

최종보고서

토탈썩 플러스의 꿀벌(*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험

OTBC-25016

(주)한국독성시험연구소 



제 출 문

시험물질: 토탈삭 플러스

시험제목: 토탈삭 플러스의 꿀벌(*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2025-13호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2025년 10월 01일

(주)한국독성시험연구소

시험책임자 조 인 선

서명 

목 차

보고서 표지	1
제출문	2
목차	3
요약	4
1. 시험실시의 개요	5
1.1. 시험제목	5
1.2. 시험물질	5
1.3. 시험목적	5
1.4. 시험방법	5
1.5. 시험의뢰자	5
1.6. 시험기관	5
1.7. 시험장소	5
1.8. 시험책임자	5
1.9. 시험참여자	5
1.10. 시험일정	6
1.11. 시험물질 보관	6
1.12. 자료보관	6
2. 재료 및 방법	7
2.1. 시험물질	7
2.2. 시험계	7
2.3. 시험재료 및 준비	7
2.4. 시험방법	8
3. 관찰 및 측정	10
3.1. 관찰	10
3.2. 실내온도 및 상대습도	10
3.3. 시험결과의 표시 및 통계처리방법	10
4. 시험결과	11
4.1. 시험환경 조건	11
4.2. 치사개체 및 이상증상	11
4.3. 급성접촉독성시험 결과	11
5. 참고문헌	12
6. Tables	13
Table 1. Cumulative mortality of honeybees	13
Table 2. Behavioral abnormalities of honeybees	14
7. Appendices	15
Appendix 1. Positive control study	15
Appendix 2. Temperature and relative humidity	16



요 약

토탈씩 플러스의 꿀벌에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사약량(LD₅₀)을 산출하기 위해 48시간동안 급성접촉독성시험을 수행하였다.

시험약량은 무처리군과 음성대조군(Acetone, 1μL/bee) 및 제품(100%) 기준 100.000 μg/bee로 설정하였다.

시험생물은 무처리군과 음성대조군 및 시험물질 처리군 당 각각 10마리씩 3반복으로 노출시켰다.

시험물질 노출 후 48시간 동안 관찰한 결과, 무처리군과 음성대조군 그리고 시험물질 처리군의 모든 개체는 정상으로 관찰되었다.

본 시험의 결과는 아래와 같다.

Observation time (hr)	LD ₅₀ ^a (μg/bee)	95% confidence limits (μg/bee)	NOEC ^b (μg/bee)
24 & 48	> 100.000	NA ^b	100.000

a: Based on product-nominal dose

b: Not applicable

토탈씩 플러스의 꿀벌에 대한 24, 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 제품기준으로 100.000 μg/bee 초과였다.

1.10. 시험일정

시험물질 노출일:	2025년 08월 27일
관찰/측정/평가:	2025년 08월 27일 ~ 2025년 08월 29일
관찰 종료일:	2025년 08월 29일
최종보고서 제출일:	2025년 10월 01일

1.11. 시험물질 보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호	25-A-OT-019
시험물질보관기간	유기농업자재 공시 후 3년

1.12. 자료보관

본 시험의 시험기초자료 및 시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호	OTBC-25016
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자	조인선

2. 재료 및 방법

2.1. 시험물질

2.1.1. 물질명	토탈썩 플러스
2.1.2. 입수일	2025년 08월 06일
2.1.3. 입수량	200 mL
2.1.4. 시료번호	25-A-OT-019
2.1.5. 성상 및 외관	액상, 연갈색
2.1.6. 주원료	자몽종자추출물, 낭독추출물
2.1.7. 주원료 투입비율	자몽종자추출물 45%, 낭독추출물 45%
2.1.8. 보관조건	실온
2.1.9. 공급원	주식회사 케이엔텍

2.2 시험계

2.2.1. 시험종	꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)
2.2.2. 시험종 선정이유	본 시험에 사용된 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)은 환경생물독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 해당 시험고시에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.
2.2.3. 공급원	
명칭	화진벌꿀
주소	경기도 화성시 장안면 큰사수리길 56-6
입수일	2025년 03월 17일
2.2.4. 사육	
사육장소:	(주)한국독성시험연구소 꿀벌 야외사육소
사육상자:	장방형 나무소재 벌통
사육조건:	당 연구소는 입수일로부터 본 시험 시까지 옥상의 야외사육소에서 꿀벌을 자연사육 및 순화하였다.
사육관리:	입수 이후 시험 전까지 벌집 내부를 점검하여 봉군의 건강상태를 확인 및 관리하였다.

2.3 시험재료 및 준비

2.3.1. 시험용 용기

스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용케이지에 입구를 원통형 유리제 급식관(직경 1 cm, 길이 5 cm 정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫린 마개를 사용하였다.



2.3.2. 먹이

실험실시 전 50% 자당용액을 유리급식관에 2 mL 이상 채워 준비하였다.

2.3.3. 시험물질 노출 전 시험생물 준비

환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO₂ gas로 마취시킨 후, 어린 개체를 제외하고 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25±2℃의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다.

