

에틸포메이트의 비표적생물에 대한 급성독성 및 sodium silicate의 약해저감 효과

김경남, 이유빈¹, 김유림², 김동현¹, 김채은², 조예린², 박준영³, 유용하³, 이병호, 이성은^{1,2,*}

경북대학교 농산물품질안전성평가연구소, ¹경북대학교 농생명융합공학과,

²경북대학교 응용생명과학과, ³경북대학교 응용생명과학부

Acute toxicity of ethyl formate to nontarget organisms and reduction effect of sodium silicate on ethyl formate-induced phytotoxicity

Kyeongnam Kim, Yubin Lee¹, Yurim Kim², Donghyeon Kim¹, Chaeun Kim², Yerin Cho², Junyeong Park³, Yongha You³, Byung-Ho Lee and Sung-Eun Lee^{1,2,*}

Institute of Quality & Safety Evaluation of Agricultural Product, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

¹Department of Integrative Biology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²Department of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

Contribution to Environmental Biology

- This study provides toxicological aspects of EF on nontarget organisms and crops in agricultural settings.
- A sodium silicate-based method to mitigate the EF-induced phytotoxicity could potentially extend its usage beyond quarantine applications to broader agricultural practices.

*Corresponding author

Sung-Eun Lee

Tel. 053-950-7768

E-mail. selpest@knu.ac.kr

Received: 30 June 2023

Revised: 9 July 2023

Revision accepted: 24 August 2023

Abstract: Ethyl formate (EF) is a naturally occurring insecticidal compound and is used to control pests introduced from abroad, in quarantine, by a fumigation method. In particular, it is mainly used as a substitute for methyl bromide and is less toxic to humans and less harmful to plants. This study aimed to investigate the possible acute toxicity of EF to useful organisms, and how to reduce phytotoxicity in watermelon, zucchini, and oriental melon. After fumigation with EF for 2 h, the LC₅₀ values for earthworms, honey bees, and silkworms were 39.9, 7.09, and 17.9 g m⁻³, respectively. The degree of susceptibility to EF was in the order of earthworms, silkworms, and honey bees based on the LC₅₀ value, and EF fumigation induced stronger acute toxicity to honey bees. Phytotoxicity was observed in watermelon leaves treated with a concentration of 7.5 g m⁻³ EF, and when treated with a concentration of 10.0 g m⁻³, it was confirmed that the edges of watermelon leaves were charred and seemed to be damaged by acids. Zucchini and melon, and other cucurbits, showed strong damage to the leaves when treated with a concentration of 10 g m⁻³, and sodium silicate, at concentrations of 10% and 20%, was used to reduce phytotoxicity. Therefore, acute toxicity towards nontarget organisms and phytotoxicity during the fumigation of EF should be reduced for efficient agricultural pest control.

Keywords: ethyl formate, honey bee, earthworm, silkworm, sodium silicate

1. 서 론

에틸포메이트(Ethyl formate, EF)는 훈증제인 메틸브로마이드(methyl bromide)의 대체제로서 검역 시 다양한 유입 해충의 방제에 사용되어지고 있으며 천연 유래 및 독성이 낮은 이유로 농업해충 방제에도 사용하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 훈증제로서 저곡해충 방제에도 여러 연구를 통하여 사용할 수 있음을 입증하였고 사용 농도는 $50\sim 400\text{ g m}^{-3}$ 수준에서 처리 시간은 24~72시간으로 모든 발달과정의 저곡해충을 박멸할 수 있었다(Muthu *et al.* 1984; Agarwal *et al.* 2015; Kwon *et al.* 2022a). 이러한 에틸포메이트를 시설하우스 농업해충에 대한 새로운 방제 전략으로 제안하여 참외, 오이, 토마토 및 고추 재배농가에서 네 종류의 해충을 방제하는 연구를 실시하여 오이총채벌레, 담배가루이, 복숭아혹진딧물, 점박이응애 등에 대하여 1.5 g m^{-3} 의 수준으로 12시간 훈증처리하였을 때 담배가루이와 복숭아혹진딧물은 93.3% 이상의 살충 효과를 나타내었으나 점박이 응애의 살충률은 20% 미만이었다(Kwon *et al.* 2019).

또 다른 연구에서 Kwon *et al.* (2022b)은 에틸포메이트의 담배가루이에 대한 약효와 이에 따르는 약해를 관찰하기 위하여 세 가지 훈증 시간(각각 2, 4 및 12시간)에 박과 작물인 참외를 노출시켰으며 모든 처리구에서 참외에 대한 식물독성은 관찰되지 않았다. 그러나, 농업환경에서 발생하는 대표적인 농업 해충인 총채벌레류를 방제하기 위해서는 담배가루이 및 진딧물류보다는 상대적으로 높은 에틸포메이트 처리 농도가 필요한 실정이다(Kim *et al.* 2023b). 따라서, 에틸포메이트의 시설하우스 농업의 적용 가능성을 넓히기 위하여 기존 연구를 통하여 적용 시도 중인 작물들 중 대표 박과 작물인 수박, 애호박, 참외 등에 대한 에틸포메이트의 식물독성을 나타내는지 조사하여야 할 것으로 사료된다.

기존 검역훈증제로 사용되는 에틸포메이트에 의한 수입묘목류에 대한 식물독성 연구는 일부 수행된 바 있다(Kyung *et al.* 2019). 이때 에틸포메이트에 의하여 묘목류의 잎에 강한 약해를 보였다는 보고는 있으나, 에틸포메이트의 식물독성 기작 연구는 많은 연구가 필요한 실정이다. 에틸포메이트는 물과 만나면 쉽게 가수분해되어 formic acid와 ethanol로 가수분해되는 특성이 있다(Mata-Segreda 2000). 훈증제의 특성상 기체상태로 훈증 후 식

물체에 잔류하는 특성을 가지지 않는다고 연구된 바 있으며(Jeon *et al.* 2022), 에틸포메이트보다는 가수분해 산물의 형태로 잎에 잔류하여 약해를 유발할 수 있다고 판단된다. 이를 활용하여 에틸포메이트의 가수분해 산물 중 산 스트레스를 유발할 수 있는 포름산(formic acid)을 제거하는 전략을 통하여 식물독성을 저감할 수 있을 것으로 예상된다.

