해충저항성 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 벼의 환경위해성 평가: 해충저항성 Bt벼가 물벼룩(*Daphnia magna*)에 미치는 영향

오성덕¹ · 신혜철² · 손수인¹ · 이기종¹ · 김효진¹ · 류태훈¹ · 이장용¹ · 박범석¹ · 권순종¹ · 서석철¹ · 박종석^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성과, ²한국화학융합시험연구원

Evaluation and Assessment of Biosafety for *Bacillus thuringiensis* (Bt)-transgenic Rice: Responses of *Daphnia magna* Fed on Bt-transgenic Rice Variety

Sung-Dug Oh¹, HyeChul Shin², Soo-In Sohn¹, Kijong Lee¹, Hyo-Jin Kim¹, Tae-Hun Ryu¹, Jang-Yong Lee¹, Beom Seok Park¹, Soon Jong Kweon¹, Seok-Cheol Suh¹, and Jong-Sug Park^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Republic of Korea

²Korea Testing & Research Institute, Kimpo, 415-871, Republic of Korea

Received october 3, 2011; Accepted November 11, 2011

Insect-resistant transgenic rice was developed by inserting the *mCryIAc1* a modified gene from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt). For biosafety assessment, we studied the effects on survival of cantor *Daphnia magna*, a commonly used as a model organism in ecotoxicological studies. *D. magna* fed on Bt rice and its near non-genetically modified (GM) counterparts (Nakdong) grown in the same environment (100% ground rice suspension). The Bt rice was confirmed to have the insertion of T-DNA and protein expression by the polymerase chain reaction and ELISA analysis. Feeding study showed similar cumulative immobility and abnormal response of *D. magna* between Bt rice and non-GM counterparts. 48 h-EC₅₀ values of Bt rice and non-GM rice showed 4,429 and 2,889 mg/L respectively. The rice no observed effect concentration (NOEC) values for *D. magna* was suggested 1,000 mg/L. We conclude that the tested Bt-rice and Nakdong similar cumulative immobility for *D. magna* the widely used model organism. We found out that there is strong possibility that the growth of Bt rice didn't affect to non-target insects.

Key words: *Bacillus thuringiensis* rice, *Daphnia magna*, Environment risk

서 론

전 세계적으로 GM 작물(Genetically modified crops)은 빠른 속도로 실용화 되어 그 재배면적이 해마다 급진적으로 증가하고 있는 추세이다. 2010년에는 전 세계적으로 GM 작물의 재배면적은 전 세계 29개국 1,560만 여명이 1억 4,800만 헥타르에서 경작되었으며, 누적된 경작면적은 10억 헥타르에 이르고 있다[James, 2010]. 이러한 GM 작물의 상업적 재배를 위해서는 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉 도입 유전자들이 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성, 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 안전성이 입증되어야 한다[Nap 등, 1992; de Vries과

Wackernagel, 2004]. 따라서 개발된 GM 작물이 환경에 방출되어 재배되기 전에 환경에 미칠 수 있는 요인들에 대한 국내 검증 가이드라인 구축이 필요하다.

주요 농작물들의 해충에 의한 피해를 방제하기 위하여 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 유래의 다양한 Cry 유전자들을 작물에 도입함으로써 생명공학 기법을 이용한 해충방제가 시도되어져 왔다. 1981년에 최초로 Cry 유전자가 분리된 이래로 [Schnepf와 Whiteley, 1981] 총 314종의 Cry 유전자가 발견되었다(OECD, 2007). Bt는 국제적인 미생물 분류 기준에 의해 비병원성 세균으로 분류되어, 기회 감염균(opportunistic pathogen)으로 분류되는 경우는 극히 드물며, 살충 특성을 갖고 있어서 1961년 이후 상업적 농경, 삼림과 모기 방제를 위해 생물 농약으로 사용되어왔다. 살충효과는 농작물 및 채소작물의 특정 해충군에 특이적이며, 결정성 내독소 단백질[crystal (CRY) δ -endotoxin]에 의해 보고되어졌다[Schnepf와 Whiteley, 1981].

따라서 Bt 작물을 개발함으로써 비선택적인 곤충에는 영향을

*Corresponding author

Phone: +82-31-299-1141; Fax: +82-31-299-1122

E-mail: jongsug@korea.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.048>

미치지 않고 선택적으로 목표해충만을 방제하여 수량을 증대시킬 수 있으며, 현재까지 *Cry* 형질전환이 옥수수, 벼, 면화, 감자 등에서 이루어져 왔다[Bohn 등, 2008]. *CryIAb*와 *CryIF*를 옥수수에서 발현 시켜서 European corn borer, corn earworm, southwestern corn borer에 대해서 저항성을, *CryIAc*를 목화에서 발현 시켜서 tobacco budworm, cotton bollworm, pink bollworm에 대해서 저항성을 보이는 것으로 보고되었다[Mendelsohn 등, 2003].

