



항공방제를 가정한 멀티콥터 농약 살포의 꿀벌 위해성 평가

강용락¹, Tekalign Begna², 이동희³, 김민중⁴, 김준현⁴, 정철의^{1,2,*}

¹안동대학교 식물의학과, ²안동대학교 농업과학기술연구소, ³안동대학교 산학협력단, ⁴국립산림과학원 병해충연구과

Risk Assessment for Honeybees in Pesticide Spraying by Multicopter Assuming Aerial Application

Yongrak Kang¹, Tekalign Begna², Dong-Hee Lee³, Min-Jung Kim⁴, Junheon Kim⁴ and Chuleui Jung^{1,2,*}

¹Department of Plant Medicals, Andong National University, Andong 36729, Republic of Korea

²Agricultural Science and Technology Research Institute, Andong National University, Andong 36729, Republic of Korea

³Industry Academy Cooperation Foundation, Andong National University, Andong 36729, Republic of Korea

⁴Forest Entomology and Pathology Division, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Republic of Korea

Abstract

Aerial spray is has been considered as the primary option for controlling outbreak of forest pests since it covers a broader area with low cost. However, non-target effects and environmental concerns require sophisticated selection of quality spraying materials and effective application methods. In this study, we evaluated the risk of two insecticides to honeybees in the laboratory and field simulating aerial spray conditions using the multicopter called drones. For each insecticide, LD₅₀s were estimated by adult acute toxicity test (feeding and contact), and residue levels over time were analyzed in the greenhouse condition. In the field toxicity test, caged bee mortality and honey bee colony developmental indices were investigated under the drone-spray condition. LD₅₀ values from contact toxicity test for etofenprox, and flupyradifurone was 0.01-0.012 µg/bee, and for 1.5-3.1 µg/bee respectively. LD₅₀s values from oral toxicity tests for all the pesticides showed high toxicity (< 2 µg/bee). According to the field toxicity test, there was no significant difference in the number of adult honeybees and the area of stored honey compared to the control. However, colony weights of the two pesticide treatments were lower than the control, and stored pollen area was lower in etofenprox treatment than in the control. Overall, the risk of flupyradifurone on honey bee was relatively lower than etofenprox but can not be disregarded.

Keywords

Acute toxicity, Colony assessment, Etofenprox, Flupyradifurone, Multicopter

서 론

꿀벌은 봉산물 생산뿐만 아니라 작물에게 화분매개 서비스를 제공하여 생산량과 품질을 증가시키고, 농가 이익 향상에 도움이 될 수 있다(Abröl, 1993). 기후변화, 질병,

영양결핍, 해충 및 농약 등 다양한 요소들이 복합적으로 작용하여 꿀벌의 건강을 위협하고 봉군붕괴현상(Colony collapse disorder)의 원인으로 작용한다(van Engelsdorp *et al.*, 2009). 여러 요인들 중 농약 중독은 꿀벌을 직접 치사시킬 수도 있지만 신경계 이상, 학습 및 기억능력 저하

등 아치사 현상들을 유발할 수 있다(van der Sluijs *et al.*, 2013). 꿀벌은 살충제의 항공 살포, 농작물의 엽면 살포나 종자 소독 또는 벌통 내에 처리하는 꿀벌 기생 해충 방제 과정 등을 통해 살충제에 노출될 수 있다(Kiljanek *et al.*, 2016). 국내에서는 소나무재선충병을 포함한 산림에서 발생하는 병해충 방제에 항공방제가 많이 사용되고 있다(Lee *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020). 특히, 사람이 직접 약제 살포가 어려운 곳과 면적이 넓은 곳에는 항공기를 통해 방제가 이루어지고 있다(Lee *et al.*, 2019). 하지만 살충제 항공 살포 시 꿀벌과 같은 비표적 생물에도 영향을 미칠 수 있다(Pisa *et al.*, 2015; Hopwood *et al.*, 2016). Thiacloprid를 항공 살포하여 꿀벌 봉군에 노출하였을 경우 꿀벌의 학습 및 기억력이 저하될 수 있는 수준의 약제 잔류량이 꿀과 화분에서 검출되었다(Kang, 2021). 미국 플로리다주에서 모기 방제에 사용되는 유기 인산염 살충제 항공 살포에 노출된 꿀벌의 사망률과 벌꿀 생산량이 감소하였다고 보고되었다(Zhong *et al.*, 2003). 소나무재선충 매개충 방제를 위한 살충제 항공 살포가 무당거미의 생물적 형질에 직·간접적으로 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있으며 장기적으로 개체군의 건강에 영향을 줄 수 있다는 보고가 있다(Jung *et al.*, 2020). 산림에 살충제를 항공 살포할 경우 약제 살포 노출의 형태, 살포 환경과 고도에 따라 비표적 생물에 부정적 영향을 줄 수 있으므로 위해성의 범위를 가늠하기가 어렵다(Kim *et al.*, 2022). 소나무재선충병 예방 외에도 생활권 주변 돌발해충 및 밤나무의 복숭아명나방 등 임산물 해충에도 살충제 항공 살포를 시행하고 있다(KFS, 2023).