또한, 신규농약 및 이들의 제형을 농업해충 방제에 사용할 때 비표적생물체에 대한 독성 효과를 측정하여 이들의 사용으로 인한 생태계 및 환경영향을 평가한다. 예로써, 1990년대 도입된 네오니코티노이드(neonicotinoids) 살충제의 경우 종자처리를 위하여 사용하는데 종자드레싱이 마모되어 다량의 살충제를 함유한 먼지가 방출될 수 있음을 확인하였고 이로 인한 꿀벌에 대한 급성독성을 측정하였다(Lentola *et al.* 2020). 이 연구를 통하여 메티오카브(methiocarb)는 LD₅₀ 값으로 꿀벌당 421~693 ng을 나타내었고 반면에 티아클로프리트(thiacloprid) 약제는 꿀벌당 16.9×10^3 ng으로서 낮은 독성을 나타내었다. 따라서, Lentola *et al.* (2020)은 새로운 종자 코팅 살충제 또는 제제의 사용승인을 위한 비표적생물에 대한 독성평가가 필요함을 제안하였다. 비슷하게 산림환경에 항공 살포된 cyfluthrin 및 tritrichlorfon의 수서생물에 대한 급성독성을 평가하였는데 두 살충제가 살포된 지역의 수서곤충의 다양성 정도의 차이가 발견되었으며 어류에 대한 치사율은 발견되지 않았다(Lee *et al.* 1989). 이와 같이 사용될 농약원제에 대한 환경 중 비표적생물에 대한 독성을 측정하는 것과 함께 이미 사용되는 농약원제에 대한 노출 시간 변화에 따른 급성독성 평가도 실시된 바 있다(Park *et al.* 2017). 노출 시간을 48시간과 96시간으로 설정한 후 잉어(*Caprinus carpio*)에 대하여 1,483종의 살충제에 의한 치사율을 측정된 결과, 1등급(LC₅₀ < 0.5 mg L⁻¹)으로 분류되는 농약은 203종류였으며, 2등급(0.5 ≤ C₅₀ < 2 mg L⁻¹)으로 분류되는 농약은 1,043개였다. 그러나, 노출 시간에 따른 독성 값의 변화는 없었으며 48시간 내 독성의 발현이 완료되는 것으로 판단되었다(Park *et al.* 2017).

이렇게 농약의 원제 및 선도물질의 유용생물 및 비표적생물에 대한 독성평가를 위하여 육상생태계 중 줄지렁이(*Eisenia fetida*)를 이용하는 연구 사례가 소개되었다. 지렁이는 농업토양의 질을 향상시키는 데 큰 기여를 하는 것으로 알려져 있으므로 이에 대한 독성은 장기적으로 농업재

배환경에 부정적인 영향을 준다. 줄지렁이에 대한 엔도설판(endosulfan)의 영향은 인공토양에서 LC₅₀ 값이 9.7 mg kg⁻¹이었으며 이러한 독성은 fluorene 및 phenanthrene 과의 복합독성에서 상승 효과가 관측되기도 하였다(Nam *et al.* 2017). 이와 비슷하게 45개 농약의 지렁이 급성독성을 여과지접촉시험법(Filter paper contact test)을 이용하여 측정한 연구에서는 clothianidin, fenpyroximate, pyridaben의 경우 줄지렁이에 대하여 상당히 강한 독성을 나타내었고 LC₅₀ 값은 0.28부터 0.72 mg cm⁻²의 범위로 나타났다(Wang *et al.* 2012).

본 연구는 에틸포메이트를 농업해충 방제를 위한 훈증제로 사용하기 위하여, 환경생물독성 평가항목에 포함된 생물종이며 비표적생물인 줄지렁이, 누에, 꿀벌에 대한 독성을 측정하였으며 에틸포메이트의 훈증방제 시 발생가능한 식물독성을 측정하기 위하여 수박, 애호박, 참외를 사용하였고, 이에 의해 발생한 식물독성의 저감화 효능평가를 위하여 에틸포메이트의 가수분해 산물 중 하나인 포름산을 제거할 수 있는 sodium silicate를 이용하여 약해저감화 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용물질

실험에 사용한 ethyl formate (EF)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, sodium silicate powder (Na₂Si₃O₇)는 덕산약품공업(Duksan Pure Chemicals Co., Ltd., Ansan, Korea)에서 구매하여 사용하였다.

2.2. 지렁이, 꿀벌, 누에 사육 및 급성독성시험

2.2.1. 지렁이

실험에 사용한 줄지렁이(*E. fetida*)는 시중에서 2 kg 상당을 구입하였고, 중량이 300~600 mg으로 환대가 잘 발달된 성체만을 선택하였다. 배양에 이용한 토양은 지렁이 분변토와 바이오상토(Hungnong Seed Co., Ltd., Korea)를 혼합 조제 후 사용하였다. 사육기간 중의 실내 온도는 23 ± 2°C, 수분은 65 ± 5%를 유지시켰다. 지렁이에 대한 EF 급성독성시험은 OECD guideline 207에 따라 진행되었다. 실험에 사용한 인공토양 조건은 cocopeat 1 kg, industrial sand 7 kg, kaolin 2 kg, CaCO₃ 20 g을 혼합하여 pH 값을

6.0 ± 0.5 범위로 조정하였으며 수분함량은 토양 건조중량의 35%로 설정하였다. 일정농도당 500 mL 비커에 인공토양을 400 g씩 넣고 줄지렁이 개체 10마리씩 3반복하여 담아 총 30마리를 처리하였으며, 23 ± 2°C, 50% 이상의 습도 및 암조건을 유지하여 훈증 후 14일 후 치사율을 측정하여 기록하였다. 치사개체 측정은 물리적 자극에 반응하며 이동이 가능한 개체는 생존한 것으로 판단하여 치사율을 측정하였다.

2.2.2. 꿀벌

경남농업기술원 유용곤충연구소(Edible Insect Research Institute of Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Jinju, Korea)에서 꿀벌(*Apis mellifera*) 성충 약 1,000마리를 분양받아 온도 25°C, 상대습도 35% 조건에서 먹이를 공급하여 사육하였다. 꿀벌에 대한 EF 급성독성시험은 처리농도당 꿀벌 성충 40마리씩 Insect breeding dish (SPL Life Science, Inc., Pocheon, Korea)에 3반복하여 나눠 담고 총 120마리를 처리하였으며, 훈증처리 후 실내 온도는 25 ± 2°C, 수분은 60 ± 5%를 유지시켜, 48시간 후 치사율을 측정하여 기록하였다.

2.2.3. 누에

경남농업기술원 유용곤충연구소(Edible Insect Research Institute of Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Jinju, Korea)에서 누에(*Bombyx mori*) 알을 제공받아 온도 15°C, 상대습도 75% 조건에서 부화하였으며, 이후에는 온도 24 ± 1°C, 상대습도 80 ± 5%를 유지하여 사육한 후 실험에 사용하였다. 누에에 대한 EF 급성독성시험은 처리농도당 누에 3령 30마리씩 insect breeding dish에 3반복하여 나눠 담고 총 90마리를 처리하였으며, 훈증처리 후 온도는 24 ± 1°C, 상대습도 80 ± 5% 유지시켜 48시간 후 치사율을 측정하여 기록하였다.

