렁이에 대한 급성독성시험은 우리나라의 농약 등록시험 기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에 준하여 시험하였다. 시험방법은 2L 유리수조(직경 $20 \times 26 \text{ cm}$)에 조제된 인공토양 500 g을 넣고 아세톤(acetone)에 희석 조절된 농도별 시험용액을 미리 덜어낸 인공토양 10 g에 뿌린 뒤 흡후드에서 아세톤을 날아갈 때까지 방치한 후 인공토양과 혼합하고 증류수 175 mL을 첨가하여 최종 수분함량이 40%가 되게 하였다. 대조군에는 용매로 사용한 아세톤을 처리하였다. 시험조건으로 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 광(光)은 400~800 Lux가 되도록 형광등을 사용하여 시험기간 내내 조사(照射)하였다. 시험물질을 농도별로 처리한 인공토양이 담긴 시험용기에 10마리씩 반복 없이 지렁이를 투입하고 통풍이 원활하게 만든 뚜껑을 덮고 Parafilm으로 감아 시험을 실시했다. 약제처리 후 7일과 14일에 형태이상, 행동변화, 치사 등을 관찰하였으며 인공토양의 pH 및 지렁이의 체중은 시험전과 시험 종료 후에 측정하였다(유 등, 2011).

통계처리

시험결과는 probit(EPA version 1.5)법을 이용하여 EC_{50} , LC_{50} , LD_{50} 값과 95% 신뢰한계를 구하였다.

결과 및 고찰

물벼룩 급성독성

식물추출물 마늘 추출액, 잔톡실럼(Zanthoxylum) 정유, 레몬그라스 정유 함유 유제에 대한 물벼룩급성유영저해시험의 기초시험을 실시한 결과, 대조군에서는 치사 및 유영저해가 나타나지 않았다. 잔톡실럼(Zanthoxylum) 정유 함유 유제는 기초시험 농도 10 mg L⁻¹에서 치사 및 유영저해가 나타나지 않았고 레몬그라스 정유 함유 유제는 7%의 치사 및 유영저해가 나타나 EC₅₀는 두 시험물질 모두 10 mg L⁻¹ 이상이었다. 그러나 마늘추출액 함유 유제는 93%의 치사 및 유영저해를 보여 예비시험과 본시험을 실시하였다. 예비시험의 농도 0.5, 1.0, 5, 15 mg L⁻¹에서 각각 0, 0, 73, 100%의 치사 및 유영저해가 나타났으며 이를 근거로 본시험의 농도는 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 mg L⁻¹로 설정하였으며 각각 0, 17, 73, 90, 100%의 치사 및 유영저해가 나타났다. Table 1에서 보는 바와 같이 마늘 추출액, 잔톡실럼(Zanthoxylum) 정유, 레몬그라스 정유 함유 유제에 대한 시험 결과, 24시간 EC₅₀ 값은 각각 8.9, > 10, > 10 mg L⁻¹이었고, 48시간 EC₅₀ 값은 3.3, > 10, > 10 mg L⁻¹로 나타났다.

USEPA(2012)의 담수무척추동물 독성기준을 보면, 매우 강한 독성(very highly toxic) < 0.1 mg L⁻¹, 강한 독성(highly toxic) 0.1~1 mg L⁻¹, 보통 독성(moderately toxic) > 1~10 mg L⁻¹, 약한 독성(weakly toxic) > 10~100 mg L⁻¹, 거의 독성 없음(practically non-toxic) > 100 mg L⁻¹으로 구분되어 있다. 마늘 추출액 함유 유제의 경우 보통독성의 정도를 보였고, 몇몇 개체가 수면에 뜨는 유영이상이 관찰되었다. 잔톡실럼(Zanthoxylum) 정유 함유 유제와 레몬그라스 정유 함유 유제의 48시간 EC₅₀ 값은 모기유충에 효과가 있는 미나리과 추출물인 캐러웨이(EC₅₀ = 12.15 mg L⁻¹), 달(EC₅₀ = 13.06 mg L⁻¹)(Park, 2010)와 같이 10 mg L⁻¹ 이상으로 낮은 독성이 나타났으며 유영이상 증상을 보이지 않았다.