국내에서 솔수염하늘소 등을 방제하기 위해 등록된 약제는 thiacloprid와 acetamiprid로 neonicotinoid 계통의 살충제이다. Neonicotinoid 계통의 살충제 작용기작은 시냅스 후막의 아세틸콜린 수용체에 결합하여 정상적인 아세틸콜린의 결합을 차단하면서 동시에 신호를 계속 발생시켜 곤충을 치사시킨다. 2013년 유럽연합에서는 neonicotinoid 계열 중 세 가지 약제(clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid)의 사용을 금지하였으며, 꿀

벌과 인축 위해성으로 인해 thiacloprid도 추가적으로 금지하였다(EU, 2013; EC, 2020). 두 약제 모두 꿀벌 저독성으로 분류되어 있지만 Cho *et al.*(2017)의 연구 결과에 따르면 급성접촉독성 및 엽상접촉독성이 상당히 높은 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 thiacloprid에 노출된 꿀벌은 학습 및 기억력이 저하되고 면역력 또한 낮아지는 아치사 효과들이 보고되었다(Brandt *et al.*, 2016; Tison *et al.*, 2017). 이러한 선행 연구 결과들을 통해 현재까지 사용되고 있는 약제에 대한 재평가와 꿀벌에 독성이 낮은 대체 약제 선정이 필요하다.

Etofenprox는 합성 피레스로이드 계열로 전위 의존 나트륨 통로를 열린 상태로 유지하여 축색돌기 세포막에서 탈분극 상태를 재분극 상태로 되돌리는 과정을 저해하여 곤충을 치사시킨다(Benli, 2015). Flupyradifurone은 뷰테노리드 계열로 아세틸콜린 수용체에 신경전달을 차단하여 곤충을 치사시킨다(Nauen *et al.*, 2015).

꿀벌 독성 평가는 OECD 및 Eppo 가이드라인을 기반으로 Tier 시스템에 따라 실내, 반야외, 야외 독성 평가 순으로 진행된다. Tier 1의 실험실에서는 성충의 급성 접촉, 급성 섭식, 만성 섭식 및 엽상 잔류와 유충의 급성 섭식 및 만성 섭식 등을 통해 사망률, 우화율을 조사하고 반수치사약량 및 잔류 독성(RT25) 등을 추정한다(OECD, 1998a, 1998b, 2013, 2017). Tier 2의 반야외 실험은 터널에 밀원식물을 식재 후 봉군을 배치하여 약제 처리구와 대조구 간의 봉군(성충 수, 봉판, 먹이 소비), 일벌(사망률, 외역 활동), 여왕벌 상태 등을 비교한다(OECD, 2007). Tier 3의 야외 실험은 실제 현장에 봉군을 배치하여 약제 처리구와 대조구 간의 봉군(성충 수, 봉판, 먹이 소비), 일벌(사망률, 외역 활동), 여왕벌 상태 등을 비교한다(Eppo, 2010a, 2010b). 약제의 독성 및 위해도는 사망률, 반수치사약량 및 위해도(Hazard Quotient) 등을 통해 판단하게 된다(Table 1).

본 논문에서는 두 가지 약제(etofenprox, flupyradifurone)가 꿀벌에 미치는 위해성 평가를 목적으로 실내 급성(섭식, 접촉) 독성과 멀티콥터 살포 야외 독성 평가를 수행하였다.

Table 1. International standards for determining honey bee toxicities

	Low toxic	Moderately toxic	High toxic	References
Lethal dose (µg/bee)	≥ 11	2~10.9	< 2	USEPA, 2012
Hazard quotient (HQ)	< 50	50~2,500	≥ 2,500	Villa <i>et al.</i> , 2000

재료 및 방법

1. 실험 재료

양봉꿀벌 (*Apis mellifera*)을 실험에 사용하였으며, 실내 성충 급성 독성 평가와 야외 멀티콧터 살포 접촉독성 평가에 사용된 꿀벌은 경북 안동시 송천동 안동대학교 부속 실험 양봉장에서 약제 노출 없이 사육한 봉군에서 연령의 구분 없이 성충을 채취하여 사용하였다.

야외 멀티콧터 살포 후 봉군 발달 평가에 사용된 봉군은 경북 안동시 와룡면 산야리 지역 양봉 농가로부터 구입하였다. 봉군은 벌집(소비)이 총 4장으로, 이 중 2장은 육아권, 1장은 먹이장 그리고 1장은 공소비로 구성되었다. 각 시험구당 봉군 9통씩 총 36통을 2021년 06월 09일에 소나무 주변으로 배치하였다.

실험에 사용된 약제는 etofenprox 유제(경농; 추천 배수 50배, a.i. 20%)와 flupyradifurone 액제(바이엘; 추천 배수 33배, a.i. 17.09%)이다. 실내 성충 급성 독성 평가에 사용된 약제 농도는 추천농도부터 10, 100, 1000, 10000, 100000배까지 희석하였다. 잔류 패턴 및 야외 멀티콧터 살포는 추천농도로 처리하였다.

2. 실내 성충 급성 독성 평가

양봉꿀벌 봉군에서 채취한 꿀벌들을 이산화탄소로 마취시킨 후, 10마리씩 스테인레스 망사형 용기(지름 15, 높이 15 cm 원통형)에 소분하였다. 접촉독성 평가에 사용되는 꿀벌은 무게를 측정하고 꿀벌이 마취에 깨어나기 전 약제 희석액 5 mL를 분사 후 무게를 측정하여 약제 살포량을 조사하였다. 이 후 실험실(25±1°C, R.H. 65±5%)에서 신선한 50% 자당용액만 제공하여 약제 처리 후 3, 6, 12, 24, 48 및 72시간까지 사망률을 조사하였다.

