

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4 원제가 잉어 및 물벼룩에 미치는 영향 연구

조재구 · 김미선 · 최현정 · 권민 · 강태구 · 정창국¹ · 김균 · 오승민 · 박철범*

호서대학교 안전성평가센터, ¹한국삼공 연구소

Toxicity Evaluation of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 in *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*.

Jae-Gu Cho, Mee-Seon Kim, Hyun-Jung Choi, Min Kwon, Tae-Gu Kang, Chang-Kook Chung¹,
Kyun Kim, Seung-Min Oh and Cheol-Beom Park*

Hoseo Toxicological Research Center (HTRC), Hoseo University,
165 Sechul, Babang, Asan, Chungnam, 336-795, Korea

¹Agricultural Research Center, Hankook Samgong, 788-2 Geumgu, Gimje, Jeonlabukdo, 576-942, Korea

(Received on January 8, 2014. Revised on January 19, 2014. Accepted on February 28, 2014)

Abstract *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 has an anti-fungal effect on Garlic White Rot caused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. It is environmentally friendly microbial product that prevents and controls a variety of phytopathogens including Garlic White Rot caused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. The aim of this study was to assess the environmental toxicity using *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 (1.0×10^9 cfu/mL) was administrated to *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna* according to the toxicity test guideline for pesticide. LC_{50} of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 is over 6.67×10^1 cfu/mL in *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna* and no adverse effect was observed. Based on these results, we concluded that *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 has no toxicity for *Cyprinus carpio* and *Daphnia magna*.

Key words Biopesticide, *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4, Environmental evaluation, Garlic White rot

서론

세계 여러 나라에서 농작물의 보호를 위해 화학농약을 기초로 한 화학 방제 기법이 주가 되어왔다. 하지만 화학농약의 사용은 오남용에 따른 독성영향과 환경오염 뿐만 아니라 약제의 내성종 출현 등의 악영향이 나타난다. 따라서 지속 가능한 식량생산을 위해 독성이 낮고 친환경적인 농약의 필요성이 대두되었다(Mancebo et al., 2011). 이에 많은 연구자들이 자연친화적인 방제법을 개발하고 있다. 또한 최근의 소비가 웰빙(well-being)의 형태로 변화하면서 소비자들이 보다 안전한 먹거리를 구매하고 있다(Park, 2011).

생물농약(Biopesticide)은 생물방제제 또는 청정농약으로 일컬어지고 있으며, 자연계에 존재하는 천연물질과 생물체 및 그로부터 유래한 소재를 이용하여 농작물에 발생하는 병, 해충, 및 잡초를 방제하는 작물보호제이다. 생물농약에는 미생물농약(Microbial pesticide)과 생화학농약(Biochemical biopesticide) 등이 있는데 그중에서도 가장 많이 개발되고 있는 것은 세균, 곰팡이, 바이러스, 선충 등으로 개발하는 미생물농약이다. 2002년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약이 등록되어 있으며, 유럽의 경우 미국과 그 정의가 조금 다르지만 British Crop Protection Council에서 출판한 “The Manual of Biocontrol Agents, 4rd edition”에 따르면 미생물농약 112 품목이 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58 품목이 등록되어 있고, Semichemicals, 즉 반 합성화학물질 농약은 56 품목이 등록되

*Corresponding author

Tel: +82-43-210-7885, Fax: +82-43-210-7885

E-mail: cbpark@hoseo.edu

어 있다. OECD는 2020년 세계 농약시장에서 생물농약이 20%의 성장을 할것으로 예측하였다(Whalon and Wingered, 2003).

일반적으로 미생물 농약은 1961년 미국에서 등록된 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 살충제가 전 세계적으로 널리 사용되고 있다(Siegel et al., 1987).

