

최종보고서

토탈삭의 담수어류 (제브라피쉬, *Danio rerio*) 급성독성시험

ETF-24028



(주) 한국생물안전성연구소

제 출 문

시험물질: 토탈삭

시험제목: 토탈삭의 담수어류 (제브라피쉬, *Danio rerio*) 급성독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2024-13호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2024년 12월 26일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 오 현 택

KBSI

목 차

[Contents]

보고서표지	1
제출문	2
목차 [Contents]	3
1. 요약 [Summary]	5
2. 시험실시의 개요 [Introduction]	6
2.1. 시험제목	6
2.2. 시험물질	6
2.3. 시험목적	6
2.4. 시험방법	6
2.5. 시험의뢰자	6
2.6. 시험기관	6
2.7. 시험장소	6
2.8. 시험책임자	6
2.9. 시험관계자	7
2.10. 시험일정	7
2.11. 시험물질의 보관	7
2.12. 시험자료의 보관	7
3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]	8
3.1. 시험물질	8
3.2. 시험생물	8
3.3. 시험방법	8
4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]	10
4.1. 관찰	10
4.2. 시험환경측정	10
4.3. 전장 및 체중 측정	10
4.4. 시험결과의 표시 및 통계처리방법	10
5. 시험결과 [Results]	11
5.1. 치사개체 및 이상증상	11
5.2. 시험환경조건	11
5.3. 전장 및 체중	11
5.4. 급성독성시험결과	11
6. 참고문헌 [References]	12
7. Tables	13

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Table 1. Cumulative mortality of <i>Danio rerio</i>	13
Table 2. Abnormal response of <i>Danio rerio</i>	13
Table 3. Temperature	14
Table 4. pH-values	14
Table 5. Dissolved oxygen concentration	14
Table 6. Hardness and total organic carbon	14
Table 7. Observation on behaviour of the test substance in an aquaria	15
Table 8. Illuminance	15
Table 9. Measurement of length for <i>Danio rerio</i>	15
Table 10. Measurement of body weight for <i>Danio rerio</i>	15
8. Appendices	16
Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water	16
Appendix 2. Positive control study	17

8/13/2018 10:14:14 AM
 8/13/2018 10:14:14 AM
 8/13/2018 10:14:14 AM
 8/13/2018 10:14:14 AM

1. 요약 [Summary]

토탈삭의 담수어류에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사농도 (LC_{50})를 산출하기 위해 제브라피쉬 (*Danio rerio*)를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 제품 100% 기준으로 100.000 mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며 시험물질에 대한 담수어류 급성독성시험의 결과는 아래와 같다.

Time	LC_{50}^a (mg/L)	95% confidence limits (mg/L)
24, 48, 72 & 96 hr	> 100.000 ^b	-

a: Median lethal concentration

b: Based on product

이상의 시험결과, 유기농업자재 토탈삭의 제브라피쉬에 대한 24 시간, 48, 72 및 96시간 반수치사농도 (LC_{50})는 제품 100% 기준으로 기초시험농도 100.0 mg/L를 초과하였다.

토탈삭

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

토탈삭의 담수어류 (제브라피쉬, *Danio rerio*) 급성독성시험

2.2. 시험물질

토탈삭

2.3. 시험목적

토탈삭에 대한 담수어류 급성독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용하고자한다.

2.4. 시험방법

"농약 및 원제의 등록기준" [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2024-13호)에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭: (주)케이엔텍

소재지: 경기도 화성시 우정읍 만곡동1길 42

2.6. 시험기관

명칭: (주)한국생물안전성연구소

소재지: 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

연락처: Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭: (주)한국생물안전성연구소 GLP 연구 A동 어독성실험실

2.8. 시험책임자

성명: 오현택

소속: (주)한국생물안전성연구소 독성연구팀

본 시험은
KBSI
에서
수행되었습니다.