2.3. EF 훈증처리

EF(액상, 99%)를 이용하여 지렁이, 꿀벌 성충, 누에 3령을 대상으로 훈증처리 실험을 수행하였다. 액상 EF를 처리하기 위해 6-L 또는 12-L 테스케이터 lid 윗부분에 각각 filter paper를 꽂은 후, syringe를 이용하여 농도별로 처리하여 기화하는 방식을 사용하여 2시간 처리하였다. 훈증처리의 농도와 처리 시간은 해충방제에 효과적인 것으로 알

려진 조건을 사용하였다. 지렁이에 대한 EF 혼증은 1~60 g m⁻³ (0, 1, 5, 10, 20, 40, 60 g m⁻³), 꿀벌은 0.25~15 g m⁻³ (0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 g m⁻³), 누에는 0.5~40 g m⁻³ (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 40 g m⁻³)의 농도 범위로 2시간 처리하였다. 지렁이, 꿀벌은 12-L 데시케이터를 사용하였고, 누에는 6-L 데시케이터를 사용하여 혼증처리하였다. 데시케이터 내 EF 혼증처리 농도를 확인하기 위하여 가스 시료를 각 시간마다 1-L Tedlar sample bag with polypropylene fitting (SKC Inc., USA)에 50 mL syringe를 이용하여 100 mL씩 포집하였고, 혼증 후 0.5, 1, 2시간에 채취한 시료를 HP-1 column (30 m length × 250 µm internal diameter × 0.25 µm film)이 장착된 gas chromatography coupled with flame-ionization detector (GC-FID, Agilent 6890N; Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 또한 기기의 오븐 온도는 100°C, 주입구 온도는 250°C, 검출기 온도는 290°C로 설정하였다. 포집한 가스의 EF 농도는 external standards에 대한 피크 면적을 기준으로 계산되었고, Concentration × Time (CT) 값을 이전 연구에 사용한 수식을 사용하여 산출하였다(Kim *et al.* 2021a). 혼증처리 후 데시케이터를 완전히 개방하여 환기를 실시하였으며 각각 공시충의 치사율 값을 평가하였다.

박과작물 3종에 대한 EF 혼증은 275-L 데시케이터에서 7.5, 10 g m⁻³의 농도로 2시간 동안 이루어졌다. 데시케이터에는 팬을 장착하여 혼증제가 내부에서 잘 기화될 수 있도록 하였으며 대조군 개체는 EF에 노출되지 않았다. 처리된 EF의 농도 측정을 위해 275-L 데시케이터의 가스를 혼증처리 후 30 분, 1시간, 2시간 간격으로 1-L Tedlar sample bag에 포집하였고, 이를 GC-FID로 분석하여 CT 값을 위와 동일하게 산출하였다.

2.4. 작물 생육 및 생육조건

본 실험에서는 수박, 애호박, 참외의 박과 작물 3종을 사용하여 실험을 진행하였다. 수박(*Citrullus lanatus* L.)은 농우바이오(Nongwoo Bio Co., Ltd., Suwon, Korea)로부터 종자를 구입하였고, 애호박(*Cucurbita moschata* Duchesne)은 아시아종묘(Asia Seed Co., Ltd., Seoul, Korea), 참외(*Cucumis melo* L. var *makuwa*)는 진흥종묘(Jin Hung Seed Co., Ltd., Pyeongtaek, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 구입한 종자들은 실내 생육실에서 상대 습도 60%, 온도 25 ± 1°C, 16 : 8 (light : dark)의 광주기 조

건으로 파종에서부터 3~4주 정도 재배한 개체를 실험에 사용하였다. EF 혼증처리 후 약해평가 기간 동안 작물들은 동일한 조건에서 유지되었다.

2.5. Sodium silicate 전처리 시 약해저감 효과

Sodium silicate (SS)를 전처리하여 EF로 인해 발생하는 약해의 저감 정도를 확인하기 위해 먼저 수박을 대상으로 실험을 진행하였다. 수박 한 개체 내에서 전처리를 하는 실험군 영역과 전처리를 하지 않는 대조군 영역으로 나누어 전처리 영역에만 SS를 처리하고 EF 혼증처리하였다. 전처리 용액은 증류수에 SS를 녹여 10%와 20%의 용액을 만들었으며 95°C에서 중탕하여 완전히 녹여주었다. 이후에 상온에서 충분히 식혀서 사용하였다. 전처리 시 대조군 영역은 비닐로 감싸 덮은 채로 전처리 영역에 10%와 20% SS 용액을 각각 분무하였다. 대조군 영역에는 동일하게 증류수를 분무하였고 2시간 이상 상온에서 풍건하여 작물 표면의 수분을 날려주었다. EF 혼증은 7.5와 10 g m⁻³ 농도로 처리하였다. EF 혼증이 끝나고 데시케이터를 개방하여 30분 동안 환기시켰다. 개체들은 이후 생육실로 옮겼고 관찰이 끝나는 7일차까지 유지하였다. 7일차에는 약해 정도를 비교하기 위해 각 처리그룹별로 잎을 잘라 관찰하고 사진 촬영하였다. 또한 EF 혼증으로 인한 현상을 더 자세히 관찰하기 위하여 잎의 표면을 관찰하였다. 잎 표면은 ZEISS사(Carl Zeiss Co., Ltd., Oberkochen, Germany)의 axiocam ERc 5s가 장착된 stemi 305 실체현미경을 사용하여 사진을 촬영하였다.

다른 박과작물 2종인 애호박과 참외에 대한 SS 전처리의 약해 저감 정도를 확인하기 위해 전과 동일하게 실험을 진행하였다. 예비실험과는 다르게 EF 처리 농도마다 전처리를 하는 실험군 개체와 전처리를 하지 않는 대조군 개체를 따로 두고 EF 혼증처리하였다. 모든 그룹은 3반복으로 실험하였다. 실험군 개체에는 20% SS 용액을 분무하였고 대조군 개체에는 증류수를 분무하였다. 이후 상온에서 충분히 풍건하여 작물 표면의 수분을 제거한 뒤 EF 혼증처리하였다.

2.6. 통계 분석

혼증처리 농도에 따른 치사율을 이용하여 SAS software version 9.4 (SAS 9.4, Cary, NC. SAS Institute Inc.)의 probit analysis를 통해 95% 신뢰구간의 lethal concentration (LC)과 lethal concentration-time (LCT)을 산출하였다.