2.4. 시험방법

2.4.1. 시험약량 설정

본 시험물질의 자몽종자추출물과 낭독추출물이라 문헌조사 꿀벌에 대한 독성이 낮을 것이라 판단되어 기초시험농(한계시험농도)로 시험약량을 설정하여 진행하고 독성이 관찰되면 추가로 예비시험을 진행하고자 하였다. 그러나 기초시험 농도에서 독성이 관찰되지 않아 예비시험은 생략하였다.

2.4.2. 시험용액 조제

시험물질이 액상으로 저울로 0.100g을 칭량하여 1mL acetone에 현탁시킨 이후 vortex mixer를 이용해 충분히 용해시켜 제품 기준 100.000 µg/µL의 시험용액(Test solution)을 조제하였다.

2.4.3. 시험물질 노출

케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 밀봉팩에 담아 CO₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, 조제된 시험용액을 micro applicator를 사용하여 마취된 꿀벌의 흉부(등부위)에 각각 1 µL씩 처리하였다.

2.4.4. 노출 생물수

무처리군과 음성대조군 그리고 시험물질 처리군 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다.

2.4.5. 대조군 설정

무처리군: 마취 후 어떠한 자극도 주지 않았다.
음성대조군: Acetone을 개체 당 1 µL씩 처리 하였다.
양성대조군: 가장 최근에 실시한 시험결과로 대체하였다(Appendix 1).

2.4.6. 시험환경

기간: 48시간
광주기: 암조건(관찰시간 제외)
온도: 25±2℃



상대습도: 50~70%

먹이공급: 시험물질이 처리된 벌을 다시 케이지에 옮긴 후, 50%
자당용액이 들어있는 급식관을 공급하였다.

3. 관찰 및 측정

3.1. 관찰

시험물질 노출 후 4, 24시간 및 48시간 경과 시에 이상증상 및 치사 개체를 관찰하였다. 이상증상은 일반중독증상, 특이증상 등을 관찰하였으며, 치사 개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리 및 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

3.2. 실내온도 및 상대습도

실험실 실내온도 및 상대습도는 시험개시부터 60분 간격으로 자동 전자 온습도 기록계(HE-173, HUATO)를 이용하여 측정하였다.

3.3. 시험결과의 표시 및 통계처리방법

본 시험이 기초시험(한계시험) 단계에서 종료됨에 따라 제품 기준으로 설정한 기초시험 약량의 초과로서 24, 48시간 반수치사약량(LD₅₀)을 표기하였다.

4. 시험결과

4.1. 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 24.9℃(23.4~26.6℃), 상대습도는 평균 59.3%(50.1~69.2%)로 측정되었다(Appendix 2).

4.2. 치사개체 및 이상증상

시험물질 노출 후 48시간동안 관찰한 결과, 무처리군과 음성대조군(Acetone 1 µL/bee) 그리고 시험물질 처리군(100.000 µg/bee)의 모든 개체는 정상으로 관찰되었다(Table 1, 2).

4.3. 급성접촉독성시험 결과

이상의 시험 결과, 토탈씩 플러스의 꿀벌에 대한 24시간과 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 제품 기준으로 모두 100.000 µg/bee 초과였다.

Observation time (hr)	LD ₅₀ ^a (µg/bee)
24 & 48	> 100.000

a: Based on product-nominal dose

5. 참고문헌

- 5.1. 농촌진흥청 고시 제2025-13호(2025.07.04) “농약 및 원제의 등록기준”, [별표 13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”, “13-1-4. 꿀벌급성독성시험”, “13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성”
- 5.2. 국립농산물품질관리원 고시 제2024-16호(2024.12.03) “유기농업자재 공시 업무 규정”.
- 5.3. OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 214 "Honeybees, Acute Contact Toxicity Test(adopted: Sep. 21, 1998)”

6. Tables

Table 1. Cumulative mortality of honeybees

Nominal dose ^a (µg/bee)	Exposed honeybees	Cumulative mortality			Mortality (Death / Total)	
		4 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Untreated control	10	0	0	0	0.0% (0 / 30)	0.0% (0 / 30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
Negative control (Acetone 1 µL/bee)	10	0	0	0	0.0% (0 / 30)	0.0% (0 / 30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
100.000	10	0	0	0	0.0% (0 / 30)	0.0% (0 / 30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		

a: Based on product

Table 2. Behavioral abnormalities of honeybees

Nominal dose ^a (µg/bee)	Exposed honeybees	Abnormal response		
		4 hr	24 hr	48 hr
Untreated control	10	N(10 ^b)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
Negative control (Acetone 1 µL/bee)	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
100.000	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)

a: Based on product
b: Number of honeybees

※ Observation key
N: Normal
A: Hyperactivity
B: Mobile but not working or flying normally
C: Alive but unable to walk or fly
NA: Not applicable, not observed because of 100% mortality



7. Appendices

Appendix 1. Positive control study

– Recently study data

Study No.	Study period	LD ₅₀ ^a (µg a.i./bee)	
		24 hr	48 hr
CTBC-25002	Apr. 09, 2025 ~ Apr. 11, 2025	0.182	0.107

a: Based on nominal dose

- * Test substance: Dimethoate
- * Test species: *Apis mellifera*

Appendix 2. Temperature and relative humidity

– Recording period: Aug. 27, 2025 ~ Aug. 29, 2025

