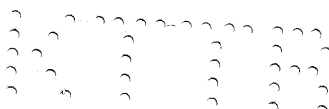


최종보고서

토탈싹 플러스의 담수어류(제브라피쉬, *Danio rerio*)
급성독성시험

OTF-25014

(주)한국독성시험연구소 **KTTR**



제 출 문

시험물질: 토탈씩 플러스

시험제목: 토탈씩 플러스의 담수어류(제브라피쉬, *Danio rerio*) 급성독성시험

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	5
1. 시험실시의 개요	6
1.1. 시험제목	6
1.2. 시험물질	6
1.3. 시험목적	6
1.4. 시험방법	6
1.5. 시험의뢰자	6
1.6. 시험기관	6
1.7. 시험장소	6
1.8. 시험책임자	6
1.9. 시험참여자	6
1.10. 시험일정	7
1.11. 시험물질 보관	7
1.12. 자료보관	7
2. 재료 및 방법	8
2.1. 시험물질	8
2.2. 시험계	8
2.3. 시험방법	8
3. 관찰 및 측정	10
3.1. 관찰	10
3.2. 시험환경측정	10
3.3. 시험생물의 전장 및 체중 측정	10
3.4. 시험결과의 표시 및 통계처리방법	10
4. 시험결과	11
4.1. 치사개체 및 이상증상	11
4.2. 시험환경조건	11
4.3. 전장 및 체중	11
4.4. 급성독성시험결과	11
5. 참고문헌	12
6. Tables	13
Table 1. Cumulative mortality of Danio rerio	13
Table 2. Abnormal response of Danio rerio	13
Table 3. Temperature	14
Table 4. pH-values	14

Table 5. Dissolved oxygen concentration	14
Table 6. Hardness	14
Table 7. Total organic carbon	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
7. Appendices	16
Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water	16
Appendix 2. Positive control study	17

요 약

토탈씩 플러스의 담수어류에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사농도(LC₅₀)를 산출하기 위해 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

본 시험은 농촌진흥청 고시 제2025-13호 “농약 및 원제의 등록기준”, [별표 13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”, “13-1-1. 담수어류급성독성시험”에 따라 수행되었다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 제품 100% 기준으로 기초시험농도 100.000 mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며 결과는 아래와 같다.

Time	LC ₅₀ ^a (mg/L)	95% confidence limits (mg/L)	NOEC ^b (mg/L)
24, 48, 72, 96 hr	> 100.000	NA	100.000

a: Median lethal concentration

b: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서, 유기농업자재 토탈씩 플러스의 제브라피쉬에 대한 24, 48, 72 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 제품 100% 기준으로 100.000 mg/L 초과였다. 무영향관찰 농도(NOEC)는 100.000 mg/L 이었다. 토탈씩 플러스는 농약관리법 시행규칙 [별표 3의 5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 III급(저독성)으로 구분되었다.

1.10. 시험일정

시험순화사육기간	2025년 08월 11일~2025년 08월 17일(예비)
	2025년 08월 25일~2025년 08월 31일(기초)
시험물질 노출일	2025년 08월 18일(예비)
	2025년 09월 01일(기초)
시험 종료일	2025년 08월 22일(예비)
	2025년 09월 05일(기초)
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	OTF-25014
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자	조인선

2. 재료 및 방법

2.1. 시험물질

2.1.1. 물질명	토탈씩 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. 시험어종(학명)	제브라피쉬(<i>Danio rerio</i>)
2.2.2. 시험종 선정이유	본 시험에 사용된 <i>Danio rerio</i> 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.

2.2.3. 공급원

- 명칭	㈜아쿠아캡&동탄수족관
- 입수일	2025년 3월 31일

2.2.4. 사육

- 사육장소	생태 생물 사육실1
- 사육온도	21.0~25.0℃
- 광조건	조명 16시간, 암 8시간
- 먹이급이	1일 1회 급이, Guppymeal [관상어 전문사료] 제일사료㈜

2.2.5. 동물윤리

본 시험은 동물보호법(법률 제20581호, 2024.12.20)에 따라 ㈜한국독성시험연구소 동물실험윤리위원회 규정을 준수하여 실시하였다(동물실험계획 승인서 승인번호: AGRN25030).