마늘흑색썩음병은 1988년 고흥지방의 난지형 마늘포장에서 처음 발생하여 큰 피해를 주었다. 지금은 제주도와 무안, 서산, 태안지방까지 발생하고 있으며, 특히 난지형 노지마늘 재배지역에서 피해가 크다. 서산, 태안지방에서는 한지형 마늘까지 피해가 확산되고 있고 무안지방에서는 양파포장에도 발생하여 큰 피해를 주고 있다(Kim, 2005). 마늘흑색썩음병의 원인균은 토양 전염성 병원균의 일종으로(*Sclerotium cepivorum* Berkeley) 흑색의 구형 또는 편구형 균핵을 형성하고있으며, 균핵의 크기는 보통 0.5~0.6 mm로서 다른 균핵병의 균핵보다 매우 작다. 병의 징후는 마늘 지상부가 황변하여 고사하는 증상을 나타내며, 지하부의 구근에서는 처음 흰근사가 나타나, 병이 진전되면서 구근 껍질에 흑색의 균핵이 형성된다. 마늘 흑색썩음균핵병 방제를 위한 화학농약에는 다조멧 입제, 메트코나졸 입제, 헥사코나졸 입제 등이 있다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4는 마늘흑색썩음병의 방제제로 개발중인 미생물 농약으로써, 작물에 발생하는 흑색썩음균핵병균을 효과적으로 방제할 수 있는 미생물균주로 분리 배양된 것이다. 본제제는 미생물제제로서 다른 여러 식물병에 대해 방제효과가 우수하면서도, 기존의 화학농약이 가지고있는 잔류독성, 환경유해 등의 문제점을 해결할 수 있다(Han et al, 2013).

현재 사용되는 농약은 인축 및 생태독성에 대한 독성자료와 잔류량을 바탕으로 안전성평가가 이루어지고 있으며, 국내의 경우 농촌진흥청의 “농약 및 원제의 등록기준”(농촌진흥청 고시 제2012-37호, 2012년 7월 12일)에 따라 이루어지

고 있다. 미생물농약의 환경중 안전성시험은 Fig. 1과 같이 3단계의 절차에 의하여 수행된다(Guidelines for safety evaluation of microbial pesticides, 1997). 그 중 생태독성시험은 담수어류, 담수무척추동물, 조류, 꿀벌, 토양 미생물 등과 같이 여러 생물을 이용한 시험이 제시되어있다(Baudouin and Scoppa, 1978; Sprague, 1969).

이전의 연구에서 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제는 급성경구, 정맥독성, 호흡기/변원성을 조사한 바, 특이한 독성증상은 관찰할수 없었다(Kwon et al., 2013).

이에 본 시험에서는 마늘흑색썩음병의 방제제로 개발중인 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)에 대하여 수서생물에 미치는 독성영향을 평가하기 위하여 잉어(*Cyprinus carpio*)와 물벼룩(*Daphnia magna*)을 대상으로 독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질의 선정 및 조제

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4는 (주) 삼공에서 최적화 배양된 제제를 입수하여 시험에 사용하였다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 입제(1.0×10^6 cfu/mL)의 실제 살포량이 10 kg/10 a이므로 수심 15 cm 물 중에 직접 살포한 경우로 환산한 농도의 1000배 농도로 처리하면, 1333.4 g/20 L이었고, 이때의 농도가 6.67×10^4 cfu/mL이었다. 따라서 시험물질인 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)를 1.3333 g 칭량하여 20 L 사육수에 노출하였다.