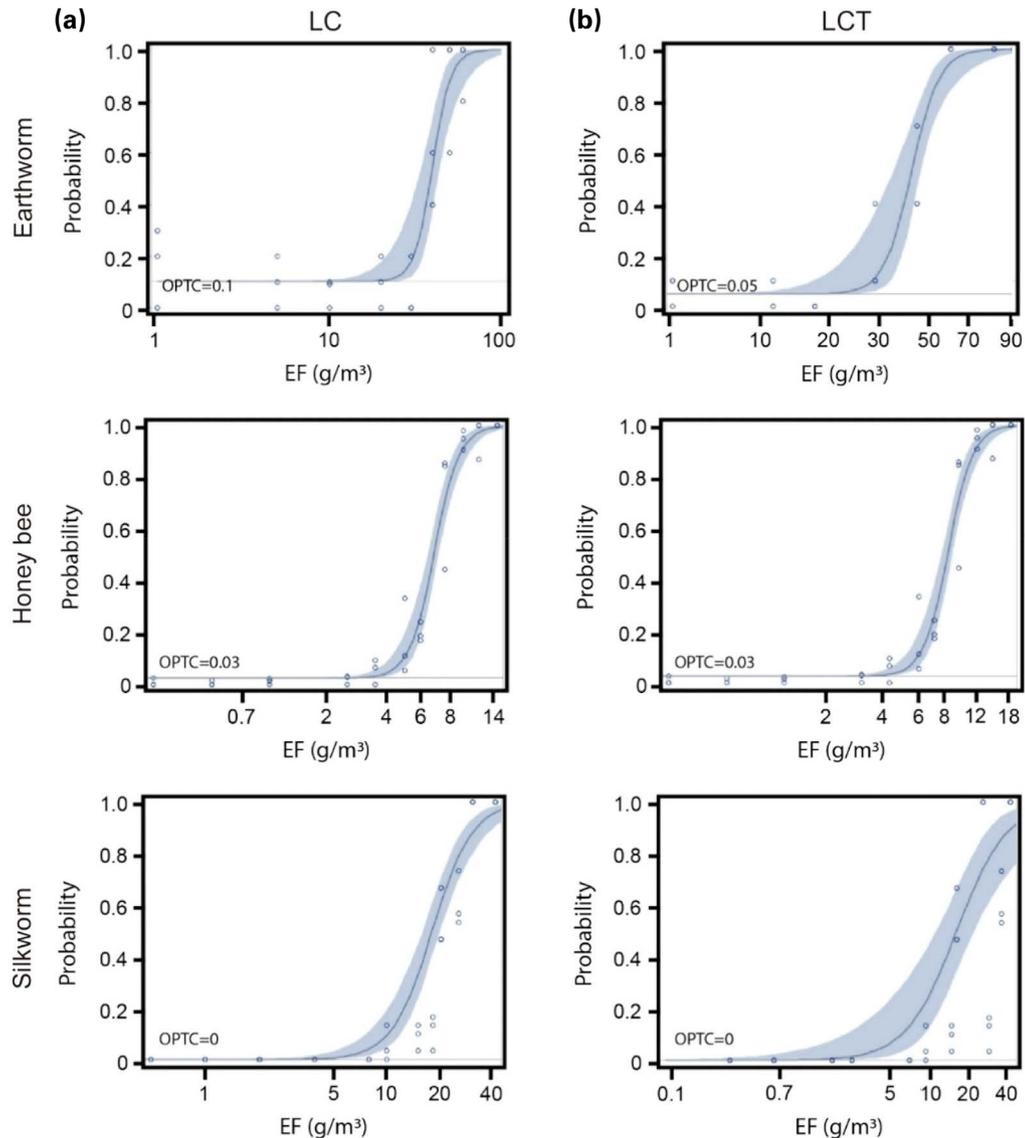


Fig. 1. Probit analysis of the mortality data from acute toxicity tests of earthworms and beneficial insects (honey bees and silkworms). Predicted probabilities for response were estimated by statistical analysis with (a) lethal concentration (LC) and (b) lethal concentration-time (LCT) values based on mortality ratio after fumigating with ethyl formate (EF) 2 h.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지렁이 및 유용곤충 2종(꿀벌, 누에)에 대한 급성독성시험 결과

EF 훈증제 사용 시 토양 환경과 생태계에 미칠 영향을 평가하기 위해 비표적생물종 중 지렁이 및 유용곤충에 해당하는 꿀벌, 누에에 대한 급성독성시험을 수행하였다. EF 2시간 훈증처리 시 지렁이, 꿀벌, 누에에 대한 LC_{50} 값은 각각 39.9, 7.09, 17.9 $g\ m^{-3}$ 였다(Table 1, Fig. 1a). 또한

LC_{99} 값의 경우는 지렁이, 꿀벌, 누에에 대해서 각각 70.2, 13.9, 57.7 $g\ m^{-3}$ 였다. 지렁이와 누에에 대한 EF 급성독성은 꿀벌에 비해 낮게 나타남을 확인하였다. EF에 대한 감수성 정도가 LC_{50} 값 기준 지렁이, 누에, 꿀벌 순으로 낮게 나타났으며 지렁이, 누에는 각각 꿀벌 LC_{50} 값의 약 5.6배와 2.5배에 해당하였다(Table 1). EF 2시간 훈증처리 시 지렁이, 꿀벌, 누에에 대한 LCT_{50} 값은 LC_{50} 값과 비교하였을 때 유사한 값을 가지는 것으로 나타났으며 각각 39.4, 6.49, 15.8 $g\ h\ m^{-3}$ 로 도출되었다(Table 2, Fig. 1b). 또한

Table 1. Lethal concentration (LC) values and probit results after ethyl formate (EF) fumigation against earthworms and beneficial insects (honey bees and silkworms) for 2 h

Organism	LC _x (g m ⁻³ , 95% CI)					Slope ± SE	df	χ ²
	10	25	50	90	99			
Earthworm	30.5 (20.1–35.2)	34.9 (26.6–39.1)	39.9 (34.2–44.8)	52.3 (46.3–71.5)	70.2 (57.3–134)	-30.0 ± 8.06	22	45.7
Honey bee	5.14 (4.39–5.67)	6.04 (5.41–6.51)	7.09 (6.59–7.56)	9.79 (9.03–11.1)	13.9 (12.1–17.6)	-13.4 ± 1.81	31	81.7
Silkworm	10.2 (7.66–12.1)	13.5 (11.2–15.3)	17.9 (15.8–20.0)	31.3 (27.0–39.9)	57.7 (44.1–92.9)	-11.3 ± 1.67	34	134

Table 2. Lethal concentration-time (LCT) values and probit results after ethyl formate (EF) fumigation against earthworms and beneficial insects (honey bees and silkworms) for 2 h

Organism	LCT _x (g h m ⁻³ , 95% CI)					Slope ± SE	df	χ ²
	10	25	50	90	99			
Earthworm	30.3 (20.1–34.9)	34.6 (26.2–38.4)	39.4 (33.8–42.8)	51.3 (46.9–63.4)	68.3 (57.7–113)	-30.8 ± 8.42	22	19.0
Honey bee	4.60 (3.85–5.10)	5.46 (4.59–5.91)	6.49 (6.00–7.06)	9.16 (8.18–11.2)	13.3 (11.0–19.2)	-11.9 ± 1.87	31	122
Silkworm	6.05 (6.06–9.20)	9.78 (5.10–13.5)	15.8 (11.0–21.9)	41.1 (27.9–104)	117 (59.4–751)	-6.33 ± 1.58	34	417

LCT₉₉ 값의 경우 지렁이, 꿀벌, 누에에 대해서 각각 68.3, 13.3, 117 g h m⁻³로 누에가 지렁이보다 높은 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다. LCT₅₀ 값 기준 EF에 대한 감수성 정도는 지렁이, 누에, 꿀벌 순으로 낮게 나타났으며 지렁이, 누에가 각각 꿀벌 LCT₅₀ 값의 약 6.0배, 2.4배 정도였다 (Table 2). 도출된 LC와 LCT 값을 종합하여 보았을 때, 훈증 2시간 처리 시 꿀벌이 지렁이, 누에에 비해 EF에 대한 급성독성이 더 강하게 나타남을 알 수 있다.