2.3. 시험방법

2.3.1. 순화

- 순화장소	생태독성 사육실1
- 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℃
- 광조건 조명 16시간, 암 8시간
- 마리수 및 기간 독성시험에 필요한 마리수의 110% 이상을 시험시작 전 7일 이상을 순화하였다.
- 먹이급이 사육 시 공급한 사료를 1일 1회 급이하였고, 시험시작 24시간부터 절식하였다.

2.3.2. 시험농도 및 노출 마리 수

예비시험 결과 기초시험농도인 제품 100% 기준으로 100.000 mg/L에서 치사개체가 관찰되지 않아 제품 100% 기준 100.000 mg/L 단일농도로 재시험을 실시하였으며, 제브라피쉬 7마리를 노출 시켰다. 대조군은 무처리한 시험용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 7마리를 노출 시켰다.

2.3.3. 시험물질의 조제

시험물질 0.200 g을 칭량하여 2 L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 제품 100% 기준 100.000 mg/L의 시험용액을 조제하였다.

2.3.4. 시험물질 적용방법

- 시험용기 5 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℃) 내로 유지되 시험기간 중 수온의 변화는 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도 60%를 유지하도록 하였다.

2.3.5. 시험 대조군

- 음성대조군 시험용수인 조제수를 음성대조군으로 사용하였다.
- 양성대조군 가장 최근에 양성대조물질 Copper(II) Sulfate Pentahydrate로 시험한 담수어류급성독성시험 결과를 적용하였다(Appendix 2).

3. 관찰 및 측정

3.1. 관찰

시험생물 투입 후 3, 6시간 및 24시간부터 이른 오전, 늦은 오후에 하루 2번씩 72시간까지 관찰을 실시하였고, 96시간은 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.

3.2. 시험환경측정

3.2.1. 수질측정

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

3.2.2. 광조건 측정

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

3.3. 시험생물의 전장 및 체중 측정

시험종료 후 음성대조군 모든 개체의 전장 및 체중을 측정하였다.

3.4. 시험결과의 표시 및 통계처리방법

시험물질 투여 후 경과시간별 누적치사율을 바탕으로 결과를 나타냈으며, 기초시험단계에서 시험이 종료되어 통계처리는 하지 않았다.

4. 시험결과

4.1. 치사개체 및 이상증상

노출기간 96시간동안, 음성대조군 및 시험물질 처리군인 100.000 mg/L 농도군에서는 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다(Table 1, 2).

4.2. 시험환경조건

시험기간 동안 수온은 평균 23.4℃(23.1~23.8℃), pH는 평균 7.30(7.10~7.47), 용존산소농도는 포화용존산소량 대비 평균 89.0%(85.5~92.5%)로 측정되었다. 또한, 조도는 평균 797 Lux(764~825 Lux), 사용한 시험용수의 경도는 152 mg CaCO₃/L, 총유기탄소는 0.300 mg/L로 측정되었다(Table 3~8).

4.3. 전장 및 체중

노출종료 후 음성대조군 시험어의 전장 및 체중을 측정한 결과, 전장은 평균 1.81 cm(1.59~1.96 cm), 체중은 평균 0.040 g(0.032~0.051 g)으로 측정되었다(Table 9, 10).

4.4. 급성독성시험결과

유기농업자재 토탈썩 플러스의 담수어류(제브라피쉬, *Danio rerio*)에 대한 48 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 100.000 mg/L 초과였고, 무영향관찰 농도(NOEC)는 100.000 mg/L이었으며 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 III급(저독성)으로 구분되었다.