시험생물

시험생물은 호서대학교 안정성평가센터의 사육실에서 사육하였다. 시험어종으로 사용한 잉어(*Cyprinus carpio*)는 수

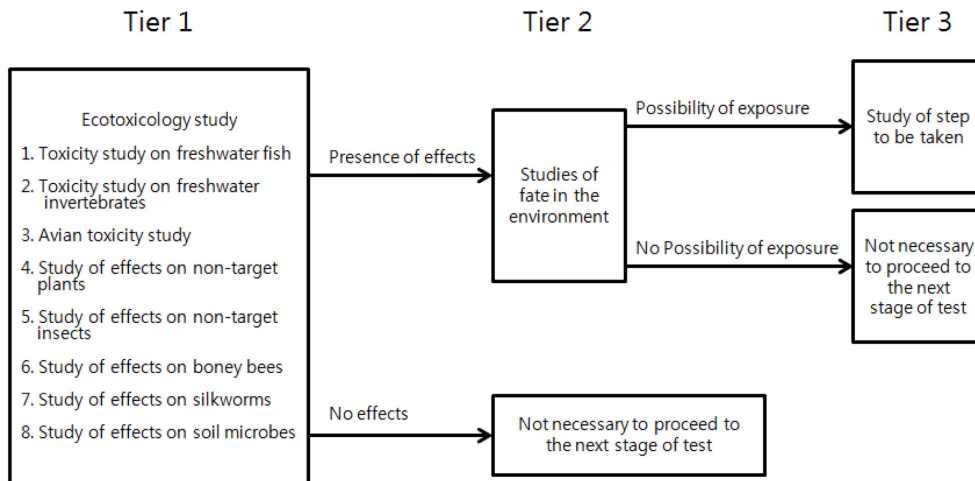


Fig. 1. Ecotoxicology study and environmental fate study of Microbial pesticides (cite from guidelines for safety evaluation of microbial pesticides).

은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.5 ± 0.5 , 용존산소 $7\sim 8\text{ mg/L}$, 광주기 16시간/8시간(명/암)의 조건으로 사육하였으며, 탈염처리한 수돗물을 24시간 이상 폭기시켜 사육수로 이용하였다. 먹이는 플레이크형 사료를 1일 1회 공급하였다. 시험에 사용한 물벼룩(*Daphnia magna*)은 수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ pH 7.5 ± 0.5 , 용존산소 $7\sim 8\text{ mg/L}$, 광주기 16시간/8시간(명/암)의 조건으로 M4배지에서 사육하였으며, *Chlorella vulgaris*를 1일 1회 공급하였다.

시험물질의 노출 및 관찰

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4 원제($1.0 \times 10^9\text{ cfu/mL}$)의 잉어와 물벼룩에 대한 시험은 농촌진흥청 고시 제 2012-37호에 준하여 수행하였다. 잉어의 경우 전장이 약 5 cm 되는 것을 이용하였으며, 20 L의 수조를 이용하여 반지수식으로 2일마다 전수교환하여 30일간 노출을 수행하였다. 시험농도는 예비시험을 바탕으로 control, $6.67 \times 10^4\text{ cfu/mL}$ 로 설정하였다. 각 농도당 30마리의(10마리 \times 3반복구) 개체를 노출시켰으며, 시험은 사육조건과 동일한 조건에서 수행하였다.

물벼룩의 경우는 태어난지 24시간 미만의 개체를 1 L의 비이커에 반지수식으로 2일마다 전수교환하여 21일간 노출을 수행하였다. 시험농도는 예비시험을 바탕으로 control, 멸균여과대조군, $6.67 \times 10^4\text{ cfu/mL}$ 로 설정하였다. 각 농도당 60마리의(20마리 \times 3반복구) 개체를 노출시켰으며, 시험은 사육조건과 동일한 조건에서 수행하였다. 시험기간 동안 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 농도를 측정하기 위하여, 평판계수법을 이용하여 PCA(*Pseudomonas cepacia* agar) 배지에 도말하여 30°C 에서 48시간동안 배양후 측정하였다.

시험기간 중 먹이는 사육조건과 동일한 조건으로 공급하였다. 매 24시간 마다 사망 및 이상개체를 관찰하였으며, 치사율 및 성장률을 주요 종말점으로 측정하였다. 성장률은 전장과 습중량으로 측정하였으며 분산분석(ANOVA) 검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

잉어는 노출 직후부터 시험종료시까지 $6.67 \times 10^4\text{ cfu/mL}$ 농도에서 이상개체 및 치사개체가 관찰되지 않았다. 노출전 개체의 전장은 대조군이 $4.62 \pm 0.24\text{ cm}$, 노출군이 $4.71 \pm 0.28\text{ cm}$ 로 나타났으며, 습중량은 대조군이 $1.03 \pm 0.22\text{ g}$, 노출군이 $0.95 \pm 0.20\text{ g}$ 으로 나타났다. 노출후 대조군 개체의 전장은 $4.72 \pm 0.24\text{ cm}$, 노출군이 $4.80 \pm 0.30\text{ cm}$ 로 나타났으며, 습중량은 대조군이 $1.09 \pm 0.24\text{ g}$, 노출군이 $1.19 \pm 0.23\text{ g}$ 으로 나타났다. 전장 및 습중량에 대한 노출전 및 노출후 농도간 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2, 3). 시