현재까지 안전성 연구결과 Bt를 살포한 작물은 인체나 포유류에 무해한 것으로 알려졌으며, Environmental Protection Agency (Washington, DC)에 의하면 Bt 작물은 환경이나 인간 건강에 어떠한 위해요소도 보이지 않는 것으로 보고하였다[Betz 등, 2000; Mendelsohn 등, 2003]. 하지만 Bt 작물 방어의 특이성뿐만 아니라 *Cry* 단백질의 표적 또는 비표적 생물체에 대한 작용기작도 완벽하게 이해되지 않고 있으며[Crickmore, 2005; Bravo 등, 2007], 광범위한 면적에서 경작되고 있음에도 불구하고 비표적 생물체에 미치는 영향을 과학적으로 분석한 예는 많지 않은 실정이다. 따라서 환경위해성 평가 요소 중 비표적 생물체에 대한 영향 평가에 대한 체계적인 입증이 필요하다[Sohn 등, 2010].

GM 작물에 도입된 유전자의 발현단백질은 복잡한 유기화합물 상태로 되어있으며, 발현물질들 상호간의 작용에 대한 예측을 위해서는 발현단백질이 생물체의 신진대사, 번식의 감소, 생체 기능의 상실이나 치사 등에 미치는 영향을 분석함으로써 유해성을 검사하는 생물검정(환경생물 독성시험)이 생태계 측면에서 합리적인 방법으로 알려져 있다[Kim 등, 2010a]. 환경생물 독성시험에는 매우 다양한 수생생물종이 사용되는데 무척추 동물로는 물벼룩(*Daphnia*, *Daphnia magna*), 가재(*Cray fish*), 옆새우(*Gammarus*), 완미운충류(*Brachionus*), 어류로는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 자브라피쉬(zebra fish, *Brachydanio rerio*), 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 잉어(*Cyprinus carpio*) 그리고 조류로는 *Selenastrum*, *Chlorella*, *microcystis*, *Navicula* 등이 일반적으로 사용되고 있다[Versteeg 등, 1997].

GM 작물의 환경생물 독성시험에는 물벼룩을 선호하는데 환경오염 물질에 대한 감수성이 높고 *Daphnia*속 중에서 크기가 커 다루기가 편리할 뿐 아니라(5 mm 이상) 급성만성 시험 관련 방대한 독성 data-base가 구축되어 있기 때문이다. 또한 물벼룩은 최근까지 다양한 화학물질 및 배출수에 대한 환경영향 평가의 지표종으로 전 세계적으로 이용되고 있으며[Kramer 등, 2004], 국내에서도 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2010-29호)에 의해 환경생태독성 시험 생물로써 많은 시험 기초자료가 축적되어있어 환경 독성조사법으로 유망한 생물검정법으로 이용되고 있다. 따라서 본 시험에서는 해충저항성 Bt벼가 물벼룩에 미치는 급성독성 여부를 분석하기 위하여 *mCryIAc1* 유전자의 도입과 *mCryIAc1* 단백질 발현량을 확인한 후, 모본으로 사용된 낙동벼와 함께 환경위해성 평가 항목 중 비표적 생물체인 물벼룩에 미치는 영향을 조사함으로써 안전성 자료 생산용 급성독성 평가를 수행하였다.

재료 및 방법

시료 제조. 해충저항성 Bt벼와 비형질전환 모품종인 낙동벼를 genetically modified organism (GMO) 격리 포장(경북 군위군 효령면)에서 재배하였으며 잎과 줄기부위를 수확하여(출수기) 동결건조한 후(일신랩 FD8518, 동두천, 한국) 분쇄기를 이용하여(HMF-3100S, 한일전기, 서울, 한국) 분쇄하였다. 분쇄 시료는 600 μ m의 표준망체(청계산업, 서울, 한국)를 통과시킨 후, 부형체인 M4 배지(Sigma-aldrich, St. Louis, MO)에 현탁하여 급성독성 분석용 시료로 이용하였다.