섭식독성 평가에 사용하는 꿀벌은 2시간 절식하였다. 2시간 절식한 꿀벌들은 약제가 희석된 자당용액을 2시간 동안 제공해주고 섭식량을 조사하였다. 이후 실험실(25±1°C, R.H. 65±5%)에서 신선한 50% 자당용액만 제공하여 약제 처리 후 3, 6, 12, 24, 48 및 72시간까지 사망률을 조사하였다. 꿀벌이 허를 빼물고 뒤집어져 있거나 몸이 수축하여 움직임이 전혀 없는 것을 사망으로 판단하였으며, 처리별 3 반복 수행하였다.

3. 야외 약제 잔류 패턴 분석

2021년 8월 20일 안동대학교 실험농장에 부속된 두 개의 터널(15×6 m)에 메밀(*Fagopyrum esculentum*)을 파종하였다. 수동 살포기를 이용하여 10월 9일 각 터널 내 메밀꽃에 하나의 약제를 살포하였다. 약제 살포 후, 메밀 잎을 1, 3, 5, 7, 9일까지 채취 후 LC-MS/MS (NANOSPACE 5200, Shiseido, Japan/AB SICEX QTrap 4500, AB SCIEX, USA)와 GC-MS/MS (Agilent 7010B, Agilent Germany/AB SICEX QTrap 4500, AB SCIEX, USA)를 이용하여 약제 잔류량을 분석하였다. 잔류 분석은 식품의약품안전처 고시(제2020-27호) 농산물 유해물질 분석법을 토대로 하였다. 시료와 증류수 10 mL를 넣고 1분 진탕 후 초음파 추출하여 실린지 필터로 추출한 뒤 Acetonitrile 10 mL를 넣고 1분 진탕한다. Ana-Q extraction kit APQ-E10 (KRIAT, Korea)를 넣고 1분 진탕하고 4°C, 4,000G에서 5분간 원심분리하여 상층액을 추출하였다. 추출한 상층액에 정제염 AnA-Q dispersive kit APQ-D10 (KRIAT, Korea)을 넣고 4°C, 4,000G에서 5분간 원심분리하여 상층액을 실린지 필터(ADVANTEC, Japan)로 여과한 후 분석하였다. LC-MS/MS의 조건은 CAPCELL CORE C18 Cat No. 51106 (2.1 mm I.D×150 mm, 2.7 µm) 컬럼을 사용하였고 온도는 40°C, 이동상은 1: 증류수+0.1% 포름산+5 mM 아세트산 암모늄이 함유된 메탄올 2: 아세토니트릴+0.1 포름산+5 mM 아세트산암모늄이 함유된 증류수로 구성되며 2 µL로 유속 0.2 mL/min으로 25분 분석하였다. GC-MS/MS의 조건은 Agilent HP-5MS UI (30 m×0.25 mm×0.25 µm) 컬럼을 사용하였고 이동상 가스는 헬륨으로 1.2 mL/min 유속으로 60°C에서 시험용액을 주입하고 20°C/분으로 180°C까지 올리고 5°C/분으로 300°C까지 올린 뒤 5분간 유지하여 총 35분 분석하였다.

4. 멀티콧터 살포 야외 독성 평가

두 약제의 야외 접촉독성과 봉군 발달 정도를 비교하기 위한 야외 시험 지역은 경북 안동시 송천동 일대 소나무림을 대상으로 하였다(Table 2). 각 처리구의 크기는 10a를 기준으로 3반복 선정하였다. 각 약제 시험구 간 200 m 이상의 거리를 두어 비산의 영향을 최소화하였다.

야외 시험구 약제 살포에 사용된 멀티콧터는 E-610 모델로 INTOSKY사(Incheon, Korea)에서 제조되었다. E-610

Table 2. Geographic information of the test fields for the honey-bee risk assessment of drone application of pesticides in Songcheon, Andong, Korea during 2021

Treatment	Longitude	Latitude	Altitude (m)
Etofenprox	128.802825	36.546591	162
Flupyradifurone	128.805964	36.553661	265
Control	128.800697	36.543883	139

의 크기는 1,500×1,400×500 cm로 무게 13.9 kg, 최고속도 7 m/s, 최대 30분 비행이 가능한 모델이다. 멀티콥터에 부착된 노즐은 XR1100115 (TeeJet^{TR})로 45 psi의 압력에서 노즐당 0.59 L/min량이 가능하고 살포되는 입자 크기는 fine으로 106~235 μm이다. 이를 이용하여 꿀벌 봉군이 배치되어 있는 소나무림 10a 면적에 오전 6~8시경 수관 살포하였다. 무인항공기 약제로 등록된 살포 약량은 2L/10a로 등록되어 있으나 시험 면적의 제한으로 인해 5L/10a의 약량을 살포하였다.

대상 약제의 야외 접촉독성을 조사하기 위해 꿀벌의 사망률을 조사하였다. 꿀벌 약 30~50여 마리를 스테인레스 망사형 용기(지름 15, 높이 15 cm 원통형)에 먹이와 함께 넣어주고 06시경에 봉군 노출 평가에 사용되는 봉군 인근 소나무의 3층위(상층부: 9 m, 중층부: 5 m, 하층부: 1 m)에 설치하였다. 각 회차에 사용된 케이지의 개수는 실험구당 15개로 총 60개이다. 약제 살포 후 실험실로 회수하여 3, 6, 12, 24, 48, 72시간까지 사망률을 조사하였으며, 꿀벌이 혀를 빼물고 뒤집어져 있거나 몸이 수축하여 움직임이 전혀 없는 것을 사망으로 판단하였다.

