

[별표 13]

환경생물 독성 시험기준과 방법

(제5조제1항제4호 관련)

13-1. 천연식물보호제에 해당되지 않는 농약

13-1-1. 담수어류급성독성시험 <개정 2010.2.9., 2021.9.28.>

13-1-1-1. 시험물질 : 품목 또는 원제 <개정 2019.3.21.>

13-1-1-2. 시험어류

13-1-1-2-1. 시험어종: 시험에는 건강하고 외형상 기형이 없는 균일한 개체를 사용하여야 한다. 추천 시험어종 별 수온, 전장 등의 시험조건은 아래 표를 따른다. 단, 벼재배용 농약(품목)에 대해서는 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 시험을 추가하여야 한다. <개정 2020.2.28., 2021.9.28.>

추천어종	수온 (°C)	염도 (%)	pH	경도 (mg/L CaCO ₃)	광주기 (hours light)	전장 (cm)
제브라피시 <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	21~25	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	1~2
북미산 잉어 <i>Pimephales promelas</i> (Fathead Minnow)	21~25	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	1~3
잉어 <i>Cyprinus carpio</i> (Carp)	20~24	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	2~4
송사리 <i>Oryzias latipes</i> (Japanese medaka)	23~27	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	1~2
구피 <i>Poecilia reticulata</i> (Guppy)	21~25	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	1~2
블루길 <i>Lepomis macrochirus</i> (Bluegill)	21~25	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	1~3
미꾸리 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (Dojo loach)	20~28	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	5~10
무지개송어 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	10~14	<0.2	6.0~8.5	40~250 가급적 < 180	12~16	3~6

13-1-1-2-2. <삭제 2021.9.28.>

13-1-1-2-3. 시험어류 순화 <신설 2020.2.28.>

13-1-1-2-3-1. 순화 및 급이 : 외부로부터 시험어류를 입수한 경우 최소 2일간의

정착기간이 필요하며, 시험조건과 동일한 환경하에서 최소한 1주일이상 순화시켜야 한다. 순화기간 동안 각 시험어종에 적합한 광주기, 수온 및 용존산소량 80% 이상을 유지해야한다. 시험물질 노출 24-48시간 전까지 주 3회 또는 매일 먹이를 공급하며, 노출 24시간 전에 공급을 중단해야 한다.

13-1-1-2-3-2. 순화 판정 기준 : 순화기간 동안 치사개체를 관찰하고 7일 동안 치사율 10% 초과 시 전체 폐기, 치사율이 5~10% 이면 7일간 추가로 순화하고 그 치사율이 5% 초과하면 전체 폐기해야 한다. 7일의 순화기간 동안 치사율이 5% 미만인 어류는 시험에 사용할 수 있다. 시험개체는 질병과 스트레스 징후를 보이지 않고, 기형이 없어야 하며 시험 전 14일 이내에 질병이나 기생충 치료를 받지 않아야 한다. <개정 2021.9.28.>

13-1-1-3. 광조건 : 하루 12~16 시간 조명하며 조도 540~1000 lux를 유지한다. <개정 2020.2.28.>

13-1-1-4. 시험용 수조 : 유리제품 수조를 이용하되 원통형의 경우 직경과 높이의 비율이 비슷한 것이 바람직하다.

13-1-1-5. 시험용수: 시험기간 중 수온의 변화는 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 이상 변화 되지 않도록 하고, 경도와 pH 등 수질환경은 시험기간 중 시험어종 별 최적범위내로 유지되어야 한다. 시험 결과에 과도한 영향을 미치거나, 생식에 부정적 영향이 미치지 않도록 시험용수는 아래 표 항목에 대해 최소 연 2회 분석을 수행하여 기준에 적합한지를 확인하여야 한다. 시험수조의 용수를 재순환 하는 경우 암모니아(NH_3)를 정기적으로 측정해야 하며, 자연수를 사용할 경우 용존유기탄소(Dissolved Organic Carbon, DOC) 또는 총 유기탄소(Total Organic Carbon, TOC)와 질산염(NO_3)을 시험 전에 측정하여야 한다. 탈염소수를 사용할 경우, 시험생물에 스트레스 징후를 보이지 않고 생존·성장·생식에 영향을 주지 않는다는 것을 입증해야 하며 각 시험용수 배치의 질산염과 염소를 분석하여 기준에 맞는지 확인하여야 한다. <개정 2021.9.28.>