Genomic DNA 분리 및 Polymerase chain reaction (PCR) 검정. 해충저항성 Bt벼와 낙동벼 식물체 시료를 각 1 g 씩을 취하고, 막자사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE)을 이용하여 260/280 nm 값이 1.8–2.0 사이인 추출액을 실험에 이용하였다. 식물 형질전환용 운반체의 유전정보를 바탕으로 *mCryIAc1* 유전자 확인용 프라이머 셋을 제작하였다(375F: 5'-GCTCTCCGC GAGGAAATGCGT-3', 857R: 5'-CTGGGCAGAACCACGGAA GCT-3'). PCR 검정을 위하여 dNTP (10 mM) 4 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 4 μ L, 프라이머(375F, 857R) 각 20 μ M, f-Taq DNA polymerase 1U (Solgent, 대전, 한국), template genomic DNA 20 ng를 추가한 후 최종 반응 부피를 40 μ L로 하였다. PCR 반응은 PTC-100 Thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA)를 이용하여 1 cycle (95°C, 5분), 35 cycle (95°C, 40초 –72°C, 60초 –58°C, 40초), 1 cycle (72°C, 5분)반응을 순차적으로 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 UV조사로 확인하였으며 Gel Extraction kit (Qiagen, 28704)를 이용하여 정제하고 pGEMT easy vector (Promega, Madison, WI)에 삽입하여 정확한 염기서열 정보를 확인하였다.

mCryIAc1 단백질 발현 확인. *mCryIAc1* 유전자의 발현 확인을 위하여 ImmunoStrip 검정(lateral strip test)을 실시하였다. 시료를 추출액과 함께 마쇄하여 단백질을 추출한 후, *bar* 및 *mCryIAc1* 유전자의 발현을 Trait LL Test Strip (Strategic Diagnostics Inc, Newark, DE)과 *CryIAc1* ImmunoStrip Test (Agdia, Elkhart, IN)를 이용하여 각각 ImmunoStrip 검정을 수행하였다[Shin 등, 2009]. *mCryIAc1* 단백질의 농도를 정량하기 위하여 각 시료들을 마쇄한 후 phosphate buffered saline Tween 20 (PBST)용액과 함께 균질화 한 후 저온처리(얼음에서 5분) 및 원심분리(5,000 g, 5분)하여 단백질을 분리, 추출한 후 Bt-CryIAb/IaC ELISA Kit (Agdia)를 이용하여 ELISA분석을 실시하였다. 모든 시료들은 상온에서 2시간 반응한 후 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[Kim 등, 2010b].

물벼룩 배양 조건. 목표 비표적생물체인 물벼룩(*D. magna*)은 한국화학융합시험연구원(경기도 김포시, 한국)에서 사육된 것을

이용하였다. 장방형 수조(1 L 용량)에서 수온 19–21°C, 광조건 16시간, 암조건 8시간의 환경조건에서 사육하였으며, 사육실의 온도 및 사육수조 내 수온은 자동온도측정기로 매 30분마다, 조도 등의 환경 조건은 월 1회 측정하였다. *Chlorella vulgaris* (ATCC, Manassas, VA)를 순수 배양하여 매일 1회 먹이로 공급하였으며, 용수는 ‘Daphnia sp., Acute Immobilisation Test, Annex 3 Elendt M7 and M4 medium’ (OECD, 2004)과 동일하게 조제된 M4 배지를, 사용하기 전 2시간 이상 강하게 폭기시킨 후 사용하였다. 수질의 측정은 시험용수의 조제 당일 정도는 한국산업규격 KSI3206의 Inductively coupled plasma emission spectroscopy에 의해, 알칼리도는 Standard method (21th edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, USA)의 염산 적정법에 의해 측정하였다.

물벼룩에 대한 시료 처리조건. 해충저항성 Bt벼와 낙동벼의 각 시료에 대한 48시간동안 유효농도 분석 결과 EC_{50} 값이 1,000–10,497.6 mg/L 범위 내에 포함된다는 예비 실험을 근거로, 1,000, 1,800, 3,240, 5,830 및 10,500 mg/L의 농도조건에서 물벼룩에 대한 시료 처리를 하였다. 시료(0.100, 0.180, 0.324, 0.583 및 1.050 g)는 각각 100 mL의 시험용수에 반복 처리하여 시험용액으로 사용하였다. 시험용수인 M4배지를 음성 대조구로, potassium dichromate (Sigma-aldrich, St. Louis, MO)를 양성대조구로 각각 사용하였으며 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 및 3.20 mg/L의 설정농도를 적용하였다. 시료처리는 생후 24시간 이내의 어린 물벼룩을 대상으로 농도 당 각 10마리씩 3반복 실시하였다. 135 mL 용량의 원통형 유리수조(65 mm Height × 57 mm ϕ)에 100 mL 처리하였으며, 수온은 사육조건과 동일한 19–21°C를 유지하였다.