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제: 김현정, 이대경

시험물질의 노출: 김현정, 이대경

관찰/측정/평가: 김현정

사육관리: 김해경

2.10. 시험일정

예비시험기간 2024년 08월 26일 ~ 2024년 08월 30일

본시험순화기간 : 2024년 08월 26일 ~ 2024년 09월 01일

본시험시험물질 노출일: 2024년 09월 02일

본시험 종료일: 2024년 09월 06일

최종보고서 제출일: 2024년 12월 26일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호: 24-1-027

시험물질보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호: ETF-24028

시험기초자료: 자료보관실

최종보고서: 자료보관실

자료하드디스크: 자료보관실

자료보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

자료관리담당자: 박동혁

3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

3.1. 시험물질

- 3.1.1. 물질명: 토탈씩
- 3.1.2. 입수일: 2024년 08월 22일
- 3.1.3. 입수량: 1.5 kg
- 3.1.4. 시료번호: 24-1-027
- 3.1.5. 성상 및 외관: 고상, 회색
- 3.1.6. 주원료: 낭독추출물, 자몽종자추출물
- 3.1.7. 주원료 투입비율: 20% (낭독추출물 10%+자몽종자추출물 10%)
- 3.1.8. 보관조건: 상온
- 3.1.9. 공급원: ㈜케이엔텍

3.2. 시험생물

- 3.2.1. 시험어종 (학명): 제브라피쉬 (*Danio rerio*)
- 3.2.2. 시험종 선정이유: 본 시험에 사용된 *Danio rerio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.
- 3.2.3. 공급원
 - 명칭: 아쿠아캡&동탄수족관
 - 입수일: 2024년 07월 03일
- 3.2.4. 사육
 - 사육장소: GLP 연구 A동 담수어류 사육실2
 - 사육온도: 21.0 ~ 25.0°C
 - 광조건: 조명 16시간, 암 8시간
 - 먹이급이: 1일 1회 급이, Top Meal [관상어 전문사료] 제일사료㈜

3.3. 시험방법

- 3.3.1. 순화
 - 순화장소: GLP 연구 A동 어독성실험실
 - 사용수조: 시험어류의 단위체중 0.8 g 당 시험용수의 양이 1 L가 넘도록 사용하였다.
 - 순화환경: 순화기간동안 시험조건과 동일한 수온에서 유지되도록 하였으며, 순화중인 사육수의 용존산소량을 포화농도의 80% 이상으로 유지하기 위하여 연속폭기의 산소공급을 실시하였다.
 - 순화온도: 21.0 ~ 25.0°C

- 광조건: 조명 16시간, 암 8시간 (명조건시 조도 540 ~ 1000 Lux)
- 마리수 및 기간: 독성시험에 필요한 마리수의 110%이상을 시험시작 전 7일 이상 순화하였다.
- 먹이급여 : 사육시 공급한 사료를 주 5회 이상 급여 하고, 시험시작 24시간 이전부터 절식하였다.

3.3.2. 시험농도 및 노출 마리 수

예비시험결과 기초시험농도인 제품 100% 기준으로 100.0 mg/L에서 치사 개체가 관찰되지 않아 제품 100% 기준 100.0 mg/L 단일농도로 재시험을 실시하였으며, 제브라피쉬 7마리를 노출시켰다. 대조군은 무처리한 시험용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 7마리를 노출시켰다.

3.3.3. 시험물질의 조제

시험물질 0.200 g을 칭량하여 2 L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 제품기준 100.0 mg/L의 시험용액을 조제하였다.