항목	최고 농도
입자성 물질	5 mg/L
총 유기탄소 (TOC)*	2 mg/L
비이온화된 암모니아 (NH ₃)	1 µg/L
질산염 (NO ₃)	< 9 mg/L
잔류염소	10 µg/L
총 유기인계 농약	50 ng/L
총 유기염소계 농약 (PCBs 포함)	50 ng/L
총 유기염소	25 ng/L
알루미늄 (Al)	1 µg/L
비소 (As)	1 µg/L
크롬 (Cr)	1 µg/L
코발트 (Co)	1 µg/L
구리 (Cu)	1 µg/L
철 (Fe)	1 µg/L
납 (Pb)	1 µg/L
니켈 (Ni)	1 µg/L
아연 (Zn)	1 µg/L
카드뮴 (Cd)	100 ng/L
수은 (Hg)	100 ng/L
은 (Ag)	100 ng/L
화학적 산소요구량 (COD)*	5 mg/L

* TOC 또는 COD를 측정한다.

13-1-1-5-1. <삭제 2021.9.28.>

13-1-1-5-2. <삭제 2021.9.28.>

13-1-1-6. 시험농도설정 및 규모

13-1-1-6-1. 농도수준 및 시험어 수(試驗漁數)

13-1-1-6-1-1. 기초시험: 시험농도는 100ppm 으로 설정하고 시험어 수는 최소 7마리로 한다. <개정 2019.3.21., 2021.9.28.>

13-1-1-6-1-2. <삭제 2021.9.28.>

13-1-1-6-1-3. 본 시험: 시험농도는 5단계 이상으로 설정하며 농도수준당 어류는 7마리 이상으로 시험한다. <개정 2020.2.28.>

13-1-1-6-2. 농도수준간의 간격: 반수치사농도(LC₅₀)를 구할 수 있는 적당한 농도수준을 두고 농도수준 단계간에는 일정한 공비(公比)를 둔다. 공비는 2.2를 초과하지 않도록 하고 가능한 1.6~1.8의 공비를 사용한다. <개정 2021.9.28.>

13-1-1-6-3. 기초시험 결과 치사한 개체가 없을 경우는 동일농도에서 재시험을 실시하고 그 결과 치사한 개체가 10% 미만일 경우 그 이상의 시험농도수준 설정은 생략하고 시험을 종료한다. <개정 2013.6.28.>

13-1-1-6-4. 약제특성 및 문헌정보에 따라 농도수준 및 시험어 수를 증감할 수

있으며 기초시험 및 예비시험을 생략하고 본시험을 실시할 수 있다.

13-1-1-6-5. 시험어류와 시험용액의 비율 : 지수식 및 반지수식 시험인 경우 시험용액 1 L당 시험어류 단위체중이 0.8 g을 넘지 않도록 한다. 유수식 시험인 경우 24시간 동안 시험용액 1 L당 시험어류 단위체중이 0.5 g을 넘지 않도록 한다. 어떠한 경우에도 시험개체와 시험용액 비율이 5 g/L를 넘지 않도록 한다. <개정 2021.9.28.>

13-1-1-7. 대조군 설정 : 약제 조제시 사용된 용매 및 계면활성제를 가한 시험용수 자체를 음성 대조군으로 한다. 필요시(새로운 시험어류의 입수 등) pentachlorophenol sodium salt ($C_6Cl_5 NaO$), 3,5-dichlorophenol($C_6H_4Cl_2O$), cupric sulfate($CuSO_4$) 등을 양성대조군으로 하여 시험을 실시하도록 한다. <개정 2017.9.20., 2018.4.26., 2021.9.28.>

13-1-1-8. 시험용액 <개정 2021.9.28.>

13-1-1-8-1. 시험용액의 조제: 제품농약의 경우는 소량의 물에 미리 잘 교반하여 현탁시키고, 물에 용해 또는 현탁되지 않는 원제는 소량의 용매 및 계면활성제를 사용한다. 시험용액의 pH는 조절하지 않는다. 단, 이온화 물질의 경우 보다 독성이 강한 형태를 띠는 안정된 pH에서 시험이 수행되어야 하고 pH 6.0~8.5 범위를 벗어나지 않아야 한다. 물질 자체가 시험용액의 pH를 변화시켜 6.0~8.5 범위를 벗어나게 하는 경우는 농축액(stock solution)의 pH를 6.0~8.5 범위내로 조절한다. pH의 조절은 염산(HCl) 및 수산화나트륨(NaOH)를 사용한다.