송사리 급성독성

송사리 급성독성시험의 결과 대조군에서는 치사가 나타나지 않았고 잔톡실럼(Zanthoxylum) 정유 함유 유제와 레몬

Table 1. Result of acute toxicity of test materials to *Daphnia magna*

Test materials	EC ₅₀ , mg L ⁻¹	
	24 h	48 h
Garlic extract(30%) EC	8.9 (7.4~11.1) ^{a)}	3.3 (2.8~3.9) ^{a)}
Zanthoxylum(30%) EC	> 10	> 10
Lemon grass(30%) EC	> 10	> 10

^{a)}95% confidence limits.

Table 2. Result of acute toxicity of test materials to Medaka(*Oryzias latipes*)

Test materials	LC ₅₀ , mg L ⁻¹	
	48 h	96 h
Garlic extract(30%) EC	4.3 (3.4~5.1) ^{a)}	3.0 (2.6~3.6) ^{a)}
Zanthoxylum(30%) EC	> 10	> 10
Lemon grass(30%) EC	> 10	> 10

^{a)}95% confidence limits.

그라스 정유 함유 유제는 기초시험 농도 10 mg L⁻¹에서 치사가 나타나지 않아 반수치사농도(LC₅₀)는 10 mg L⁻¹ 이상이었다. 마늘 추출액 함유 유제는 10 mg L⁻¹에서 모든 개체가 치사하여 예비시험과 본시험을 실시하였다. 예비시험의 처리 농도는 0.1, 1, 5 mg L⁻¹이었고 각각 0, 0, 100%의 치사율을 나타냈으며 5 mg L⁻¹의 투여 24시간 후 관찰 시 생존 개체가 어두운 회색을 띠었고 48시간에 생존한 한 마리도 어두운 회색을 띠었다. 본시험에서 1.0, 1.5, 2.3, 3.4, 5.1 mg L⁻¹의 농도를 처리하여 치사율을 관찰하였는데 각각 0, 0, 10, 70, 100%의 치사율을 나타냈고 2.35 mg L⁻¹ 투여군에서 48시간과 72시간에 한 마리가 유영저해를 나타냈다. 마늘 추출액 함유 유제의 LC₅₀는 48시간에서 4.3 mg L⁻¹, 96시간에서 3.0 mg L⁻¹로 나타났다(Table 2). 이 결과는 제충국의 살충 성분인 피레스린을 모태로 하고 있는 피레스로이드(pyrethroid)계 농약인 esfenvalerate(LC₅₀ 9.4 L⁻¹)(Werner 등, 2002)보다 1/300배 차이의 독성을 보였다. 국내 농약관리법에서는 어독성 구분을 위한 시험어종으로 잉어를 사용하도록 명시하였는데(농촌진흥청, 2012) 송사리는 국제적으로 사용되는 시험어종이며 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청, 2012)에서 담수어류급성독성시험의 시험어종으로 명시되어 있어 등록신청을 위한 시험이 아닌 독성경향을 관찰하는 본 시험에 사용할 수 있었다. 또한, 식물추출물 함유 유제에 대한 어류의 반수치사농도는 2 mg L⁻¹ 이상임으로 농촌진흥청 고시에 따라 급 농약으로 구분할 수 있었고(농촌진흥청, 2012), 친환경 육성법농촌진흥청, 2011)에 따라 친환경농자재 기준에 부합하는 것으로 나타났다.

꿀벌 급성섭식 및 급성접촉독성

꿀벌 급성독성시험에서 접촉 시험에 대한 기초시험을 실시한 결과 100 a.i. µg bee⁻¹ 약량의 마늘추출액 함유유제와 레몬그라스 정유 함유 유제에서는 치사 개체가 나타나지 않았고 잔톡실럼(Zanthoxylum)정유 함유 유제에서는 3%의 치사율이 나타나 시험물질 모두 10%미만의 치사율을 보여 꿀벌에 대한 급성접촉독성의 LD₅₀는 100 a.i. µg bee⁻¹ 이상이었다. 꿀벌에 대한 급성섭식독성 결과, 100 a.i. µg bee⁻¹ 약량에서 마늘 추출액 함유 유제의 섭식독성 시험을 제외한

Table 3. Result of acute toxicity of test materials to honeybee(*Apis mellifera* L.)