대상 약제가 봉군 발달에 미치는 영향을 평가하기 위하여 성충의 수, 봉판의 크기, 먹이 저장량, 무게를 조사하였다. 성충의 수는 일별 한 마리가 별방 세 개를 차지한다는 것에 착안하여 계수하였다. 봉판과 저장된 먹이의 크기는 가로 40 cm, 세로 20 cm의 조사틀을 만들고 가로 8줄, 세로 4줄로 나누어 한 칸의 크기가 5×5cm인 32칸을 만들어 소비에 겹쳐 조사하였다. 조사는 봉군을 구성하는 4매를 대상으로 1차 살포 1주 전, 1·2·3차 살포 1일 후 각각 조사하여 총 4회 조사하였다.

5. 자료 분석

꿀벌 성충의 급성 독성의 LC₅₀과 LD₅₀은 SPSS 소프트웨어(IBM, version 16)의 Probit 분석을 통해 추정하였다. 시간-살충제 잔류곡선, 케이지 접촉 독성 및 봉군 발달 비교

는 R software를 통해 검증하였다(R Core Team, 2021). 엽상 잔류량 분석을 통해 시간 경과별 잔류량을 이용하여 시간-살충제 잔류곡선을 추정하였다(Formula 1).

$$C_t = C_0 e^{kt} \quad \text{(Formula 1)}$$

C_t는 시간 t에서의 잔류량이며, C₀는 엽상 잔류 시험에서 처리한 약제 추천 농도이다. k는 추정해야 할 파라미터이며, 살충제의 반감기(t_{1/2})는 식으로부터 ln(1/2)/k가 된다. 각 잔류량 값은 로그 변환한 후 선형모형에 적합시켜 파라미터를 추정하였다. 케이지 접촉 독성 사망 수에 대한 두 가지 약제와 대조구의 차이, 설치 높이에 따른 차이 및 교호작용과 봉군 발달 평가 항목에 대한 두 가지 약제와 대조구의 차이, 차수에 따른 차이 및 교호작용은 정규성 검정 후 R studio 소프트웨어(Ver 1.4.1106)의 이원분산분석을 통해 비교하였다.

결 과

1. 실내 성충 급성 독성

성충 접촉독성의 경우 처리 후 72시간을 기준으로, etofenprox는 추천농도부터 100배 희석한 농도까지 100% 사망률을 보였고 1,000배에서는 72%, 이하 농도에서는 12% 사망률을 보였다. Flupyradifurone은 추천농도에 서만 100% 사망률을 보였고 이하 농도에서는 10~28%의 사망률을 보였다. 이 실험 결과를 통해 추정된 반수 치사약량(LD₅₀)은 etofenprox 0.01~0.012 μg/bee 그리고 flupyradifurone은 1.5~3.1 μg/bee로 나타났다(Table 3).

성충 섭식독성의 경우 처리 후 72시간을 기준으로, etofenprox는 추천농도부터 10배 희석한 농도까지 100% 사망률을 보였고 100~1,000배에서는 60~64%, 이하 농도에서는 4~10%의 사망률을 보였다. Flupyradifurone은 추천농도부터 10배 희석한 농도까지 100% 사망률을 보였고 이하 농도에서는 4~14%의 사망률을 보였다. 이 실험 결과를 통해 추정된 반수치사약량(LD₅₀)은 etofenprox 0.07~0.18 μg/bee 그리고 flupyradifurone은 1~1.3 μg/bee로 나타났다(Table 3).

2. 약제 잔류 패턴

약제 살포 1일 후, etofenprox 5,292 ppb 그리고 flupyradifurone 2,366 ppb이 검출되었다. 2종의 살충제에

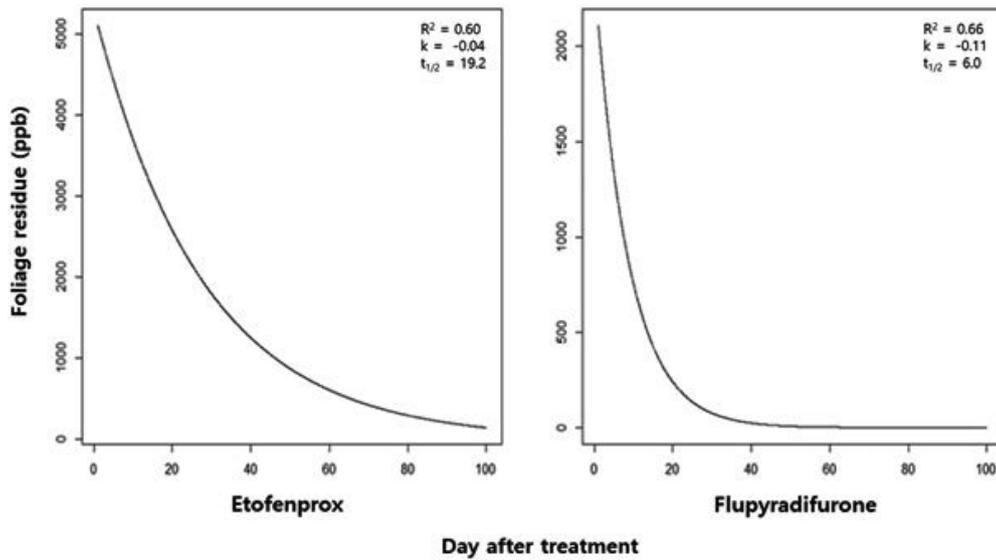


Fig. 1. Residual curves of etofenprox and flupyradifurone estimated from the exposure over time on the buckwheat plants in the greenhouse.