급성독성분석을 위한 조사항목. 물벼룩에 대한 급성독성여부를 규명하기 위하여 각 처리구에 대하여 24시간 경과 후 일반 중독증상, 특이증상 및 유영저해개체 수 등을 분석하였다. 유영저해의 판정을 위해 시험용기를 조용히 움직이고 15초 후에 촉각 및 후복부 등은 움직이지 못하는 것을 유영저해 물벼룩으로 간주하였다. 시험기간 중 시료 처리직후와 종료 시의 각 처리구에 대하여 pH 및 Dissolved Oxygen (DO)를 조사하였으며, 수온은 24시간 간격으로 매일 조사하였다. pH와 수온은 Sartorius사(Gottingen, Germany)의 PP-15 pH meter를 사용하였고, DO는 Orion research Incorporated (Beverly, MA)의 810A+ DO meter를 사용하여 측정하였다. EC_{50} 산출 및 무영향농도(NOEC, No observed effect concentration)는 시험물질 처리 후 48시간의 유효성분에 대한 반수영향농도(EC_{50}) 및 95% 신뢰한계를 probit 분석법에 의해 산출하였다. 무영향농도는 중독증상이 없고 유영저해가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

결과 및 고찰

해충저항성 Bt벼의 분자생물학적 분석. 급성 독성평가에 이용된 해충저항성 Bt벼는 토양 세균인 *B. thuringiensis* 유래한 해충저항성 유전자중 살충성을 보이는 주요 염기서열을 작물에

Fig. 1. Confirmation of the specific primer set on the Bt rice and non-GM rice. M: 100 bp DNA ladder, N: non-GM rice (Nakdong), Bt: Bt rice Cr7-1-9-1-1-4-1 lines.

Fig. 2. Confirmation of genes expression for Bt rice by using immunostrip. (A) immunostrip tests for the bar detection, (B) immunostrip tests for the mCryIaC1 detection. N: non-GM rice; Nakdong, Bt: Bt rice Cr7-1-9-1-1-4-1 lines.

적합하도록 변형시킨 *mCryIaC1* 유전자를 낙동벼에 도입하여 개발되었으며[Shin 등, 2009], 생물검정 결과 흑명나방 유충에 대하여 우수한 살충력을 보일 뿐만 아니라 두줄꼬마 밤나방과 벼줄점팔랑나비, 조밤나방에 대하여 각각 100 및 20%의 살충성을 보여 현재 실용화를 위한 안전성 평가가 진행 중에 있다. 높은 해충저항성을 나타낸 해충저항성 Bt벼 이벤트(event Cr7-1-9-1-1-4-1)와 비형질전환 낙동벼를 GM격리포장(군위, 2010)에서 재배한 후 비표적생물체인 물벼룩에 대한 급성독성 평가를 실시하였다.

분석에 사용된 시료에 *mCryIaC1* 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 PCR 분석을 실시한 결과 해충저항성 Bt벼에서만 특이적으로 482 bp의 반응 산물이 합성됨을 확인하였다(Fig. 1). 합성된 PCR산물이 *mCryIaC1* 유전자임을 검정하기 위하여 pGEM T-easy vector에 삽입하여 염기서열을 분석한 결과 운반체 제작에 사용된 해충저항성 *mCryIaC1* 유전자와 100% 동일함을 확인하였다(data 생략). *mCryIaC1* 유전자는 본 실험에 사용된 해충저항성 Bt벼에 one-copy로 삽입되었음을 Southern 분석을 통하여 확인한 바 있다[Shin 등, 2009].

해충저항성 Bt벼에서 mCryIaC1 단백질의 발현을 검정하기 위하여 항체를 이용한 lateral flow strip test (LFST)분석을 실

Fig. 3. mCry1Ac1 Protein Levels (µg/g Dry weight) in Nakdong and Bt rice. SC, none detected. Values are the Mean $\pm$ SD of triplicate measures.

Table 1. Changes of water temperature (Unit: °C)

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong			Bt rice		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0	20.2	20.2	19.9	20.2	20.2	19.9
1,000	20.4	20.4	20.1	20.2	20.3	19.8
1,800	20.3	20.3	20.2	20.1	20.1	20.4
3,240	20.1	20.2	20.0	19.7	19.8	19.7
5,830	20.0	20.9	20.0	19.6	19.9	19.7
10,500	20.2	20.3	-	19.8	-	-

¹⁾Active ingredient: Nakdong; Bt rice 100%

시하였다. GMO격리포장에서 재배한 해충저항성 Bt벼와 낙동벼에 대하여, mCry1Ac1 및 bar 단백질 확인용 항체가 표시되어있는 immunostrip을 이용하여 각 단백질 발현을 분석한 결과, 해충저항성 Bt벼에서만 특이적으로 단백질이 발현되었으며 대조구인 낙동벼에서는 단백질이 발현되지 않았다(Fig. 2). 또한 해충저항성 Bt벼에서의 mCry1Ac1 단백질 발현량을 ELISA 법을 이용하여 분석한 결과 해충저항성 Bt벼 특이적으로 47.07 $\pm$ 3.55 µg/g 수준의 mCry1Ac1 단백질이 발현되었으며 낙동벼에서는 발현되지 않음을 확인하였다(Fig. 3). 이는 2009년 GMO 격리포장(군위)에서 재배한 해충저항성 Bt벼의 잎(출수기)에서 표적곤충에 대하여 유효 살충효과를 보인 mCry1Ac1 단백질 농도(50 µg/g)와 일치하여, 세대별로 안정적으로 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다(data 생략).