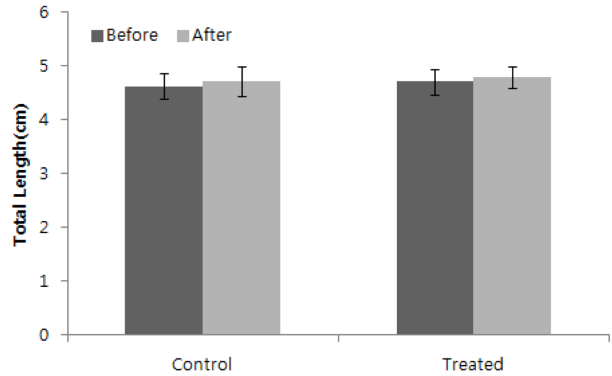


Fig. 2. Total length of *Cyprinus carpio* at 30 day upon exposure to *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4. Values are presented as mean \pm standard deviation.

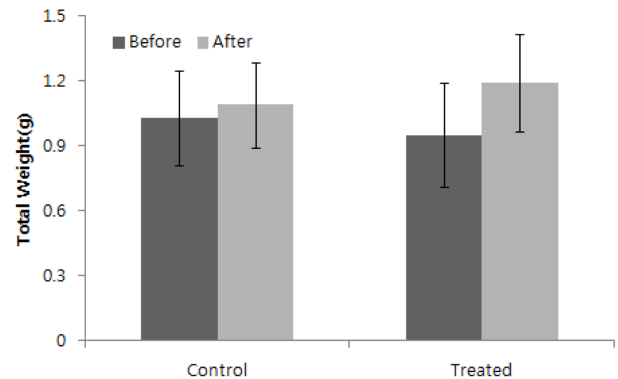


Fig. 3. Total weight of *Cyprinus carpio* at 30 day upon exposure to *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4. Values are presented as mean \pm standard deviation.

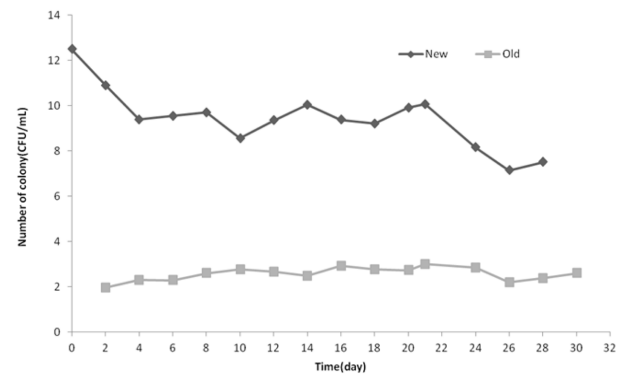


Fig. 4. Number of colony during the exposure period (30 days).

험 종료후 생존한 전 개체에 대하여 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 조사한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대하여 대조군과 처리군의 육안상 차이를 발견할 수 없어, 병리 관찰은 진행하지 않았다. 시험기간 중 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 농도 변화는 Fig. 4에 나타났으며, 노출전 평균(9.35 ± 1.31) $\times 10^4\text{ cfu/mL}$, 노출후 평균(2.55 ± 0.30) $\times 10^4\text{ cfu/mL}$ 으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Effects of exposure to different concentrations of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 on *Cyprinus carpio*

Conc. (cfu/mL)	†Microbial Concentration ($\times 10^4$ cfu/mL)		Mortality (%)	*Major types of adverse effects
	New	Old		
control	0	0	0 (0/30)	—
6.67×10^4	9.35 ± 1.31	2.55 ± 0.30	0 (0/30)	—

†Measured concentration (geomean \pm standard deviation)

*Adverse effects of *Cyprinus carpio* include hemorrhage, abnormal swimming, growth inhibition and death. Adverse effects of *Cyprinus carpio* was observed within 30 days after the treatment.