Table 3. Lethal concentration (LC₅₀), lethal dose (LD₅₀) and toxicity level of etofenprox and flupyradifurone to honeybees estimated from contact and oral treatments

Treatment	Pesticides	Hr after treatment	LC ₅₀ (µg/mL)	LD ₅₀ (µg/bee)	Toxicity class (USEPA, 2012)
Contact	Etofenprox	24	2.27	0.012	High
		48	1.798	0.01	High
	Flupyradifurone	24	601	3.1	Moderate
		48	440.9	2.4	Moderate
Oral	Etofenprox	24	12.3	0.18	High
		48	5.94	0.0891	High
	Flupyradifurone	24	80.7	1.3	High
		48	63.13	1.008	High

대한 잔류분포는 선형 모델로 잘 설명되었다($p < 0.05$). 메밀 잎 표면에서 시간 경과에 따른 약제 잔류량으로 추정된 반감기는 etofenprox 19.2일 그리고 flupyradifurone 6일로 추정되었다(Fig. 1).

3. 멀티콧터 살포 야외 접촉 독성

꿀벌 사망률은 1차 실험에서 etofenprox 43%, flupyradifurone 16%, 대조구 19%의 사망률을 보였으며, etofenprox에 노출된 꿀벌의 사망률이 대조구와 flupyradifurone에 노출된 꿀벌들보다 유의미하게 높은 것으로 나타났다. 2차 실험에서 etofenprox 9%, flupyradifurone 8%, 대조구

9%의 사망률을 보였으며, 3차 실험에서 etofenprox 9%, flupyradifurone 8%, 대조구 10%의 사망률을 보였는데 2, 3차 모두 약제 처리나 케이지 설치 높이 및 교호작용에 있어 통계적으로 유의미한 차이는 없었다(Table 4). 1차 실험에서 나타난 사망률은 2차와 3차의 사망률보다 유의미하게 높은 것으로 나타났다(Two-way ANOVA, $p < 0.001$).

4. 멀티콧터 약제 살포 후 봉군 발달

처리 전 봉군당 꿀벌 수 대비 세 차례 처리 후 봉군당 꿀벌 수는 etofenprox 처리구에서는 각각 99, 97, 69%, flupyradifurone 처리구에서는 각각 103, 98, 92% 그리고

Table 4. Two-way ANOVA statistics for the caged honeybee mortalities placed on different heights (2, 9 and 15 m) after multicopter treatments of pesticides (etofenprox and flupyradifurone) conducted 3 times with one-week interval

Spray	Pesticide		Height		Pesticide × Height	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
First	8.33	<0.001	2.70	n.s	0.29	n.s
Second	1.07	n.s	0.04	n.s	0.92	n.s
Third	0.24	n.s	1.08	n.s	0.35	n.s

n.s: not significant

Table 5. Two-way ANOVA statistics for the honeybee colony developmental parameters after multicopter treatments of pesticides (etofenprox and flupyradifurone) conducted 3 times with one-week interval

Colony developments	Pesticide		Repetition		Pesticide × Repetition	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Number of workers	1.18	n.s	2.50	n.s	2.67	<0.05
Brood	0.73	n.s	23.81	<0.001	0.42	n.s
Honey	0.08	n.s	4.50	<0.05	0.04	n.s
Pollen	3.91	<0.05	2.78	n.s	0.80	n.s
Weight	10.68	<0.001	164.22	<0.001	4.26	<0.001

n.s: not significant

대조구에서는 101, 101, 106%로 나타났다. 약제 처리와 차수에 따른 차이는 발견되지 않았으나 약제 처리와 차수의 교호작용이 있는 것으로 나타났다(Table 5). 3차 살포 후 조사한 etofenprox의 성충 수는 2차 살포 후 조사한 etofenprox의 성충 수와 3차 살포 후 대조구의 성충 수에서 각각 유의미한 차이가 있었다(Two-way ANOVA, $p < 0.05$). 봉판 면적의 변화율은 etofenprox 102, 126, 55%, flupyradifurone 106, 146, 84% 그리고 대조구 101, 129, 77%로 나타났으며 약제 처리에 따른 차이는 없었으나, 1차, 2차, 3차 모두 각각 차수에 따른 차이가 있었다(Two-way ANOVA, $p < 0.001$). 벌꿀의 저장 면적은 모두 증가하는 경향을 보였으며 마지막 조사시기에서는 900~1,000%까지 증가하는 것으로 나타나 1차와 2차 각각 3차와 차이를 보였다(Two-way ANOVA, $p < 0.05$). 화분의 저장 면적 또한 모두 증가하는 경향을 보였는데 3차 살포 후 조사에서 etofenprox 105%, flupyradifurone 182% 그리고 대조구 413%로 etofenprox 처리구가 대조구보다 유의미하게 낮게 나타났으며, 1차보다 3차에서 유의미하지는 않지만 높은 경향을 보였다. 봉군의 무게 변화율은 etofenprox 101, 113, 144%, flupyradifurone 99, 126, 143% 그리고 대조구 100, 137, 156%로 나타났으며 두 약제 모두 대조구보다 유의미

하게 낮은 것으로 나타났고 1차, 2차, 3차 모두 각각 차수에 따른 차이를 보였다(Two-way ANOVA, $p < 0.001$).