[표 1. 어류에 대한 독성정도에 따른 농약등의 구분]

구 분	반수를 죽일 수 있는 농도(mg/l, 96시간)
I 급	1 이하
II 급	1 초과 10 이하
III 급	10 초과

※ 농약관리법 시행규칙 별표3의 5, 농약등의 독성 및 잔류성 정도별 구분

5. 참고문헌

- 5.1. 농촌진흥청 고시 제2025-13호(2025.07.04) “농약 및 원제의 등록기준”, [별표 13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”
- 5.2. 국립농산물품질관리원 고시 제2024-16호(2024.12.03) “유기농업자재 공시 업무 규정”.
- 5.3. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203 "Fish, Acute Toxicity Test (Adopted : June 18, 2019)”
- 5.4. 농림축산식품부 법률 제20581호(2024.12.20.) “동물보호법”



6. Tables

Table 1. Cumulative mortality of *Danio rerio*

Nominal concentration (mg/L) ^a	Number of fish	Cumulative mortality								
		3 hr	6 hr	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr
				1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	
Control	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100.000	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			
		3 hr	6 hr	24 hr	
				1st	2nd
Control	7	NOR(7 ^b)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)
100.000	7	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)

Nominal concentration (mg/L) ^a	Number of fish	Abnormal response				
		48 hr		72 hr		96 hr
		1st	2nd	1st	2nd	
Control	7	NOR(7 ^b)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)
100.000	7	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)	NOR(7)

a: Based on product

b: Number of fish

※ Observation key

NOR : Normal

NOT

Table 3. Temperature

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	23.1 ^b	23.4	23.6	23.2	23.8
100.000	23.1	23.4	23.6	23.2	23.8

a: Based on product

b: Unit : °C

Table 4. pH-values

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	7.22	7.32	7.27	7.17	7.10
100.000	7.42	7.47	7.41	7.36	7.28

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	92.5 ^b	90.4	88.9	89.1	89.6
100.000	88.3	91.1	87.5	87.2	85.5

a: Based on product

b: Unit : %_{sat.}

Table 6. Hardness

Test group	Hardness (mg/L, CaCO ₃)
Control	152

Table 7. Total organic carbon

Test group	Total organic carbon (mg/L)
Control	0.300

Table 8. Illuminance

Nominal concentration ^a (mg/L)	0 hr	96 hr
Control	825 ^b	818
100.000	782	764

a: Based on product

b: Unit : Lux

Table 9. Measurement of length for *Danio rerio*

Group	Length (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	Mean (min~max)
Control	1.69	1.83	1.94	1.59	1.81	1.96	1.87	1.81 (1.59~1.96)

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

Group	Weight (g)							
	1	2	3	4	5	6	7	Mean (min~max)
Control	0.036	0.037	0.051	0.032	0.039	0.045	0.042	0.040 (0.032~0.051)

7. Appendices

Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water

Parameter	Maximum concentration	Results
Particulate matter	5 mg/L	1.5 mg/L
Total organic carbon (TOC)	2 mg/L	1.9 mg/L
Un-ionised ammonia (NH ₃)	1 µg/L	ND ^a
Nitrate (NO ₃)	< 9 mg/L	1.4 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	0.90 µg/kg
Arsenic (As)	1 µg/L	0.81 µg/kg
Chromium (Cr)	1 µg/L	0.01 µg/kg
Cobalt (Co)	1 µg/L	0.26 µg/kg
Copper (Cu)	1 µg/L	ND
Iron (Fe)	1 µg/L	0.11 µg/kg
Lead (Pb)	1 µg/L	0.07 µg/kg
Nickel (Ni)	1 µg/L	0.02 µg/kg
Zinc (Zn)	1 µg/L	0.03 µg/kg
Cadmium (Cd)	100 ng/L	ND
Mercury (Hg)	100 ng/L	ND
Silver (Ag)	100 ng/L	0.02 µg/kg

Appendix 2. Positive control study

Study No.	Study period	LC ₅₀ ^a (mg/L)		
		24 hr	48 hr	72 & 96 hr
CTF-25001	2025.01.24~ 2025.02.11	1.306	1.110	0.893

- a: Median lethal concentration
b: Based on nominal concentration
* Test substance : Copper(II) Sulfate Pentahydrate
* Test species : *Danio rerio*