검역 훈증제로 사용되어오던 EF 훈증제의 사용이 최근 들어 농업 환경 중 해충 방제를 위해 비닐하우스에 적용하려는 시도가 있다 (Kwon *et al.* 2022b; Kim *et al.* 2023b). 비닐하우스 재배 참외에 영향을 주는 담배가루이 (*Bemisia tabaci*) 방제를 위해 EF 훈증처리 시 LCT₉₀ 기준으로 2시간 처리 시 1.67 g h m⁻³, 4시간 처리 시 2.08 g h m⁻³ 방제가를 보였다 (Kwon *et al.* 2022b). 또 다른 연구에서는 망고의 비닐하우스 재배 시 발생할 수 있는 볼록총채벌레 (*Scirtothrips dorsalis*)의 방제를 위해 EF 훈증제를 사용하

는 시도가 있었다 (Kim *et al.* 2023b). 본 연구에서는 볼록총채벌레의 완전 방제가인 LCT₉₉ 기준으로 4시간 처리 시 17.10 g h m⁻³ 방제가를 보였다. 이와 같은 EF 훈증제의 농업적 이용을 위해서는 농업 환경에 존재할 수 있는 유용 곤충 및 토양 내 주요 지표 생물인 지렁이에 대한 독성 영향 평가가 필수적이다. 따라서, 본 연구에서 확인한 EF 훈증제에 의한 급성독성 결과를 실제 현장에서 적용하려는 LCT 방제가와 비교해 보면, 담배가루이를 방제하기 위한 CT 1.67~2.08 g h m⁻³는 지렁이, 꿀벌, 누에에 대한 독성 영향이 모두 LCT₁₀ 이하로 매우 독성이 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Table 2). 반면, 상대적으로 높은 방제가를 보이는 볼록총채벌레의 경우 LCT₉₉ 값 기준 17.10 g h m⁻³은 지렁이와 누에의 경우 LCT₉₉ 값보다 현저히 낮은 값으로 두 가지 종에는 영향을 끼치지 않을 것으로 판단된다 (Table 2). 그러나, 꿀벌의 경우 볼록총채벌레 LCT₉₉ 방제가를 처리하였을 때 꿀벌의 LCT₉₉인 13.3 g h m⁻³을 넘을 것으로 예상되어, 꿀벌의 활동이 활발한 낮 시간 대의 EF의 훈증처

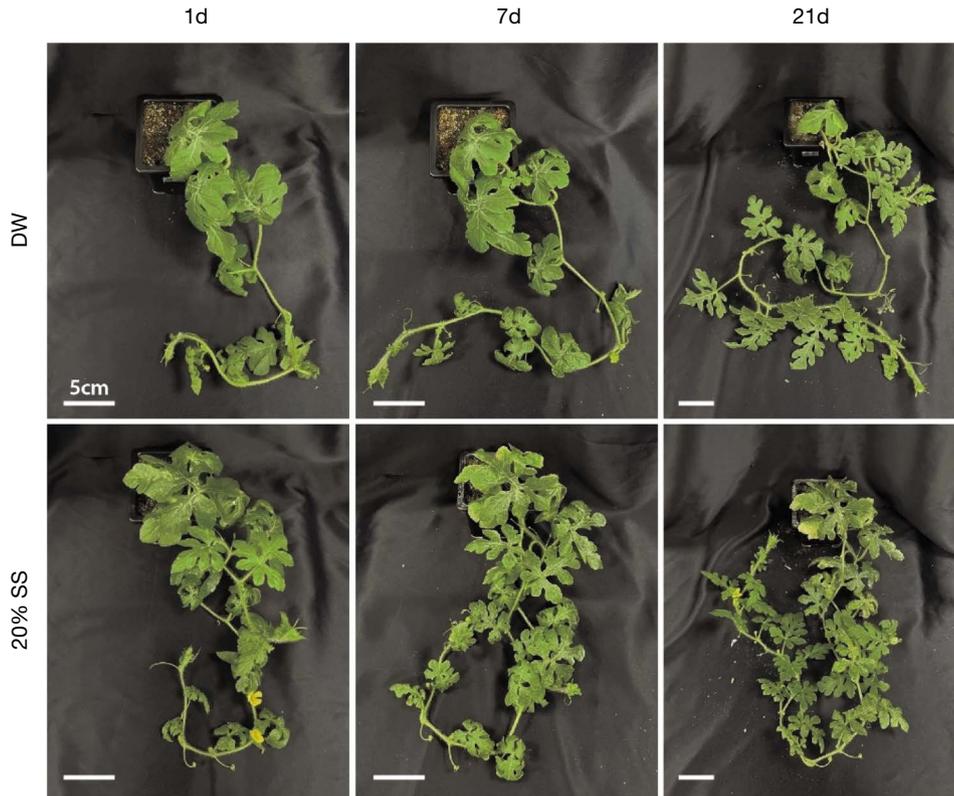


Fig. 2. Evaluation of sodium silicate (SS) phytotoxicity in watermelon. Distilled water (DW) or 20% SS solution was sprayed, and then the plants were photographed at 1, 7, and 21 days after pretreatment. The scale bar means 5 cm.

리는 꿀벌에게 큰 영향을 끼칠 수 있음을 시사한다. 그러나, EF는 타농약과 달리 훈증형태로 처리되며 환기를 시킨 뒤 수 시간 안에 작물이나 토양에 잔류하지 않는 매우 큰 장점을 가지고 있다(Jeon *et al.* 2022). 이러한 EF의 무잔류 특성은 농업용으로 사용되고 있는 네오니코티노이드(neonicotinoids) 살충제 등에 특히 영향을 많이 받고 있는 비표적생물인 꿀벌에게 큰 장점으로 작용할 수 있다고 판단된다. 따라서, EF 훈증처리 시 농업환경 중에 존재할 수 있는 비표적생물에 해당하는 다양한 꿀벌, 누에 및 지렁이에 대한 영향 평가를 이용하여, 훈증처리 시간대 설정 및 처리 농도에 대한 다양한 연구가 추가적으로 필요하다고 판단된다.