고 찰

두 종류의 약제로 꿀벌에 미치는 영향을 평가한 결과, etofenprox는 실내 접촉 및 섭식 독성 모두 꿀벌에 대하여 고독성으로 나타났고 잔류기간이 길고 1차 야외 접촉에서 사망률이 높게 나타났으며 화분의 저장량 및 봉군의 무게 또한 차이가 있었다. Flupyradifurone은 실내 섭식 독성에서 꿀벌 고독성으로 나타났지만 꿀벌에 대한 접촉 독성은 중간독성으로 나타났으며 잔류 기간 및 접촉 독성이 낮았고 봉군 무게를 제외한 다른 항목에서는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

급성 성충 독성 실험 결과를 기반으로 추정된 48시간 접촉 반수치사약량은 각각 etofenprox 0.01 µg/bee 및 flupyradifurone 2.4 µg/bee이며 섭식 반수치사약량은 각각 etofenprox 0.0891 µg/bee 및 flupyradifurone 1.008 µg/bee로 추정되었다. 선행 연구에서 etofenprox의 접촉 및 섭식 반수치사약량은 각각 0.015~0.13 µg/bee, 0.014~0.27

$\mu\text{g}/\text{bee}$ 로 추정되었다(Eu, 2013; Sanchez-Bayo and Goka, 2014; APVMA, 2019). Lewis *et al.* (2016)은 flupyradifurone의 접촉 반수치사약량이 $200 \mu\text{g}/\text{bee}$ 이상이고 섭식 반수치사약량은 $1.2 \mu\text{g}/\text{bee}$ 라고 보고하였다. 각 실험에서 반수치사약량의 결과가 다르게 나오는 이유로 실험에 사용한 꿀벌의 연령, 장내 미생물 군집 및 유전적 요인들이 작용할 수 있다. 가이드라인에서는 동일한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 8일령 이상의 성충을 대상으로 규정하고 있다(OECD, 1998a, 1998b). 하지만 Rinkevich *et al.* (2015)은 꿀벌의 유전적 배경과 연령에 따라 약제마다 각각 다른 감수성을 보일 수 있고 시너지 효과 또한 있을 수 있다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 꿀벌의 연령은 우수한 성충을 제외하고 연령의 구분 없이 사용하였다.

Etofenprox 10% 수화제와 20% 유제의 잔류 독성은 각각 10일, 5일 이상으로 평가되었으며 etofenprox가 들어간 혼합 농약이 잔류 독성 기간이 길어 꿀벌 안전 방시간이 긴 것으로 나타났다(Im *et al.*, 2018). 선행 연구들의 결과들을 종합해보면 동일한 약제이더라도 약제의 제형 및 실험 조건에 따라 상이한 잔류 독성 기간이 나타날 수 있다는 것을 알 수 있다.

케이지 접촉 독성 실험에서 1차와 2, 3차 꿀벌의 사망률 차이가 약 8~34% 있었다. 1차와 2, 3차의 약제 살포 시기와 시간에 차이가 발생하였고, 이러한 차이로 인하여 온도와 습도에 차이가 발생하였다. Bagni *et al.* (2022)는 밤나방과의 *Spodoptera littoralis*가 온도에 따라 살충제(Chlorpyrifos)의 감수성이 다르게 나타난다고 보고하였다. 이외에도 점박이응애(Mo *et al.*, 2016), 배추좀나방(Lee *et al.*, 2015) 등 다양한 곤충이 온도와 습도에 따라 다른 살충제의 감수성을 보이는 것으로 나타났다.

약제에 따라 봉군의 봉판 및 화분 저장 면적과 무게에 차이가 발생하였다. Etofenprox 시험구 봉군의 마지막 조사시기 성충 수는 처음 조사 대비 31% 감소한 경향을 보였다. Matsumoto (2013)은 아치사 농도의 etofenprox에 노출된 외역벌들이 봉군으로 귀소행동이 떨어진다고 보고하였다. Cambell *et al.* (2016)은 flupyradifurone을 처리한 봉군의 성충, 알, 유충 및 번데기 수, 먹이 저장과 무게가 대조구의 봉군과 차이가 없었으며, 미국환경보호청(USEPA, 2014)과 유럽식품안전청(EFSA, from EU, 2020)은 외역봉에 아치사 영향이 단기간에는 발생할 수 있지만 장기간으로 봤을 때 봉군 수준에서 영향을 미치지 않는 꿀벌에 위

험이 적다고 보고하였다. 본 야외 실험에 처리된 약량은 무인항공기에 등록된 살포 약량인 $2 \text{L}/10\text{a}$ 보다 2.5배 많은 수준인 $5 \text{L}/10\text{a}$ 를 살포하였다. 야외 항공 살포의 경우, 면적이 ha 수준으로 살포하는 경우가 많지만 실험 여건을 고려하여 실제 살포 면적보다 좁은 10a 에 실험을 하게 되어 충분한 약량을 처리할 필요가 있다고 판단하였다. 따라서 살포 영향에 있어서는 가혹 조건에서의 결과로 볼 수 있지만, 광범위 잔류 영향 측면에서는 면적이 작기 때문에 저평가 조건에서의 결과로 볼 수 있다.