시료처리용 시험용수의 수질변화 검증. 물벼룩 환경생태 독성시험 분석을 위하여 시험용수의 수질검사를 시료처리 직후와 시험 종료 시 각 처리구별로 수조내 수온, pH 및 DO를 조사하였다. 예비시험의 측정결과를 바탕으로 DO가 포화용존산소량의 60% 이하로 내려가는 것을 방지하기 위하여 24시간 간격으로 30분간 산소를 공급하였다. 시험기간 중 시험용수 내 수온은 해충저항성 Bt벼와 낙동벼에 대하여 각각 19.9 $\pm$ 0.3°C (19.5~20.4°C) 및 20.1 $\pm$ 0.1°C (19.8~20.5°C)로 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2010-29호)의 물벼룩 독성평가 실험방법에서 제시한 적정 실험온도인 18~22°C를 유지하였으며, 2°C 이내의 온도 변화가 측정되어 온도가 실험의 영향 요소로는 작용하지 않음을 확인하였다(Table 1).

DO는 0시간(시험용수에 시료 현탁시) 처리조건에서 해충저

Table 2. Changes of DO (Dissolved Oxygen)

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong		Bt rice	
	0 h	48 h	0 h	48 h
0	8.23	7.72	8.23	7.72
1,000	8.01	5.72	7.96	5.72
1,800	7.92	5.74	8.11	5.74
3,240	7.79	5.76	7.96	5.66
5,830	7.98	5.71	7.98	5.63
10,500	7.84	-	7.97	-

¹⁾Active ingredient: Nakdong; Bt rice 100%

Table 3. Changes of pH

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong		Bt rice	
	0 h	48 h	0 h	48 h
0	7.76	7.50	7.76	7.50
1,000	6.85	6.24	7.04	7.32
1,800	6.82	6.16	7.09	7.25
3,240	6.78	5.82	7.12	7.13
5,830	6.68	5.95	6.95	7.23
10,500	6.74	-	6.99	-

¹⁾Active ingredient: Nakdong; Bt rice 100%

항성 Bt벼 및 낙동벼에 대하여 각각 7.99 $\pm$ 0.06 및 7.90 $\pm$ 0.09 mg/L이었으며, 처리 48시간 후에는 각각 5.68 $\pm$ 0.05 및 5.73 $\pm$ 0.02 mg/L로 측정되었다. 시험기간 중 처리농도별 해충저항성 Bt벼와 낙동벼 간의 DO는 유의적인 차이가 없었다. 처리 시간에 따른 DO의 감소는 해충저항성 Bt벼 및 낙동벼의 경우 유기물인 시료를 처리하였으므로 DO수치가 급격히 감소되는 경향을 보인 반면, 음성대조구(0 mg/L)는 0시간 및 48시간에 각각 8.23 $\pm$ 0.06 mg/L 및 7.72 $\pm$ 0.13 mg/L로써 소폭 감소하는 경향을 보였다(Table 2).

pH는 0시간 처리조건에서 해충저항성 Bt벼와 낙동벼의 농도별 처리구에서 각각 7.03 (6.87~7.26) 및 6.77 (6.67~6.88)이었으며, 48시간 처리 후에는 각각 7.23 (6.99~7.47) 및 6.04 (5.67~6.34)로 음성대조구(0 mg/L)의 7.76 및 7.50에 인하여 pH가 소폭 낮아졌으나, 해충저항성 Bt벼에 비해 낙동벼에서 pH가 낮아짐을 확인하였다. 이는 유기물인 시료인 낙동벼와 해충저항성 Bt벼 처리시에 생물체인 물벼룩의 호흡 등 생리 작용과 유기물 분해 작용에 의해 두 시료간의 pH의 차이에 영향을 주었을 것으로 사료된다(Table 3).

해충저항성 Bt벼의 물벼룩에 대한 유영저해 시험. 해충저항성 Bt벼와 낙동벼의 시료 농도별 물벼룩(각 처리별 30마리)에 대한 생사수, 일반중독증상, 체중 및 전장 분석을 24 및 48시간동안 실시하였다. 물벼룩은 유기 및 무기 독성물질에 민감하게 반응하므로, 독성 측정을 위해서는 일반적으로 24시간 및 48시간 후의 유영저해 측정이 이용된다[Kim 등, 2010a].