Test materials	Contact toxicity (a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$)		Oral toxicity (a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$)	
	24 h-LD ₅₀	48 h-LD ₅₀	24 h-LD ₅₀	48 h-LD ₅₀
	Garlic extract (30%) EC	> 100	> 100	49.6
Zanthoxylum (30%) EC	> 100	> 100	> 100	> 100
Lemon grass (30%) EC	> 100	> 100	> 100	> 100

잔토실럼(*Zanthoxylum*) 정유 함유 유제와 레몬그라스 정유 함유 유제에서 치사율이 각각 0, 7%로 10% 미만으로 나타나(농촌진흥청, 2012) LD₅₀는 100 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 이상이었다. 마늘 추출액 함유 유제는 섭식독성의 기초시험에서 100%의 치사율을 보여 예비시험과 본시험을 실시하였다. 예비시험에서 10, 25, 50, 100 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 처리농도에서 투여 후 24시간에 각각 0, 3, 43, 97%, 48시간에 0, 7, 50, 100%의 치사율이 관찰되었으며 이상증상은 나타나지 않았다. 본 시험에서 10, 20, 40, 80, 160 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 의 농도를 처리한 결과, 투여 후 24시간에 각각 0, 0, 37, 83, 100%, 48시간에 0, 0, 43, 93, 100%의 치사율이 관찰되었고 이상증상은 나타나지 않았다. 24시간과 48시간의 LD₅₀ 값이 각각 49.6, 44.3 a.i. $\mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났다. 시험기간 동안 대조군에서는 치사개체가 나타나지 않았다.

따라서, 마늘 추출액 함유 유제를 제외한 잔토실럼(*Zanthoxylum*) 정유 함유 유제와 레몬그라스 정유 함유 유제의 모든 꿀벌급성독성 시험의 LD₅₀ 값이 100 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 이상임을 알 수 있다(Table 3). USEPA(2006)의 꿀벌 급성독성의 분류는 LD₅₀ 값에 따라 강한 독성(highly toxic) < 2, 보통 독성(moderately toxic) 2~11 거의 독성 없음(practically nontoxic) > 11으로 LD₅₀ 값이 11 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 이상일 경우 거의 독성이 없음으로 구분하기 때문에 식물추출물 및 정유 함유 유제에 대한 꿀벌의 독성이 낮은 것으로 사료되었다. 친환경 육성법의 꿀벌접촉독성 기준(농촌진흥청, 2011)은 LD₅₀ 값이 11 a.i. $\mu\text{g bee}^{-1}$ 이상일 경우 적합하므로 친환경 농자재로 활용 가능성이 높았다. 제품의 희석배수, 살포물량, 노출평가를 고려하여 위해성이 낮은 경우 친환경농자재로서 활용할 수 있다고 사료되었다.

지렁이 급성독성

지렁이 급성독성 결과, 기초시험에서 1,000 mg kg⁻¹을 처리한 결과, 14일 노출기간 동안 모든 시험물질에서 100% 치사하여 3종 모두 예비시험과 본시험을 실시하였다. 예비시험에서 시험물질 3종을 각각 10, 100, 500 mg kg⁻¹으로 처리하였으며 마늘추출액 함유 유제와 레몬그라스 정유 함

Table 4. Result of acute toxicity of test materials to earthworm(*Eisenia fetida*)

Test materials	LC ₅₀ , mg kg ⁻¹	
	7 days	14 days
	Garlic extract(30%) EC	267(200~355) ^{a)}
Zanthoxylum(30%) EC	592(514~653) ^{a)}	592(514~653) ^{a)}
Lemon grass(30%) EC	430(349~533) ^{a)}	430(349~533) ^{a)}

^{a)}95% confidence limits.