본 연구를 통해 두 약제의 꿀벌 실내 및 야외독성을 평가한 결과, flupyradifurone이 상대적으로 꿀벌에 낮은 독성을 보였다. 하지만, 멀티콥터 살포 범위가 꿀벌의 외역 활동보다 적었다는 제한점이 있다. 소나무재선충병 예방을 위한 항공 살포 대상 지역은 소나무림이므로 꿀벌이 약제에 노출될 위험은 적을 수 있지만 밀원지로 이동을 하거나 곳곳에 존재할 수 있는 밀원으로 인해 약제가 노출될 수 있다. 그러므로 더 넓은 살포 범위 아래에서 봉군의 발달을 평가할 필요가 있다. 그리고 가장 꿀벌에 독성이 낮은 것으로 나타난 flupyradifurone의 아치사 영향이 지속적으로 보고되고 있다(Tan *et al.*, 2017; Hesselbach and Scheiner, 2019; Tosi and Nieh, 2019; Al Naggari and Baer, 2019). 그러므로 만성 유충 독성 평가나 더 오랜 기간 꿀벌에 약제를 노출시켜 아치사 영향을 평가할 수 있는 만성독성 시험이 필요할 것으로 보인다.

적 요

성충 접촉독성에서 etofenprox는 꿀벌에 대하여 고독성, flupyradifurone은 중간독성으로 나타났으며 꿀벌 섭식독성에서는 두 가지 약제 모두 꿀벌에 대해 고독성으로 나타났다. 잔류 반감기는 flupyradifurone 6일, etofenprox 19.2일로 나타났다. 야외 멀티콥터 살포를 통한 케이지 사망률은 1차에서 처리 약제에 따른 차이가 있었으며 높이나 처리와 높이의 상호작용은 없었다. 봉군 발달 평가 요소 중 성충 수, 봉판 및 저장된 꿀의 면적은 처리에 따른 차이가 없었으나 저장된 화분의 면적과 무게에서는 차이가 있었다. 결론적으로 두 가지 약제의 실내 독성, 잔류기간 및 야외 독성을 통해 flupyradifurone이 상대적으로 꿀벌의 독성이 낮은 것으로 추정되었다. 하지만 보다 안전한 약제 선

발을 위해 꿀벌에 대한 아치사 영향 또한 평가가 필요하며, 항공방제시 독성 노출을 완화할 수 있는 전략의 수립이 필요하다. 본 연구를 통하여 두 가지 약제의 꿀벌 독성 자료로 사용할 수 있을 것이며 주요 화분매개 곤충인 꿀벌 보호에 기여할 수 있을 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 산림과학원 용역 과제(소나무재선충병 항공방제용 대체 약제의 환경영향 조사)와 이공계대학 중점연구소과제(3P화분매개네트워크, NRF-2018R1A6A1A03 024862)의 지원으로 수행되었습니다.

인용 문헌

- Abrol, D. P. 1993. Insect pollination and crop production in Jammu and Kashmir. *Curr. Sci.* 65(3): 265-269.
- Al Naggar, Y. and B. Baer. 2019. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 9(1): 1-11.
- APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). 2019. Public release summary on the evaluation of the new active etofenprox in the product Trebon Insecticide. APVMA product number 84711.
- Bagni, T., D. Siaussat, A. Maria, P. Couzi, M. Maibèche and M. Massot. 2022. The impact of temperature on insecticide sensitivity depends on transgenerational effects. *Sci. Total Environ.* 851: 158140.
- Benli, A. C. K. 2015. The influence of etofenprox on narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823): Acute toxicity and sublethal effects on histology, hemolymph parameters, and total hemocyte counts. *Environ. Toxicol.* 30(8): 887-894.
- Brandt, A., A. Gorenflo, R. Siede, M. Meixner and R. Büchler. 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86: 40-47.
- Campbell, J. W., A. R. Cabrera, C. Stanley-Stahr and J. D. Ellis. 2016. An evaluation of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) safety profile of a new systemic insecticide, flupyradifurone, under field conditions in Florida. *J. Econ. Entomol.* 109(5): 1967-1972.
- Cho, W. S., D. H. Jeong, J. S. Lee, H. K. Kim, S. T. Seo and G. H. Kim. 2017. Insecticidal activity of Japanese pine sawyer (*Monochamus alternatus*) and toxicity test of honeybee (*Apis mellifera*) using 5 kinds of neonicotinoids. *Korean J. Pestic. Sci.* 21: 33-41.
- EC. 2020. Some facts about neonicotinoids. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en. assessed on 29 January, 2020.
- EPPO. 2010a. Environmental risk assessment scheme for plant protection products, Chapter 10. Risk assessment to honey bees. OEPP/EPPO Bull. 40: 323-331.
- EPPO. 2010b. EPPO standards PP1/170-Test methods for evaluating the side effects of plant protection products on honeybees. OEPP/EPPO Bull. 40: 313-319.
- EU. 2013. EU Regulation No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances Assessment Report. etofenprox Product-type 18 (Insecticide). Austria.
- Hesselbach, H. and R. Scheiner. 2019. The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology* 28(3): 354-366.
- Hopwood, J., A. Code, M. Vaughan, D. Biddinger and M. Shepherd. 2016. How Neonicotinoids Can Kill Bees: The Science Behind the Role These Insecticides Play in Harming Bees. The Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR. P. 76.
- Im, J., Y. G. Kim, K. H. Park, K. Chon, M. K. Paik, H. Lee, J. S. Kim, B. C. Moon, J. A. Oh, H. Y. Ha and J. S. Kim. 2018. Risks and Safety Intervals for Honeybee on the Mixtures of Pesticides for Orchard Area. *Korean J. Pestic. Sci.* 22(1): 33-41.
- Jung, J. K., J. Kim, D. S. Kim and C. E. Jung. 2020. Effect of Pesticide on Biological Traits of an Orb-web Spider, *Trichonephila clavata* Koch (Araneae: Araneidae) in *Pinus densiflora* Forests in Mt. Geumjeong, Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 59(3): 209-215.
- Kang, Y. R. 2021. Evaluation of non target toxicity of chemicals used in control. Master thesis, Andong National University, Republic of Korea.
- KFS (Korea Forest Service). 2023. Korea Forest Service: Aerial Control Statistics. <https://www.forest.go.kr> (Accessed on 1. March 2023).
- Kim, C. J., R. Lee, Y. Xiu, M. Kim and H. J. Shin. 2022. Residual pattern of pesticides drifted by unmanned aerial vehicle (UAV) spraying and drift reduction using maize (*Zea mays* L.). *Korean J. Pestic. Sci.* 26: 103-120.
- Kim, J., S. Nam and J. Song. 2020. Susceptibility of Pine Wood Nematode Vectors to ULV Insecticides Sprayed from an Unmanned Helicopter. *Korean J. Appl. Entomol.* 59(2): 83-91.
- Kiljanek, T., A. Niewiadowska and A. Posyniak. 2016. Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *J. Apic. Sci.* 60(2): 5-24.
- Lee, J. B and Y. Park. 2015. Insecticidal effect of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* ANU1 to *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella* by different tem-