13-1-1-8-2. 시험기간 중 시험용액의 농도 측정: 시험기간 중 최소한 최고 시험농도, 최저 시험농도, 예상되는 LC_{50} 에 가까운 시험농도의 시험물질 농도를 측정한다. 하지만 가능한 모든 시험농도를 측정하는 것이 바람직하다. 지수식 시험에서는 시험 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다. 반지수식 시험에서는 시험용액 교체 전후로 시험물질 농도를 측정한다. 유수식 시험에서는 노출 전에 시험농도 분석을 수행하여, 농도 및 유지 여부를 확인해야 한다.

13-1-1-8-3. 시험기간 중 시험농도의 유지: 시험기간 중 시험물질의 농도는 설정농도의 80% 이상 유지되어야 한다. 시험농도가 설정농도의 80%~120%로 유지될 가능성이 없는 경우, 모든 시험농도를 측정하고 분석 횟수를 추가한다(예, 노출 후 48시간 시험농도 분석 추가).

13-1-1-8-4. 시험결과 산출 농도: 일반적으로 시험결과는 측정농도로 산출하되, 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 초기측정농도의 $\pm 20\%$ 이내일 경우 설정농도 또는 초기측정농도로 산출할 수 있다.

- 13-1-1-9. 처리방법: 조제된 시험약량을 시험용수에 넣어 잘 교반시킨 다음 시험어를 넣고 이탈방지를 위한 망을 씌운다.
- 13-1-1-10. 관찰기간: 24시간 이내에는 최소 2회 관찰해야 하며 적어도 3시간의 간격을 두어야 한다. 96시간 동안 매일 관찰하되 노출 2일차부터는 생존개체가 있는 모든 수조를 하루 2회(가능한 이른 아침과 늦은 오후) 관찰해야 한다. <개정 2021.9.28.>
- 13-1-1-11. 관찰사항: 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사개체수를 관찰하며 치사된개체는 발견 즉시 수조에서 꺼낸다.
- 13-1-1-12. 체중 및 크기 측정: 시험종료후 음성대조군에 사용된 어류의 평균체중 및 전장을 측정한다.
- 13-1-1-13. 수질조사: 시험기간중의 수온, pH, 용존산소량은 24시간 간격으로 측정한다. 시험용액의 경도와 총 유기탄소(TOC)는 노출 시작 시 측정한다. 반지수식 시험인 경우 시험용수 교체 전후에 수온, pH, 용존산소량을 측정한다. <개정 2021.9.28.>
- 13-1-1-14. 반수치사농도(LC₅₀) 산출: 시험 물질 투여후 48시간 및 96시간에 대한 반수치사농도(LC₅₀) 및 95% 신뢰한계를 산출하여야 한다.(가능하다면 24, 48, 72, 96 시간의 LC₅₀를 산출한다). <개정 2019.3.21., 2021.9.28.>
- 13-1-1-15. 시험의 유효성 기준 : 음성대조군에서 시험종료 시 시험개체 치사율이 10%를 넘지 않아야 한다. 모든 시험수조에서의 시험기간 중 용존산소농도는 공기 중 포화농도의 60% 이상이 되도록 한다. 시험기간 중 시험물질의 농도를 측정한다. <신설 2021.9.28.>

13-1-2. 물벼룩급성독성시험 <개정 2010.2.9.>

- 13-1-2-1. 시험물질 : 품목 또는 원제 <개정 2019.3.21.>
- 13-1-2-2. 시험생물
- 13-1-2-2-1. 물벼룩종 : 국제표준종인 *Daphnia magna*를 사용함을 원칙으로 하되, 필요시 국내에서 채집한 종(*Moina macrocopa*, *Daphnia obtusa*, *Simocephalus vetulus* 등)으로 시험할 수 있다.
- 13-1-2-2-2. 나이 : 출산후 24시간 이내의 것으로 실험실 조건에서 최소한 3번 이상의 새끼를 출산한 건강한 어미에서 나온 건강하고 균일한 어린개체를 사용해야 한다.
- 13-1-2-3. 먹이공급 : 시험기간 중에는 먹이공급을 중단한다.