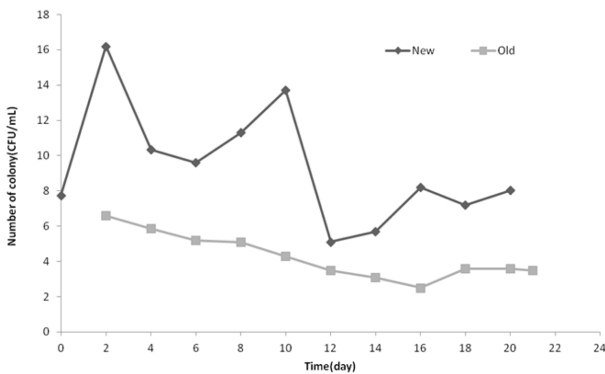
Table 2. Effects of exposure to different concentrations of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 on *Daphnia magna*

Conc. (cfu/mL)	†Microbial Concentration ($\times 10^4$ cfu/mL)		Mortality (%)	*Major types of adverse effects
	New	Old		
control	0	0	0 (0/30)	—
Sterile & Filtration control	0	0	0 (0/30)	—
6.67×10^4	8.87 ± 4.10	3.35 ± 1.27	0 (0/30)	—

†Measured concentration (geomean \pm standard deviation)

*Adverse effects of *Daphnia magna* include abnormal swimming and death.

Adverse effects of *Daphnia magna* was observed within 21 days after the treatment.

**Fig. 5.** Number of colony during the exposure period (21 days).

시험기간 중 pH는 평균 7.97(7.64~8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(7.60 mg/L~8.36 mg/L), 수온은 평균 20.2°C(19.8°C~20.8°C)이었으며, 경도는 33.8 mg/L (20 mg/L~44 mg/L)이었다. 따라서 30일 반수치사농도(LC₅₀)은 6.67×10^4 cfu/mL 이상으로 확인되었다.

물벼룩은 노출 직후부터 시험 종료시까지 6.67×10^4 cfu/mL 농도에서 이상개체 및 치사개체가 관찰되지 않았다. 시험기간중 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4의 농도는 Fig. 5에 나타냈으며, 노출전 평균(8.87 ± 3.35) $\times 10^4$ cfu/mL, 노출후 평균(4.10 ± 1.27) $\times 10^4$ cfu/mL으로 나타났다 (Table 2).

시험기간 중 pH는 평균 7.97(7.64~8.62), DO는 평균 7.97 mg/L(7.60 mg/L~8.36 mg/L), 수온은 평균 20.2°C(19.8°C~20.8°C)이었으며, 경도는 199.4 mg/L(180 mg/L~230 mg/L)이었다. 따라서 21일 반수치사농도(LC₅₀)은 6.67×10^4 cfu/

mL 이상으로 확인되었다.

따라서 이상의 결과들을 기초로하여 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제는 잉어와 물벼룩에 대한 영향이 없는 것으로 판단된다.

유사한 균주인 *Burkholderia pyrrocinia* SH-09는 보리, 밀 등의 곡물류에 자주 발생하는 흰가루병 방제를 위해 개발되었는데 인축독성 및 환경독성에서 별 이상이 없어 본 연구의 결과와 일치 하였다(Yu et al., 2005).

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4 균주는 마늘 흑색썩음균핵병균과 대치배양시에 우수한 길항력을 나타내며, 이러한 길항력은 장시간 유지되는 것으로 보고 되었다(Han et al., 2013). 같은 연구에서 그 방제효과는 69.9%였고, 다른 약제와 다르게 마늘 생육기의 흑색썩음균 방제의 대안이 될 수 있다. *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 랫드를 이용하여 급성 경구, 호흡기 정맥독성/병원성을 확인한 결과, 특별한 이상은 관찰되지 않았다(Kwon et al., 2013). 본 연구에서는 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 어류와 물벼룩을 이용하여 환경에 미치는 영향을 확인한 결과, 특별한 이상을 관찰할수 없었으므로, 본 균주를 이용한 생물방제제는 인축과 환경에 대한 안전성이 우수한 제제로 사료된다. 본 균주는 또한 상추 잭빛곰팡이 병균이나, 상추 균핵병균, 고추 탄저병균, 생강 근경썩음병균등의 여러 병원균에도 탁월하다고 한다(Han et al., 2013). 따라서 해당 균주를 이용한 생물방제제가 제품화 되고 이어 다른 작물로의 적용확대까지 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 농림수산식품기술기획평가원(111045-032-SB010)의 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임.