유 유제 500 mg kg⁻¹에서 7일에 각각 10, 40%, 14일에 각각 40, 60%의 치사율이 나타났으며 잔토실럼(*Zanthoxylum*) 정유 함유 유제에서는 치사한 개체가 관찰되지 않았다. 본시험에서 마늘 추출액 함유 유제는 100, 180, 320, 580, 1050 mg kg⁻¹으로 처리하였으며 각각 7일과 14일에 0, 40, 40, 100, 100%의 치사율이 나타났다. 잔토실럼(*Zanthoxylum*) 정유 함유 유제는 500, 600, 720, 860, 1040 mg kg⁻¹으로 처리하였으며 각각 7일과 14일에 30, 40, 70, 100, 100%의 치사율이 나타났다. 레몬그라스 정유 함유 유제는 100, 180, 320, 580, 1050 mg kg⁻¹으로 처리하였으며 각각 7일과 14일에 0, 0, 10, 90, 100% 치사율이 나타났다. 그 결과 마늘 추출액, 잔토실럼(*Zanthoxylum*) 정유, 레몬그라스 정유 함유 유제의 LC₅₀ 값은 각각 267, 592, 430 mg kg⁻¹ 이었고(Table 4), 시험기간 동안 대조군에서는 치사개체가 나타나지 않았다. 시험을 실시한 시험물질 모두 7일 이후 치사가 발생하지 않아 7일과 14일의 LC₅₀ 값이 동일하였다. 모든 시험물질에서 지렁이 급성독성의 LC₅₀ 값이 기초시험 농도인 1,000 mg kg⁻¹ 미만으로 나타났는데 농약의 경우 제품 희석배수, 살포물량, 노출량을 고려한 지렁이 위해성 평가 체계에 의한 환경추정농도(PEC, Predicted environmental concentration)를 산출하여 독성-노출비(TER, Toxicity-exposure ratios)를 구하는 평가가 필요하나 친환경농자재의 경우 지렁이에 대한 독성성적을 요구하지 않아 친환경농자재로 활용 가능하다고 사료된다.

본 연구는 친환경 살충소재의 환경에 대한 안전성 평가를 수행하여 친환경 농자재 제품개발에 활용하기 위해 실시한 것이다. 마늘 추출액, 잔토실럼(*Zanthoxylum*), 레몬그라스 정유의 생태독성시험 4종(물벼룩급성독성, 송사리급성독성, 꿀벌급성독성, 지렁이급성독성)을 수행하였고, 그 결과 마늘 추출액 함유 유제는 물벼룩급성독성 시험에서 USEPA 기준으로 보통독성이 나타났으며 그 외의 잔토실럼(*Zanthoxylum*), 레몬그라스 정유 함유 유제는 독성이 낮은 것으로 확인되었다. 송사리에 대한 급성독성 시험의 경우 실시한 모든 식물정유들에 대한 어류의 반수치사농도는 2 mg L⁻¹ 이상임으로 농촌진흥청 고시(농촌진흥청, 2012)에 따라 급으로 독성이 낮게 나타났다. 친환경농업육성법(농촌진흥청, 2011)에 따라 친환경농자재는 어독성 급인 경우 사용가능하므로 친

환경농자재로 활용 가능성을 확인하였다. 하지만 어독성 구분은 잉어에 대한 반수치사농도를 사용하므로 잉어시험이 추가로 필요하다고 사료된다. 꿀벌에 대한 급성독성시험에서는 잔톡실림(*Zanthoxylum*)과 레몬그라스 정유 30% 함유 유제에 대한 독성이 낮게 나타났으나 마늘추출액 30% 함유 유제의 경우 제품 살포시 노출량을 산출하여 위해성평가를 실시한 결과를 고려하여야 할 것으로 사료되었다. 친환경농업육성법(농촌진흥청, 2011)에 따라 꿀벌접촉독성이 모든 시험물질에서 $11 \mu\text{g bee}^{-1}$ 이상으로 친환경농자재로 활용 가능성이 나타났으며 잔톡실림(*Zanthoxylum*) 30% 유제와 레몬그라스 정유 30% 유제는 $100 \mu\text{g bee}^{-1}$ 이상으로 위해 성여부와 상관없이 꿀벌독성이 매우 낮아 친환경농자재로 활용 가능하였다. 모든 시험의 결과를 종합해 볼 때, 제품개발 시 지렁이급성독성에 대한 안전성이 확인될 경우 환경에 대한 안전성이 확보된 친환경 살충소재로서의 활용 가능성이 예상되며, 친환경 농자재 생산에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 ‘농작물 해충 방제를 위한 식물유래 살충제 개발’ 중 세부과제 ‘곤충생리억제물질 및 식물 추출물의 생태독성 평가’(2009O1OFT102966315)와 국립농업과학원 기관고유 과제 ‘농약등록 신청자료의 검토 평가 및 관리’의 세부과제인 ‘등록 및 재등록 신청농약의 생태독성자료 검토 및 평가’(PJ0063402011)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Literature Cited