해충저항성 Bt벼의 시료 처리결과 물벼룩 생육은 1,000 및 1,800 mg/L 농도 조건에서 24시간 및 48시간 경과 후에는 유영저해를 보이지 않았으나 3,240 및 5,830 mg/L 처리농도에서는 각각 24시간 후에는 13.3 및 40.0%, 48시간 후에는 20.0 및 76.7%의 유영저해를 보였고, 10,500 mg/L 처리농도에서는

Table 4. Cumulative immobility of *Daphnia magna*

Sample	Concentration (mg/L) ¹⁾	Number of daphnia	Number of immobilized daphnia		Immortality (%)	
			24 h	48 h	24 h	48 h
Nakdong	0	30	0	0	0	0
	1,000	30	0	0	0	0
	1,800	30	10	12	33.3	40.0
	3,240	30	15	18	50.0	60.0
	5,830	30	16	21	53.3	70.0
	10,500	30	30	30	100.0	100.0
Bt rice	0	30	0	0	0	0
	1,000	30	0	0	0	0
	1,800	30	0	0	0	0
	3,240	30	4	6	13.3	20.0
	5,830	30	12	23	40.0	76.7
	10,500	30	30	30	100.0	100.0

¹⁾Active ingredient: Nakdong; Bt rice 100%

24시간 및 48시간 모두 100% 유영저해를 보였다. 낙동벼 시료 처리구에서는 1,000 mg/L 농도에서 24시간 및 48시간 후 유영저해를 보이지 않았으나, 1,800, 3,240 및 5,830 mg/L 농도 조건에서 24시간 후에는 각각 33.3, 50.0 및 53.3%, 48시간 후에는 각각 40.0, 60.0 및 70.0%의 유영저해를 보였고, 10,500 mg/L 농도처리에서 24시간 및 48시간후 모두 100% 유영저해를 보여, 해충저항성 Bt벼 처리가 낙동벼에 비하여 유영저해에 심화시키는데 영향을 미치지 않았다(Table 4). 처리기간 중에서는 일반중독증상 및 특이증상의 경우, 음성대조군(0 mg/L)에서는 관찰되지 않았으며, 해충저항성 Bt벼와 낙동벼 처리구에서는 각각 3,240 및 1,800 mg/L 이상의 처리농도 조건에서 일반중독 증상인 수조 상단에서 유영하는 개체가 관찰되었다. 이는 유기물인 낙동벼와 해충저항성 Bt벼의 처리 농도가 높아짐에 따라 DO와 pH의 변화를 야기하고, 두 시료가 시험용수에 지속적인 농도별로 현탁됨에 따라 물벼룩의 생육에 영향을 미쳐서 유영저해 개체가 나타났을 것으로 사료된다. 따라서 해충저항성 Bt벼가 일반중독 증상의 심화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Table 5).

해충저항성 Bt벼의 물벼룩에 대한 급성독성 시험. 물벼룩에 대한 급성독성시험 결과 해충저항성 Bt벼의 48시간-EC₅₀은 4,429.13 mg/L (95% 신뢰한계: 3,908.130~5,020.363 mg/L), 무영향 농도(NOEC)는 1,800 mg/L이었으며, 낙동벼의 경우 2,889.56 mg/L (95% 신뢰한계: 1,073.407~6,854.321 mg/L), 무영향 농도는 1,000 mg/L을 보였다. 또한, 양성 대조군으로 사용된 Potassium dichromate에서의 48시간-EC₅₀은 0.871 mg/L (95% 신뢰한계: 0.750~1.010 mg/L)으로 확인되었다(Table 6). 이는 mCry1Ac1가 도입된 해충저항성 Bt벼 처리가 일반벼인 낙동벼에 비해 물벼룩의 급성 독성 증대에 영향을 미치지 않음을 입증한 것이며, 해충저항성 Bt벼 및 낙동벼 모두 무영향 농도(NOEC)가 1,000 mg/L로 한계 농도를 설정할 수 있을 것이다.

해충저항성 Bt벼에서 발현된 mCry1Ac1은 기존의 *B. thuringiensis* 유래 Cry1Ac 단백질과 아미노산 서열은 동일하나 식물체에서 발현이 적합하도록 염기서열을 변형한 것이다. 이

Table 5. Abnormal response of *Daphnia magna*

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong			Bt rice		
	2 h	24 h	48 h	2 h	24 h	48 h
0	NOR ²⁾	NOR	NOR	NOR ²⁾	NOR	NOR
1,000	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
1,800	NOR	SUR (7) ³⁾	SUR (6)	NOR	NOR	NOR
3,240	NOR	SUR (4)	SUR (6)	NOR	SUR (4)	SUR (4)
5,830	NOR	SUR (7)	SUR (3)	NOR	SUR (7)	SUR (3)
10,500	NOR	-	-	NOR	-	-