3.2. Sodium silicate (SS) 전처리를 통한 EF 약해저감 효과

EF 약해저감 실험에 앞서 전처리 물질인 SS에 의한 약해의 유무를 확인하기 위하여 수박 개체에 최고 처리 농도인 20% SS 용액을 분무하여 21일차까지 관찰하였을 때, 대조

구 개체와 큰 차이 없이 개체가 잘 성장하며 약해가 없음이 확인되었다(Fig. 2). 훈증처리 후 7일차에 관찰한 결과, 수박에서는 7.5 g m^{-3} 농도로 처리된 개체에서 잎의 가장자리에서 약해가 관찰되었다(Fig. 3a). 이러한 약해는 10 g m^{-3} 농도로 처리된 개체에서 더 심하게 나타났으며, 잎의 가장자리가 까맣게 시들고 잎이 마르는 현상이 확인되었다. SS를 10% 혹은 20% 전처리한 경우, 약해 정도가 대조구 개체와 비교하였을 때 상대적으로 감소하였고, 수박 잎에 강한 약해를 보이는 EF 10 g m^{-3} 농도처리구에서도 20% SS 처리 시 약해저감 효과가 더 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3a). EF 10 g m^{-3} 농도로 처리된 잎에서 약해가 나타난 영역의 모용(trichome)에 흰색의 반점 형태로 특이증상이 나타났 다(Fig. 3b). 반면, 20% SS를 전처리한 잎은 얇은 막이 형성되어 있는 현상을 보였으며, EF 10 g m^{-3} 농도로 훈증처리 된 후 약해 현상이 감소하였다(Fig. 3b).

이를 또 다른 박과 작물인 애호박과 참외에 적용하여 SS 전처리의 EF 약해저감 효능을 평가하였다(Fig. 4). 그 결과 EF 10 g m^{-3} 농도처리 시 잎에 강한 약해를 보였으며, 20%

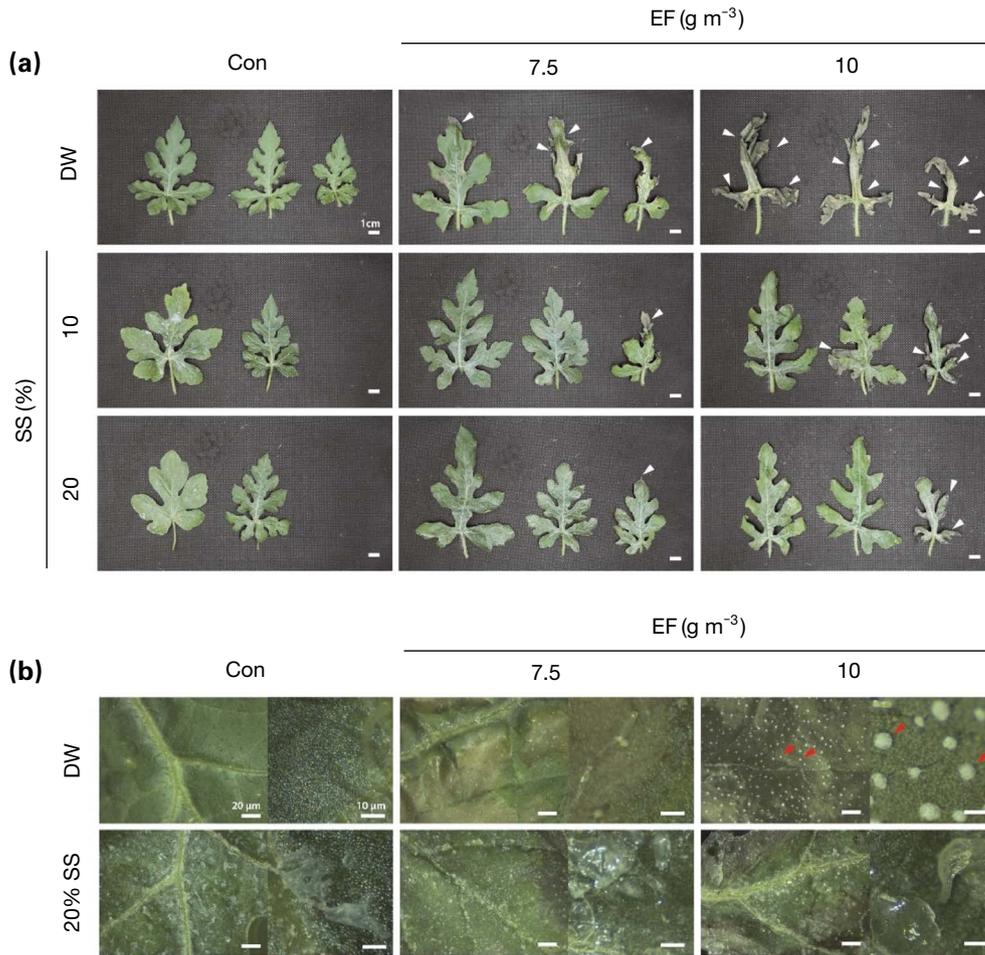


Fig. 3. Evaluation of ethyl formate (EF)-induced phytotoxicity reduction effect after sodium silicate (SS) pretreatment in watermelon. Phenotypes of watermelon (a) whole leaves and (b) leaf micrographs, 7 days after EF fumigation (EF 7.5 g m⁻³, CT 8.58 g h m⁻³; EF 10 g m⁻³, CT 11.4 g h m⁻³). (a) The white triangles point to areas of phytotoxicity. The scale bar means 1 cm. (b) The red triangles point to areas where the trichome is damaged. The scale bar means 20 μm on the left and 10 μm on the right image.

SS 전처리구에서도 큰 약해저감 효과를 보이지 않았다. 반면, EF 7.5 g m⁻³ 농도처리 시에는 수박과 유사하게 20% SS 전처리 시 EF에 의한 약해가 눈에 띄게 감소되는 현상을 보였다(Fig. 4). 수박과 다르게 애호박과 참외 잎에서의 EF의 약해는 잎 가장자리가 아닌 잎 전체에 영향을 주는 형태로 약해를 보였으며, 줄기나 잎맥 주변의 잎에는 영향을 주지 않는 패턴을 보였다(Figs. 3a, 4). 또한, 잎 표면의 SS 전처리 시 잎에 남아있는 SS의 형태가 큰 차이를 보였다. 수박 잎 표면에서는 잎 전체에 고르게 코팅되어진 상태로 존재하며 EF 훈증 후에도 그 현상이 유지된 반면, 애호박과 참외 잎 표면에서의 SS 전처리의 경우 잎 표면 전체에 코팅이 되기보다는 부분 코팅이 되어 있는 형태를 관찰할 수 있었다(Figs. 3b, 5). 또한, EF에 의한 약해는 훈증 직후에

는 확인되지 않다가 훈증 후 1일차부터 눈에 띄게 발견된다. 이는 훈증 중에 수분을 포함하고 있는 잎 표면에서 EF의 가수분해반응이 일어나 포름산과 에탄올로 일부 잔류할 수 있다고 판단되는데 이 중 포름산으로부터 발생하는 지속적인 산 스트레스가 약해의 원인으로 판단된다.