- Anwar, A., M. Groom and D. Sadler-Bridge (2009) Garlic: from nature's ancient food to nematicide, *Pesticide News* 84 (June): 18-20.
- Arnason, J. T., B. J. R. Philogene, P. Morand, K. Imrie, S. Iyengar, F. Duval, C. Soucy-Breau, J. V. Scaiano, N. H. Werstiuk, B. Hasspieler and A. E. R. Downe (1989) Naturally occurring and synthetic thiopenes as photoactivated insecticides. In *Insecticides of Plant Origin*. (Eds. J.T. Arnason, B.J.R. Philogene and P. Morand) ACS symposium series no. 387, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 164-172.
- Bafi-Yebo, N. F. A., J. T. Arnason, J. Baker and M. N. Smith (2005) Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine* 12:370-377.
- Dkhil, M. A., A. S. Abdel-Baki, F. Wunderlich, H. Sies and S. Al-Quraishy (2011) Anticoccidial and anti-inflammatory activity of garlic in murine *Eimeria papillata* infections. *Vet Parasitol*, 175:66~72.
- Fenaroli, G., T. E. Furia and N. Bellanca (2004) *Handbook of Flavor Ingredients*, ISBN 0-87819-532-7.
- Gómez, Y., K. Gil, E. González and L.M. Farías (2007) Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 55:767~775.
- Gupta, R., B. Thakur, P. Singh, H. B. Singh, V. D. Sharma and V. M. Katoch (2010) Chauhan SVS: Anti-tuberculosis activity of selected medicinal plants against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res*, 131:809~813.
- Isman, M. B. (1999) Neem and related natural products. In eds. by F.R. Hall, and J.J. Menn. *Biopesticides use and delivery*. Human Press. Totowa. pp.139-153.
- Lawless, J. (2002) *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*, ISBN 1-85230-661-0
- Leuter, H. D., H. P. Koch and L. D. Lawson (1996) Therapeutic effects and applications of garlic and its preparation. In *Garlic. The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. Edited by Koch HP, Lawson LD. Williams & Wilkins. 135-212.
- Kim J. W., Y. S. Kim and K. H. Kyung (2004) Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *J Food Prot*, 67:499~504.
- Koul, O. (2004) Neem: a global perspective. In eds. by O. Koul and S. Wahab. *Neem: today and in the new millennium*. Kluwer Academic Press. Dordrech. pp. 1-19
- Kuwahara, Y., H. Suzuki, K. Matsumoto and Y. Wada (1983) "Pheromone study on acarid mites. XI. Function of mite body as geometrical isomerization and reduction of citral (the alarm pheromone) *Carpoglyphus lactis*". *Appl. Entomol. Zool.* 18:30~39.
- Mahmoudabadi, A. Z. and M. K. G. Nasery (2009) Antifungal activity of shallot, *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae), in vitro. *J Med Plants Res* 3:450~453.
- OECD (2011) *Daphnia sp. Acute immobilisation test*, OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 202
- Onawunmi, G. O., W. Yisak and E. O. Ogunlana (1984) Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacology* 12:279~286.
- Owusu, E. O., W. K. Osafo and E. R. Nutsukpui (2007) Bioactivities of Candlewood, *Zanthoxylum xanthoxyloides* (Lam.) solvent extracts against two stored-product insect pests. *African Journal of Science and Technology* 8:17~21.
- Park, K. W. (2003) *Herb & Aromatherapy*. Sunjimunhwasa, Seoul.
- Park, H. M. (2010) Plant essential oils and their components: The Larvicidal Activities against *Aedes aedes aegypti*, Acute Toxicities on Water Flea, *Daphnia magna*, and Aqueous Residues.
- Robacker, D. C. and L. B. Hendry (1977) "Neral and geranial: components of the sex pheromone of the parasitic wasp, *Itoplectis conquisitor*". *J. Chem. Ecol.* 3 (5):563~577.
- Saxena, R. C. (1989) Insecticides from neem. In *insecticides of*