¹⁾Active ingredient: Nakdong; Bt rice 100%²⁾Abbreviation for abnormal response

NOR: normal

SUR: daphnia mainly at the surface

³⁾Number of intoxicated daphniaTable 6. EC₅₀ values

Test item	48 h-EC ₅₀ (mg/L) ¹⁾	NOEC ³⁾ (mg/L)
M4 media (Negative Control)	-	-
Potassium dichromate (Positive Control)	0.871 (0.750~1.010) ²⁾	-
Nakdong	2,889.56 (1,073.407~6,854.321)	1,000
Bt rice	4,429.13 (3,908.130~5,020.363)	1,800

¹⁾Active ingredient: Potassium dichromate; Nakdong; Bt rice 100%²⁾95% confidence limits³⁾No observed effect concentration

단백질은 알칼리성 pH와 특정 인시류 애벌레 증상의 단백질 분해효소에 의해 절단되어 살충작용을 보이나, 포유류나 대부분의 곤충을 포함한 비표적 곤충들은 Cry1Ac1을 분해할 수 없으므로 비독성 형태로 배설되게 된다[Aronson과 Shai, 2001]. Thomas 등은 *Cry1Ab* 유전자를 형질전환한 Bt 옥수수(MON810)의 급성독성 실험을 물벼룩을 대상으로 42일간 장기영향 평가한 결과, 해충저항성 Bt 옥수수가 비형질전환 옥수수에 비해 생존률이 떨어지지 않았으며, Lee 등은 중금속 및 농약에 대한 물벼룩의 EC₅₀과 IC₅₀값이 상당히 광범위하게 형성되어 급성독성 실험 시 실험방법, 장소 및 조건의 차이를 보여 이에 대한 설정이 중요함을 보였다[Lee 등, 2007; Thomas 등, 2010].

Cry 단백질은 자연환경에 비의도적으로 노출되더라도 일반적인 기온의 육상 및 수상 환경에서 일정기간 경과되면 분해되어 표적해충에 대한 생물활성이 감소되고, 결국 표적해충 뿐만 아니라 환경위해성 평가용 비표적생물체에 대한 영향도 감소되는 것으로 밝혀졌다. Bt 옥수수(MON810)를 경작지 주변(육상 환경)과 하천(수상 환경)에 노출시켜 표적 해충에 대한 생물검정을 실시한 결과, 두 경우 모두 2주 이상 노출된 Bt 옥수수가 표적해충에 대한 생물활성이 없었으며 비형질전환 옥수수와 비교하여 생물검증을 실시한 결과 비슷한 성장률을 보였다[Jensen 등, 2010]. 또한 Cry1Ab 단백질을 보관 온도와 기간에 따른 표적곤충의 LC₅₀을 측정한 결과 1주후 77 (ng Cry1Ab/cm² diet)이었으나, 6주 후에는 1,700으로 22배 증가되어 Cry1Ab 단백질이 분해로 인한 독성의 급감함을 보였다[Nguyen과 Jehle, 2009]. Table 6에서 48시간 후의 무영향농도(NOEC)는 해충저

항성 Bt벼와 낙동벼는 각각 1,800 mg/L 및 1,000 mg/L를 보였으며, 이는 실험 조건에 따라 보일 수 있는 차이의 수준이고, 물벼룩 급성독성시험에서 검정한 1,000 mg/L은 자연 환경에 노출시 보다 다소 높은 농도이나 기존의 생물 농약보다는 훨씬 안전한 수치이다[Lee 등, 2007; Thomas 등, 2010].

mCryIAC1 형질전환 Bt벼 및 낙동벼가 비표적생물체인 물벼룩에 미치는 영향평가결과 상대적 동등성을 보여서, 비표적생물체에 대한 위해성 평가를 위해 물벼룩을 지표생물종으로 선택하여 환경독성 실험을 수행한 결과 *mCryIAC1* 단백질 노출이 물벼룩에 부정적인 영향을 미치지 않은 결과를 보였다. 그러나, Thomas 등의 *CryIAb*유전자를 형질전환한 Bt 옥수수(MON810)의 급성독성 실험을 물벼룩을 대상으로 42일간 장기영양 평가한 실험 결과에서도 MON810과 비형질전환 옥수수의 처리 5일차 내에서는 생존률의 차이는 나타나지 않았으나, 42일간 장기영양 평가시에는 후세대에서의 성숙기간, 산란수, 세대전진시기 등에 차이를 나타냄을 보고하였다. 본 실험은 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2010-29호)에 준한 실험 방법으로 48시간 급성 독성 평가를 수행하였고, 이 결과는 Thomas 등의 처리 5일내의 결과와 일치됨을 확인하였다. 향후에 해충저항성 Bt벼의 물벼룩에 대한 영향 평가를 42일 이상의 장기간 세대 전진에 대한 안전성 평가를 수행하여 Thomas 등 실험결과와 비교 분석할 필요성이 있다고 사료된다.