- perature and humidity conditions. Korean J. Pestic. Sci. 19(2): 125-133.
- Lee, S. M., Y. H. Jung, C. S. Jung, D. S. Kim and S. G. Lee. 2019. Control efficacy of aerial spray using unmanned aerial vehicle (drone and helicopter) against Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) in pine forest. Korean J. Pestic. Sci. 23(2): 70-78.
- Matsumoto, T. 2013. Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. Bull. Insectology 66 (1): 1-9.
- Mo, H. H., J. W. Kang, K. Cho, Y. J. Bae, M. G. Lee and J. J. Park. 2016. Analysis of the Effect of Temperature on the Pesticide Efficacy and Simulation of the Change in the Amount of Pesticide Use. Korean J. Environ. Biol. 34(1): 56-62.
- Nauen, R., P. Jeschke, R. Velten, M. E. Beck, U. Ebbinghaus-Kintscher, W. Thielert and G. Raupach. 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. Pest Manag. Sci. 71(6): 850-862.
- OECD. 1998a. Guidelines for the testing of chemicals, Number 213. Honeybees, acute oral toxicity test. Paris, France.
- OECD. 1998b. Guidelines for the testing of chemicals, Number 214. Honeybees, acute contact toxicity test. Paris, France.
- OECD. 2007. Guidance document on the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field Conditions. Number 75. Paris, France.
- OECD. 2013. Guideline for the testing of chemicals, Number 237. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. Paris, France.
- OECD. 2017. Guidelne for the testing of chemicals, Number 245. Honey bee (*Apis mellifera* L.), chronic oral toxicity test (10-day feeding). Paris, France.
- Pisa, L. W., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin and C. A. Downs. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 68-102.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rinkevich, F. D., J. W. Margotta, J. M. Pittman, R. G. Danka, M. R. Tarver, J. A. Ottea and K. B. Healy. 2015. Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. PLoS One 10(10): e0139841.
- Sanchez-Bayo, F. and K. Goka. 2014. Pesticide residues and bees - a risk assessment. PLoS One 9(4): e94482.
- Tan, K., C. Wang, S. Dong, X. Li and J. C. Nieh. 2017. The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. Sci. Rep. 7(1): 1-9.
- Tison, L., S. Holtz, A. Adeoye, Ö. Kalkan, N. S. Irmisch, N. Lehmann and R. Menzel. 2017. Effects of sublethal doses of thiacloprid and its formulation Calypso® on the learning and memory performance of honey bees. J. Exp. Biol. 220(20): 3695-3705.
- Tosi, S. and J. C. Nieh. 2019. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. Proc. R. Soc. B 286(1900): 20190433.
- USEPA. 2012. Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.3030. Honey bee toxicity of residues on place.
- USEPA. 2014. Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (BYI02960). <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2013-0226-0047>.
- van der Sluijs, J. P., N. Simon-Delso, D. Goulson, L. Maxim, J. M. Bonmatin and L. P. Belzunces 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. Curr. Opin. Environ. Sustain. 5(3-4): 293-305.
- van Engelsdorp, D., J. D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen and J. S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. PLoS One 4(8): e6481.
- Villa, S., M. Vighi., A. Finizio and G. Bolchi Serini. 2000. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. Ecotoxicology 9: 287-297.
- Zhong, H., M. Latham, P. G. Hester, R. L. Frommer and C. Brock. 2003. Impact of naled on honey bee *Apis mellifera* L. survival and productivity: aerial ULV application using a flat-fan nozzle system. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 216-220.