- plant origin (J.T. Arnason, B.J.R. Philogene and P. Morand, eds.). ACS Symp. Ser. No. 387. Am. Chem. Soc. Washington, D.C., pp. 110-135.
- Schmutterer, H. (1980) Natural pesticides from the neem tree. Proc. 1st Int. Neem Conf. pp. 33-259.
- Tiwary M, S.N. Naik, D.K. Tewary, P.K. Mittal, S. Yadav (2007) Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors, J Vector Borne Dis, 44(3):198~204.
- USEPA (2006) Pollinator protection requirements for Section 18 Emergency Exemptions and Section 24(c) special local need registration in Washington State; Registration Services Program Pesticide Management Division Washington State Dept of Agriculture, AGR PUB 631-225 (R/03/30/2010).
- USEPA (2012) Ecotoxicity Categories for Terrestrial and Aquatic Organisms, Technical Overview of Ecological Risk Assessment Analysis Phase: Ecological Effects Characterization, http://www.epa.gov/oppfed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm.
- Weber, N. D., D. O. Andersen, J. A. North, B. K. Murray, L. D. Lawson and B. G. Hughes (1992) In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. Planta Med, 58:417~423.
- Werner I., J. Geist, M. Okihira, P. Rosenkranz and D. E. Hinton (2002) Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*). Marine Environmental Research 54:609~614.
- Wink, M. (1993) Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In Phytochemistry and Agriculture (van Beek TA, Breteler H. eds.). Clarendon Press, Oxford, pp.171-213.
- Zhu, B. C. R., G. Henderson, F. Chen, H. Fei and R. A. Laine (2001) Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the fromosan subterranean termite, Journal of Chemical Ecology, 27(8):1617~1625.
- Division of Agro-materials Industry, RDA (2012) Criteria and methods of toxicity test for environmental organism, Legislation, notification, and directives for pesticide regulation, RDA, Korea, pp. 306-313.
- You, A. S., Y. W. Choi, M. H. Jeong, S.-S. Hong, Y.-K. Park, H.-S. Jang, J.-Y. Park and K.-H. Park (2011) Acute ecotoxicity evaluation of thyme white, clove bud, cassia, lavender, lemon eucalyptus essential oil of plant extracts, The Korean Journal of Pesticide Science 15(4):350~356.
- Division of Agro-materials Industry, RDA (2011) Legislation for promotion of environment friendly agriculture, RDA, Korea, pp. 142.

식물추출물 마늘 추출액, 잔톡실림, 레몬그라스 정유 함유 유제 3종의 생태독성평가

유아선* · 홍순성 · 정미혜 · 박경훈 · 장희섭 · 이제봉, 박재음

국립농업과학원 농산물안전성부

요 약 식물추출물 함유(마늘추출액, 잔톡실림오일, 레몬그라스오일 30%) 유제의 물벼룩급성독성 결과 마늘추출액 함유 30% 유제의 EC_{50} 은 3.3 mg L^{-1} 로 EPA 기준으로 보통독성정도이었고, 레몬그라스오일, 잔톡실림(*Zanthoxylum*)오일 함유 30% 유제의 EC_{50} 은 10 mg L^{-1} 이상으로 저독성이었다. 송사리급성독성 시험의 경우, 마늘추출액 함유 30% 유제의 LC_{50} 값이 3.0 mg L^{-1} 로 나타났으며 나머지 두 유제는 모두 10 mg L^{-1} 이상으로 확인되었다. 꿀벌급성독성시험은 접촉과 섭식 시험으로 나누어서 실시하였고, 접촉독성의 경우 모두 $100 \text{ a.i } \mu\text{g bee}^{-1}$ 이상으로 확인되었다. 섭식독성의 경우 마늘추출액 함유 30% 유제의 LD_{50} 값이 $44.3 \text{ a.i } \mu\text{g bee}^{-1}$ 이었으며 잔톡실림(*Zanthoxylum*)오일과 레몬그라스오일 함유 30% 유제의 경우 LD_{50} 값이 $100 \text{ a.i } \mu\text{g bee}^{-1}$ 이상으로 나타나 독성이 낮은 것으로 판단되었다. 지렁이급성독성시험의 경우, 마늘추출액, 잔톡실림(*Zanthoxylum*)오일, 레몬그라스오일 함유 30% 유제의 LC_{50} 값이 각각 267, 592, 430 mg kg^{-1} 로 나타났는데 이는 제품살포물량을 확정된 뒤 환경추정농도를 이용한 위해성평가를 통해 안전성을 확보한다면 친환경 농자재로서 활용이 가능할 것으로 판단하였다.

색인어 식물추출물, 생태독성