- 13-1-2-4. 시험용 수조 : 125ml 이상의 원통형 유리제품 수조로 직경과 높이의 비율이 비슷한 것이라야 한다.
- 13-1-2-5. 시험용수
- 13-1-2-5-1. 시험용수 : 실내사육시 사용한 것과 동일한 오염되지 않은 지하수, 자연수 또는 조제수 등을 사용하며 시험 시작전 24시간 동안 강하게 폭기시켜 사용한다.
- 13-1-2-5-2. 수온 : $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 범위내로 하되 시험기간중 수온의 변화는 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 이상이 되지 않도록 하여야 하며 수온은 시험기간중 매일 측정하여 기록한다.
- 13-1-2-5-3. 용존산소 : 시험기간동안의 용존산소의 농도는 포화농도의 60% 이상을 유지하여야 하며 시험의 시작과 끝에 용존산소의 농도를 측정하여 기록한다.
- 13-1-2-6. 시험농도 설정 및 규모
- 13-1-2-6-1. 농도수준 및 시험생물의 수
- 13-1-2-6-1-1. 기초시험 : 100ppm 으로 설정하고 시험물벼룩은 10마리 이상으로 한다. <개정 2019.3.21.>
- 13-1-2-6-1-2. 예비시험 : 시험농도는 3~7개 단계 범위내에서 설정하며 농도수준당 10마리 이상으로 시험한다.
- 13-1-2-6-1-3. 본시험 : 시험농도는 5단계 범위이상으로 설정하며 농도수준당 10마리씩 3반복 이상으로 시험한다.
- 13-1-2-6-2. 농도수준간의 간격 : 반수영향농도(EC_{50})치를 구할 수 있는 적당한 농도수준을 두고 농도수준 단계간에는 일정한 공비(公比)를 둔다. 단, 공비는 2이하로 할 것을 추천한다.
- 13-1-2-6-3. 시험용수의 양 : 시험용수는 물벼룩 마리당 10ml 이상이 되게 한다.
- 13-1-2-6-4. 100ppm 농도로 시험한 기초시험 결과 유영저해개체가 없을 경우는 10마리씩 3반복 이상으로 30마리 이상의 생물을 사용하여 재시험을 실시하고 그 결과 유영저해 개체가 10% 미만인 경우에는 그 이상의 시험농도 수준 설정은 생략한다. <개정 2019.3.21.>
- 13-1-2-6-5. 약제특성 및 문헌정보에 따라 농도수준 및 시험물벼룩수를 증감할 수 있으며 기초시험 및 예비시험을 생략하고 본 시험을 실시 할 수 있다.
- 13-1-2-7. 대조군 설정 : 약제 조제시 사용된 용매 및 계면활성제를 가한 시험용수 자체를 음성 대조군으로 하고 음성 대조군에서 10%이상 치사될 경우에는 재시험을 실시하여야 한다. 필요시(새로운 시험물벼룩의 입수, 새로운 시

험종에 대한 시험 등) potassium dichromate($K_2Cr_2O_7$)을 양성대조군으로 하여 시험을 실시하도록 한다. <개정 2017.9.20.>

13-1-2-8. 시험용액의 조제 : 제품농약의 경우는 소량의 물에 미리 잘 교반하여 현탁시키고 물에 용해 또는 현탁되지 않는 원제는 소량의 용매 및 계면활성제를 사용한다.

13-1-2-9. 처리방법 : 조제된 시험용액을 시험용수에 넣어 잘 교반시킨 다음 시험물벼룩을 넣고 오염방지를 위하여 유리덮개를 씌운다.

13-1-2-10. 관찰기간 : 약제 처리후 24, 48시간에 관찰한다.

13-1-2-11. 관찰사항 : 본적으로 유영저해 유무를 관찰한다. 유영저해의 판정은 시험용액을 가볍게 저어준 다음, 약 15초간 관찰하여 물의 흐름을 벗어나지 못하거나 유영하지 못하는 개체를 영향받은 것으로 간주한다. 유영저해 이외에도 형태이상, 치사유무 등도 관찰·기록한다.

13-1-2-12. 수질조사 : 시험기간 동안 수온은 매일 측정하고, pH, 용존산소량 등은 시험시작과 끝에 측정·기록한다. <개정 2013.6.28.>

13-1-2-13. 반수영향농도(EC_{50}) 산출 : 시험물질 투여후 48시간의 EC_{50} 과 95% 신뢰한계를 산출하여야 한다.