3.3.4. 시험물질 적용방법

- 시험용기: 3.4 L 용량의 시험용 수조 (원통형 유리제)
 - 노출기간: 시험물질 노출 후 96시간
 - 시험용수: 독성시험에 사용된 시험용수는 조제수 (ISO 7346-1)를 사용하였다.
 - 수질기준: 시험용수의 물리화학적 수질 항목 중 입자상 물질, 총유기탄소 (TOC), 암모니아, 질산염 및 잔류염소는 당소에서 측정하였고, 그 외 항목은 외부 분석기관을 통해 측정하였다 (Appendix 1).
- 또한 조제수는 각 배치마다 질산염과 잔류염소를 측정하여 적합성을 확인한 후 1일 이상 폭기하여 사용하였다. 수온은 순화온도와 동일한 범위 (21.0 ~ 25.0°C) 내로 유지하되 시험기간 중 수온의 변화는 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도 60%를 유지하도록 하였다.

3.3.5. 시험 대조군

- 음성대조군: 시험용수인 조제수를 음성대조군으로 사용하였다.
- 양성대조군: 가장 최근에 양성대조물질로 시험한 GLP 담수어류급성독성시험 결과를 적용하였다 (Appendix 2).

4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

4.1. 관찰

시험생물 투입 후 2, 5시간 및 1일차부터 3일차까지 이른 오전, 늦은 오후에 하루 2번씩 관찰을 실시하였고, 4일차에는 96시간 (오전) 관찰만 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

4.2. 시험환경측정

4.2.1. 수질측정

수온과 pH 및 DO는 시험생물 노출기간 동안 1일 1회 측정하였다. 총유기탄소와 경도는 시험생물 노출 시작 시 측정하였다.

4.2.2. 광조건 측정

광조건은 일 기준 명 16시간, 암 8시간으로 하고, 명조건시 노출개시일과 노출종료일에 조도를 측정하였다.

4.3. 전장 및 체중 측정

시험종료 후 음성대조군 모든 개체의 전장 및 체중을 측정하였다.

4.4. 시험결과의 표시 및 통계처리방법

시험물질 투여 후 경과시간별 누적치사율을 사용하여 결과를 나타냈으며, 기초시험 단계에서 시험이 종료되어 통계처리는 하지 않았다.

5. 시험결과 [Results]

5.1. 치사개체 및 이상증상

노출기간 96시간동안, 음성대조군 및 시험물질 처리군인 100.0 mg/L 농도군에서 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다 (Table 1, 2).

5.2. 시험환경조건

시험기간 동안 수온은 평균 23.3°C (23.2 ~ 23.4°C), pH는 평균 8.22 (8.07 ~ 8.35), 용존산소농도는 포화용존산소량 대비 평균 91.9% (86.9 ~ 94.7)로 측정되었다. 또한, 조도는 평균 905 Lux (825 ~ 987 Lux), 사용한 시험용수의 경도는 152 mg CaCO₃/L, 총유기탄소는 0.0250 mg/L로 측정되었다.

음성대조군 및 시험용수의 동태는 시험기간동안 맑고 투명하였다 (Table 3 ~ 8).

5.3. 전장 및 체중

노출종료 후 음성대조군 시험어의 전장 및 체중을 측정한 결과, 전장은 평균 1.74 cm (1.42 ~ 1.97 cm), 체중은 평균 0.040 g (0.021 ~ 0.053 g)으로 측정되었다 (Table 9, 10).

5.4. 급성독성시험결과

유기농업자재 토탈싹의 (제브라피쉬, *Danio rerio*)에 대한 24, 48, 72 및 96시간 반수치사농도 (LC₅₀)는 모두 제품기준 100.0 mg/L를 초과하였다.

6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2024-13호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (2024.07.04)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 (2020.12.08) “유기농업자재 공시 기준”.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203 "Fish, Acute Toxicity Test (Adopted : June 18, 2019)"

7. Tables

Table 1. Cumulative mortality of *Danio rerio*

Nominal concentration (mg/L) ^a	Number of fish	Cumulative mortality								
		2 hr	5 hr	1 day		2 day		3 day		96 hr
				24 hr	31 hr	48 hr	55 hr	72 hr	79 hr	
Control	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100.0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a: Based on product