Literature Cited

- Baudouin, M. F. and P. Scoppa (1974) Acute toxicity of various metals to fresh water zooplankton. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 12:745-751.
- British Crop Protection Council (2014) book shop reference <http://www.bccpc.org/shop/The-Manual-of-Biocontrol-Agents-Fourth-edition.html> Accessed 01 April 2014.
- Guidelines for safety evaluation of microbial pesticides (Draft translation). No.9-5090, Japan's MAFF, 1997.
- Han, K. S., B. R. Kim, J. T. Kim, S. S. Hahm, C. K. Chung, Y. G. Nam, S. H. Yu and J. E. Choi (2013) Biological control of white rot in garlic using *Burkholderia pyrrocinia* CAB0106-4. Res. Plant Dis. 19(1):21-24.
- Kim, Y. K. (2005) Ecology and control strategy of white rot of garlic and onion. Rural Development Administration Cooperative Research Report, 6-12.
- Kwon, M., T. K. Kang, C. K. Chung and C. B. Park. (2013) Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 of in rats. Korean J. Pestic. Sci. 17(3):193-199.
- Mancebo, A., T. Molier, B. Gonzalez, S. Lugo, L. Riera, M. E. Arteaga, A. M. Bada, Y. Gonzalez, M. Pupo, Y. Hernandez, C. Gonzalez, N. M. Rojas, and G. Rodriguez (2011) Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. Regul. Toxicol. Pharm. 59:184-190.
- Park, K. S. (2011) Development of Biopesticide and Role of *Bacillus* spp. KIC News, 14(4):1-11.
- Rural Development Administration (2012). Notification No. 2012-37. 2012 RDA. Korea.
- Siegel, J. P., J. A. Shaddock and J. Szabo (1987) Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. J. Econ. Entomol. 80:717-723.
- Sprague, J. B. (1969) Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 3:793-821.
- Whalon, M. E. and B. A. Wingerd (2003) Bt: mode of action and use. Arch. Insect Biochem. Physiol. 54:200-211.
- Yu, S. H., Y. S. Kim, H. S. Cho, M. S. Ko, N. Y. Lee, H. M. Lee, M. K. Cho and C. Chang (2005) Development of biofungicide for control of powdery mildews. Rural technology development report. 1-124.

Burkholderia pyrrocinia CAB08106-4 원제가 잉어 및 물벼룩에 미치는 영향 연구

조재구 · 김미선 · 최현정 · 권민 · 강태구 · 정창국¹ · 김균 · 오승민 · 박철범*

호서대학교 안전성평가센터, ¹한국삼공 연구소

요약 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4은 *Sclerotium cepivorum*과 *Sclerotium* sp. 균주에 의해 발생하는 마늘 흑색 썩음균핵병에 대한 항박테리아 효능을 가지고 있다. 이는 *Sclerotium cepivorum*과 *Sclerotium* sp.에 의해 발생하는 마늘 흑색썩음 균핵병을 포함한 다양한 식물병원체를 관리하고 예방하기 위하여 개발중인 친환경적인 미생물 제품이다. 본 연구에서는 마늘 흑색 썩음균핵병의 방제제로 개발중인 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제(1.0×10^9 cfu/mL)가 잉어와 물벼룩에 미치는 영향을 평가하였으며, 그 결과 6.67×10^4 cfu/mL의 농도에서는 독성이 관찰되지 않았다. 따라서 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 원제는 담수어류 및 담수무척추동물에 영향이 낮을 것으로 기대된다.

색인어 환경위해성평가, 친환경농약, *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4, 마늘 흑색썩음균핵병