종합적으로, 박과 작물 3종 중에서 수박 잎에서의 EF 훈증에 의해 발생하는 약해를 SS 전처리를 통하여 약해저감 효과가 가장 좋았으며, 이는 잎에 SS 전처리 시 잎 전체에 고르게 코팅되어 발리는 차이로 인한 약해저감 효과라고 판단된다. 에틸포메이트의 SS 전처리에 의한 약해저감 효과는 메틸브로마이드나 포스핀 훈증제의 약해저감법과는 상이한 방식을 사용하였다(Kim *et al.* 2021b, 2023a). 이는 훈증제 별로 유사한 약해기작을 보이는 부분도 존재하

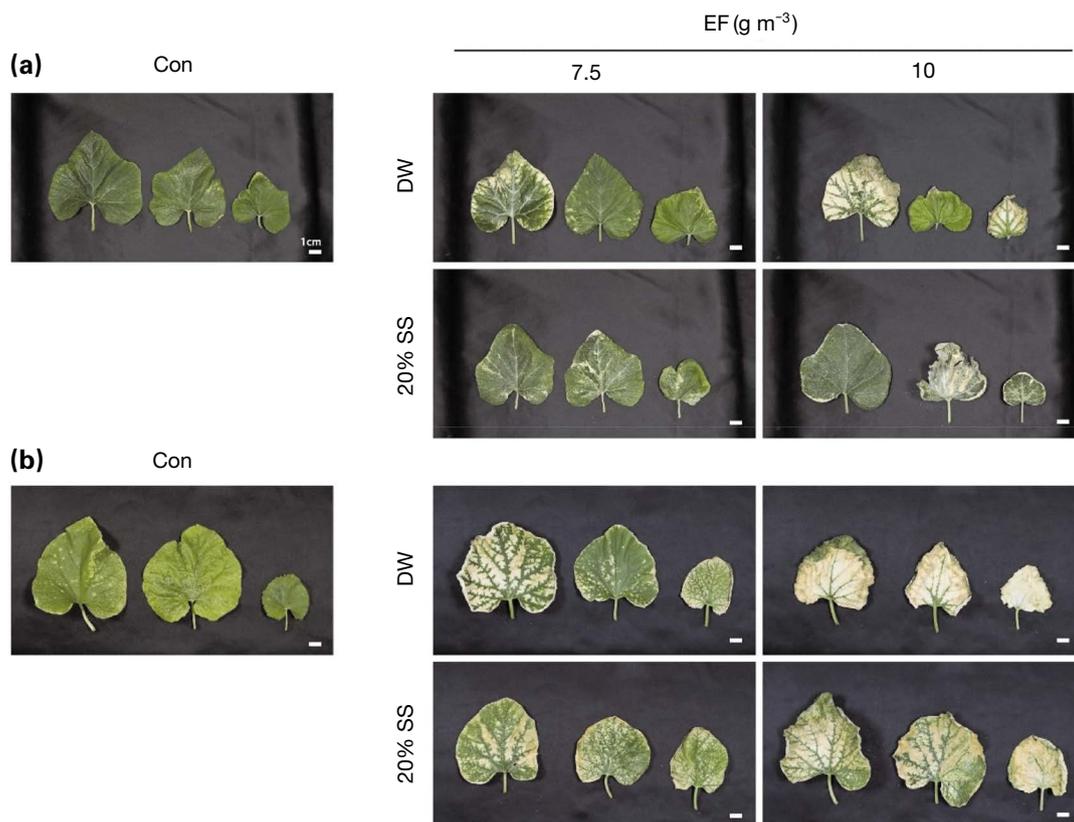


Fig. 4. Evaluation of ethyl formate (EF)-induced phytotoxicity reduction effect after sodium silicate (SS) pretreatment in zucchini and oriental melon. Phenotypes of (a) zucchini and (b) oriental melon whole leaves photographed 7 days after ethyl formate (EF) fumigation (EF 7.5 g m⁻³, CT 10.4 g h m⁻³; EF 10 g m⁻³, CT 12.0 g h m⁻³). The control leaves (CON) were pretreated with 20% SS. The scale bar means 1 cm.

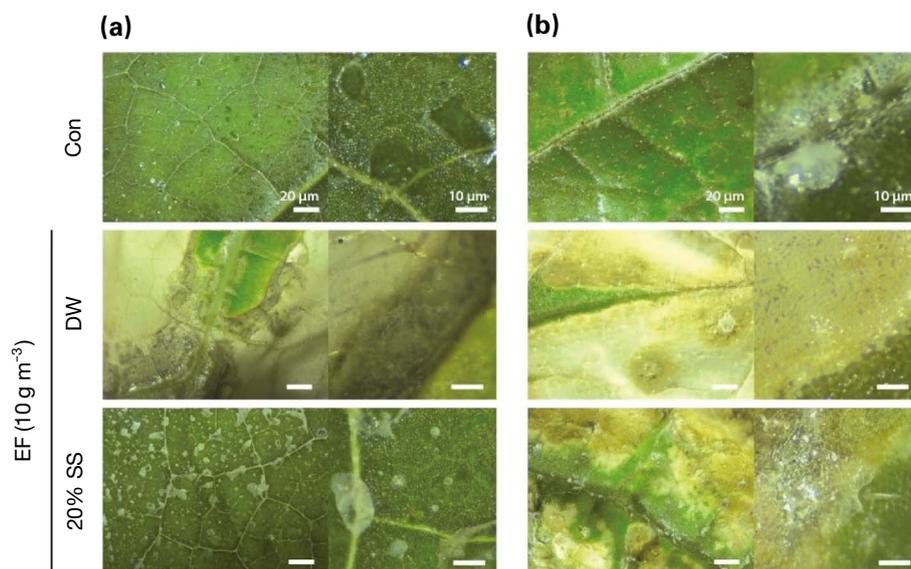


Fig. 5. Leaf surface after ethyl formate (EF) fumigation of zucchini and oriental melon pretreated with sodium silicate (SS). Phenotypes of (a) zucchini and (b) oriental melon leaf micrographed 7 days after EF fumigation. The control leaves (CON) were pretreated with 20% SS. The scale bar means 20 μm on the left and 10 μm on the right image.

지만, 약제마다 다른 약해기작을 가지고 있어 나타난 저감 법이라고 판단되며, 특히 에틸포메이트는 식물 훈증 시 잎 표면에서 발생할 수 있는 에틸포메이트의 가수분해 산물인 포름산으로부터 발생할 수 있는 약해라고 예측되며 이를 SS와 반응시킴으로써 약해를 저감하는 법을 제안하였다.