Table 2. Abnormal response of *Danio rerio*

Nominal concentration (mg/L) ^a	Number of fish	Abnormal response								
		2 hr	5 hr	1 day		2 day		3 day		96 hr
				24 hr	31 hr	48 hr	55 hr	72 hr	79 hr	
Control	7	NOR(7 ^b)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)
100.0	7	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)

a: Based on product

b: Number of fish

※ Observation key

NOR: Normal

Table 3. Temperature

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	23.3 ^b	23.2	23.3	23.4	23.2
100.0	23.2	23.2	23.3	23.4	23.2

a: Based on product

b: Unit : °C

c: Not applicable, (not observed because of 100% mortality)

Table 4. pH-values

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	8.21	8.35	8.29	8.27	8.24
100.0	8.20	8.23	8.18	8.17	8.07

a: Based on product

Table 5. Dissolved oxygen concentration

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	86.9 ^b	89.9	91.9	93.1	92.6
100.0	94.0	91.5	91.0	94.7	93.4

a: Based on product

b: Unit : %_{sat}.**Table 6. Hardness and total organic carbon**

Test group	Hardness (mg CaCO ₃ /L)	Total organic carbon (mg/L)
Control	152	0.0250

Table 7. Observation on behaviour of the test substance in an aquaria

Nominal concentration (mg/L)	Behaviour of the test substance in an aquaria				
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	0	0	0	0	0
100.000	0	0	0	0	0

a: Based on product

※ Observation key

0: No remarkable observation, clear test medium

Table 8. Illuminance

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	96 hr
Control	870 ^b	987
100.000	825	936

a: Based on product

b: Unit : Lux

Table 9. Measurement of length for *Danio rerio*

Group	Length (cm)							Mean (min~max)
	1	2	3	4	5	6	7	
Control	1.88	1.84	1.94	1.97	1.42	1.52	1.62	1.74 (1.42~1.97)

Table 10. Measurement of body weight for *Danio rerio*

Group	Weight (g)							Mean (min~max)
	1	2	3	4	5	6	7	
Control	0.051	0.048	0.053	0.048	0.021	0.027	0.030	0.040 (0.021~0.053)

4502

8. Appendices

Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water

Parameter	Maximum concentration	Results
Particulate matter	5 mg/L	0.02 mg/L
Total organic carbon (TOC)	2 mg/L	0.0252 mg/L
Un-ionised ammonia (NH ₃)	1 µg/L	ND ^a
Nitrate (NO ₃)	< 9 mg/L	7.5 mg/L
Residual chlorine	10 µg/L	ND
Total organophosphorus pesticides	50 ng/L	ND
Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls (including PCBs)	50 ng/L	ND
Total organic chlorine	25 ng/L	ND
Aluminium (Al)	1 µg/L	ND
Arsenic (As)	1 µg/L	ND
Chromium (Cr)	1 µg/L	ND
Cobalt (Co)	1 µg/L	ND
Copper (Cu)	1 µg/L	ND
Iron (Fe)	1 µg/L	ND
Lead (Pb)	1 µg/L	ND
Nickel (Ni)	1 µg/L	0.01 µg/L
Zinc (Zn)	1 µg/L	ND
Cadmium (Cd)	100 ng/L	ND
Mercury (Hg)	100 ng/L	10 ng/L
Silver (Ag)	100 ng/L	ND

a: Not detected

Appendix 2 Positive control study

- Recently historical data

GLP Study No.	Test period	LC ₅₀ ^a (95% confidence interval) [mg/L]	
		24 hr	48, 72, 96 hr
24-KET-PB001	2024.06.24~ 2024.07.05	2.734 (2.193~3.409)	2.582 (2.321~2.872)

a: Based on nominal concentration

b: 95% confidence interval

* Test substance : 3,5-Dichlorophenol

* Test species : *Danio rerio*

96 hour LC₅₀ was suitable the positive control criteria of the Korea Bio-Safety Institute Co., Ltd (KBSI) SOP.