본 실험의 결과 국내 GM 작물의 비표적생물체에 대한 영향 평가를 처음으로 시도하였고, 물벼룩에 대한 벼의 무영향농도(NOEC)를 1000 mg/L로 설정할 수 있음을 확인하였고, 이 기준을 향후 평가될 GM벼 등의 대한 물벼룩의 영향 평가 지표 기준으로 제시하고자 한다. 따라서 관행적으로 경작지에서 재배되어온 비형질전환 낙동벼와 *mCryIAC1* 형질전환 해충저항성 Bt벼는 수로, 하천 등의 담수환경에 방출되었을 때 환경 및 생물학적인 영향이 동일하다고 사료된다. 이러한 급성독성 관련 동등성 뿐만 아니라 향후 해충저항성 Bt벼를 포함한 GM 작물에 대한 환경위해성 평가요소 중 비표적생물체에 대한 급성독성 분석시 세대 전진에 따른 GM 작물의 장기간 노출에 따른 생식 독성과 유전독성 분석을 위한 표준 가이드라인을 구축함으로써 후대안전성 실험을 수행할 필요가 있을 것으로 사료된다.

초 록

해충저항성 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 벼와 낙동벼의 비표적 생물체인 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성독성시험을 실시한 결과, 해충저항성 Bt벼의 48시간-EC₅₀은 4,429.13 mg/L (95% 신뢰한계는 3908.130~5020.363 mg/L), 무영향 농도(NOEC)는 1,800 mg/L이었고, 낙동벼는 48시간-EC₅₀은 2,889.56 mg/L (95% 신뢰한계는 1,073.407~6,854.321 mg/L), 무영향농도는 1,000 mg/L이었다. 처리기간 중 해충저항성 Bt벼와 낙동벼간의 급성독성에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

Key words: *Bacillus thuringiensis* rice, *Daphnia magna*, Environment risk

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 농업과학기술 연구개발사업 지원(과제번호: PJ006865 및 PJ907094)에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Aronson AI and Shai Y (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: Unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Lett* **195**, 1–8.
- Betz FS, Hammond BG, and Fuchs RL (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**, 156–173.
- Bohn T, Primicerio R, Hessen DO, and Traavik T (2008) Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. *Arch Environ Contam Toxicol* **55**, 584–592.
- Bravo A, Gill SS, and Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423–435.
- Crickmore N (2005) Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends Microbiol* **13**, 347–350.
- de Vries J and Wackernagel W (2004) Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil* **266**, 91–104.
- Jensen PD, Dively GP, Swan CM, and Lamp WO (2010) Exposure and nontarget Effects of Transgenic Bt Corn Debris in Streams. *Environmental Entomology* **39**, 707–714.
- Kim KY, Kim KR, and Lee SI (2010a) Acute toxicity test for heavy metals using water fleas. *J Korean Wood Sci & Tech* **18**, 37–47.
- Kim HJ, Lee SM, Kim JK, Ryu TH, Suh SC, and Cho HS (2010b) Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea. *J Agric Food Chem* **58**, 10906–10910.
- Kramer KJM, Jak RG, van Hattum B, Hooftman RN, and Zwolsman JJG (2004) Copper toxicity in relation to surface water-dissolved organic matter: biological effects to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* **23**, 2971–2980.
- Lee CW, Ryu JY, and Lim KW (2007) Acute Toxicity Test of Agricultural Chemicals to Water Fleas. *J Environ Sci* **16**, 55–63.
- Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, and Matthews K (2003) Are Bt safe? *Nature Biotechnology* **21**, 1003–1009.
- Nap JP, Bijvoet J, and Stiekema WJ (1992) Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res* **1**, 239–249.
- Nguyen HT and Jehle JA (2009) Stability of CryIAb protein during long-term storage for standardization of insect bioassays. *Environ Biosafety Res* **8**, 113–119.
- Schnepf HE and Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *PNAS* **78**, 2893–2897.
- Shin KS, Lee SM, Lim SH, Woo HJ, Cho HS, Lee KR, Lee MC, Kweon SJ, and Suh SC (2009) Research articles: Molecular biological characteristics and analysis using the specific markers of leaf folder-resistant GM rice. *Plant Biotechnol* **36**, 115–123.
- Sohn SI, Oh YJ, Oh SD, Kim MK, Ryu TH, Lee KJ, Suh SC, Baek

- HJ, and Park JS (2010) Molecular analysis of microbial community in soils cultivating Bt chinese cabbage. *Korean Environ Agri* **29**, 293–299.
- Thomas Bøhn, Terje Traavik, and Raul Primicerio. (2010) Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize. *Ecotoxicology* **19**, 419–430.
- Versteeg DJ, Stalmans MSD, and Janssen C (1997) Ceriodaphnia and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere* **34**, 869–892.