적 요

에틸포메이트(Ethyl formate)는 자연상에서 발생하는 천연살충체로서 훈증방식으로 검역단계에서 해외로부터 유입되는 해충의 방제를 위하여 사용되고 있다. 특히, 메틸브로마이드의 대체체로서 주로 사용되며 인축에 독성이 약하고 식물에 대한 약해가 적다. 이러한 에틸포메이트를 농업해충방제를 훈증제로 사용하기 전에 유용생물체에 대한 독성과 수박, 애호박, 참외에 대한 식물독성 및 발생한 식물독성의 저감화 방안을 강구하고자 본 연구를 수행하였다. 에틸포메이트 2시간 훈증처리 후 지렁이, 꿀벌, 누에에 대한 LC₅₀ 값은 각각 39.9, 7.09, 17.9 g m⁻³였다. EF에 대한 감수성 정도는 LC₅₀ 값 기준 지렁이, 누에, 꿀벌 순으로 낮게 나타났으며 에틸포메이트 훈증처리는 꿀벌에 대하여 강한 독성을 유발하였다. 식물독성은 7.5 g m⁻³ 농도로 처리된 수박 잎에서 관찰되었으며 10.0 g m⁻³ 농도로 처리 시 수박 잎의 가장자리는 까맣게 타들어 가는 산에 의한 약해가 발생함을 확인하였다. 다른 박과 식물인 애호박 및 참외에는 10 g m⁻³ 농도처리 시 잎에 강한 약해를 보였고 이를 저감하기 위하여 사용된 sodium silicate는 10% 및 20% 처리 시 약해의 저감을 확인할 수 있었다. 이와 같이 에틸포메이트 훈증처리 시 비표적생물에 대한 급성독성연구와 대상작물의 약해발생을 저감하는 연구는 에틸포메이트의 효율적인 농업해충 방제를 위한 중요한 결과를 도출했다.

CRedit authorship contribution statement

K Kim: Conceptualization, Data curation, Investigation, Visualization, Writing - Original draft, Writing - Review & editing. Y Lee: Investigation, Visualization, Writing - Original draft, Writing - Review & editing. Y Kim: Investigation, Visualization, Writing - Original draft, Writing - Review & editing. D Kim: Investigation, Validation. C Kim: Investigation, Validation, Formal analysis. Y Cho: Investigation, Software. J Park: Investigation, Validation. Y You:

Investigation, Validation. BH Lee: Conceptualization, Funding acquisition. SE Lee: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - Original draft, Writing - Review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 작물바이러스 및 병해충대응 산업화기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(321098-3).

REFERENCES

- Agarwal M, Y Ren, J Newman and S Learmonth. 2015. Ethyl formate: A potential disinfestation treatment for eucalyptus weevil (*Gonipterus platensis*) (Coleoptera: Curculionidae) in apples. *J. Econ. Entomol.* 108:2566-2571. <https://doi.org/10.1093/jeetov242>
- Jeon HJ, KN Kim, CE Kim, YR Cho, TH Kwon, BH Lee and SE Lee. 2022. Residual evaluation of ethyl formate in soil and crops after fumigation in green house. *Korean J. Environ. Biol.* 40:316-324. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2022.40.3.316>
- Kim KN, CE Kim, JE Park, HJ Jeon, YJ Park, YH Kim, JO Yang and SE Lee. 2021a. Transcriptomic evaluation on methyl bromide-induced phytotoxicity in *Arabidopsis thaliana* and its mode of phytotoxic action via the occurrence of reactive oxygen species and uneven distribution of auxin hormones. *J. Hazard. Mat.* 419:126419. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126419>
- Kim KN, CE Kim, JE Park, JS Yoo, WS Kim, HJ Jeon, JR Kim and SE Lee. 2021b. Reduction effects of N-acetyl-L-cysteine, L-glutathione, and indole-3-acetic acid on phytotoxicity generated by methyl bromide fumigation- in a model plant *Arabidopsis thaliana*. *Korean J. Environ. Biol.* 39:354-361. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.3.354>
- Kim KN, CE Kim, JS Yoo, JR Kim, YH Kim and SE Lee. 2023a. Phosphine gas in the dark induces severe phytotoxicity in *Arabidopsis thaliana* by increasing a hypoxia stress response and disrupting the energy metabolism: Transcriptomic approaches. *J. Hazard. Mat.* 443:130141. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130141>
- Kim KN, DH Kim, SH Kwon, GH Roh, SM Lee, BH Lee and SE Lee. 2023b. A Novel ethyl formate fumigation strategy for

- managing yellow tea thrips (*Scirtothrips dorsalis*) in greenhouse cultivated mangoes and post-harvest fruits. *Insects* 14:568. <https://doi.org/10.3390/insects14060568>
- Kwon TH, IH Jeong, BH Lee and CG Park. 2019. A new disinfection approach against some greenhouse pests using ethyl formate fumigation. *Korean J. Appl. Entomol.* 58:341–345. <https://doi.org/10.5656/KSAE.2019.11.0.051>
- Kwon TH, BH Lee and JH Kim. 2022a. Fumigant activity of ethyl formate against the chestnut weevil, *Curculio sikkimensis* Heller. *Insects* 13:630. <https://doi.org/10.3390/insects13070630>
- Kwon TH, CG Park, BH Lee, IH Jeong and SE Lee. 2022b. A new approach: Ethyl formate fumigation to control *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in a yellow melon vinyl house. *Appl. Sci.* 10:5173. <https://doi.org/10.3390/app12105173>
- Kyung Y, HK Kim, SW Cho, BS Kim, JO Yang, HN Koo and GH Kim. 2019. Comparison of the efficacy and phytotoxicity of phosphine and ethyl formate for controlling *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Pseudococcus orchidicola* on imported foliage Nursery Plants. *J. Econ. Entomol.* 112:2149–2156. <https://doi.org/10.1093/jee/toz125>
- Lee SK, YH Kim, TW Kim and JK Roh. 1989. Fates of cyfluthrin and trichlorfon in water and their impacts on aquatic organisms following aerial application over the forest. *Korean J. Environ. Agric.* 8:17–29.
- Lentola A, C Giorio, EP Toffolo, V Girolami and A Tapparo. 2020. A new method to assess the acute toxicity toward honeybees of the abrasion particles generated from seeds coated with insecticides. *Environ. Sci. Eur.* 32:93. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00372-z>
- Mata-Segreda JF. 2000. Spontaneous hydrolysis of ethyl formate: Isobaric activation parameters. *Int. J. Chem. Kinet.* 32:67–71. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4601\(2000\)32:1<67::AID-JCK8>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4601(2000)32:1<67::AID-JCK8>3.0.CO;2-M)
- Muthu M, S Rajendran, TS Krishnamurthy, KS Narasimhan, JR Rangaswamy, M Jayaram and SK Majumder. 1984. Ethyl formate as a safe general fumigant. *Dev. Agric. Eng.* 5:369–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42417-4.50037-2>
- Nam TH, LS Kim, HJ Jeon, KN Kim, YS Ok, SD Choi and SE Lee. 2017. Biomarkers indicate mixture toxicities of fluorene and phenanthrene with endosulfan toward earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ. Geochem. Health* 39:307–317. <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9876-3>
- Park YK, JA Oh, AS You, SJ Park, YM Jo, JB Lee and CS Kim. 2017. Acute toxicity of pesticides to carp (*Cyprinus carpio*) changes of toxicity to the exposure time. *Korean J. Pestic. Sci.* 21:453–492. <https://doi.org/10.7585/kjps.2017.21.4.453>
- Wang Y, SWu, L Chen, CWu, R Yu, Q Wang and X Zhao. 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigenic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 88:484–491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.086>