13-1-3. 지렁이 급성독성시험

13-1-3-1. 시험물질 : 제품 또는 원제

13-1-3-2. 시험생물

13-1-3-2-1. 시험종 : 국제표준종인 줄지렁이(*Eisenia fetida*)를 사용함을 원칙으로 하되 필요시 국내종인 붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*) 등을 사용할 수 있다.

13-1-3-2-2. 크기 : 2개월 이상 성숙한 것으로 300~600mg 정도의 건강하고 균일한 개체를 사용하여야 한다.

13-1-3-3. 순화 및 굵이 : 외부로부터 시험종 도입시 시험조건과 동일한 환경하에서 최소한 1주일이상 순화시키고 시험기간 중에는 먹이공급을 중단한다.

13-1-3-4. 시험용 용기 : 1ℓ의 유리제품 용기를 사용하되 원통형의 경우 직경과 높이의 비율이 비슷한 것이 바람직하다.

13-1-3-5. 인공토양의 조제

13-1-3-5-1. 인공토양의 조성 : 인공토양은 sphagnum peat : kaolin clay : 산업용 모래를 1:2:7의 비율(건조중)로 조제하여 사용한다. 각 조성별 구비조건은

아래와 같다.

o sphagnum peat : pH 5.5 ~6.0, 식물이 남아있지 않는 것으로 분말상이고 건조된 것.

o kaolin clay : kaolinite 함량이 30%이상

o 산업용 모래 : 입경 50~200 micron인 것이 50% 이상

13-1-3-5-2. 조제방법 : 위의 성분들을 정확히 측량한 후 pH를 6.0 ± 0.5 로 되도록 CaCO_3 를 일정량 가하여 소형믹서기 등을 사용하여 잘 혼합한다. 단, 시험물질을 유기용매에 녹여 처리할 경우는 처리가 용이하도록 사용될 모래 10g을 따로 떼어둔다.

13-1-3-6. 시험조건 : 도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 광은 400~800Lux로 시험 기간 내내 조사(照射)한다.

13-1-3-7. 시험농도 설정 및 규모

13-1-3-7-1. 농도수준

13-1-3-7-1-1. 예비시험 : 시험농도는 1,000, 100, 10, 1, 0.1mg 유효성분/kg(건조인공토양)으로 하고 시험 지령이 수는 농도수준당 10마리로 한다.

13-1-3-7-1-2. 본시험 : 시험농도는 5단계 이상으로 설정하며 농도수준당 10마리씩 4반복 이상으로 시험한다.

13-1-3-7-1-3. 예비시험결과 1,000ppm 농도에서 치사개체가 없을 경우는 그 이상의 시험농도수준 설정은 생략한다.

13-1-3-7-2. 농도수준간의 간격 : 반수치사농도(LC_{50})치를 구할 수 있는 적당한 농도수준을 두고 농도수준단계간에는 일정한 공비(公比)를 둔다. 단, 공비는 2이하로 할 것을 추천한다.

13-1-3-8. 대조군 설정 : 시험용액 조제시 사용된 용매 및 계면활성제를 음성대조군으로 하고 Chloroacetamide를 양성대조군으로 하여 시험을 실시하도록 한다. 음성 대조군에서 10%이상 치사될 경우에는 재시험을 실시하여야 한다.

13-1-3-9. 시험용액 조제 : 제품농약의 경우는 소량의 물에 미리 잘 교반하여 현탁시키고, 물에 용해 또는 현탁되지 않는 원제는 소량의 용매(아세톤, 헥산, 클로로포름 등) 및 계면활성제를 사용한다.

13-1-3-10. 시험물질처리 및 수분보정

13-1-3-10-1. 시험물질을 물에 녹인 경우 : 인공토양 500g(건물중)이상 에 조제된 시험용액을 가하고 소형믹서기 등을 사용하여 잘 혼합한다.

13-1-3-10-2. 시험물질을 유기용매에 녹인 경우 : 인공토양 조제시 미리 떼어둔

모래 10g에 조제된 시험용액을 가하여 섞은 다음 일정시간 방치하여 용매를 휘발시킨 후 이를 인공토양에 가하고 소형믹서기 등을 사용하여 잘 혼합한다.

13-1-3-10-3. 수분함량의 보정 : 증류수를 가하여 최종 수분함량이 40%정도가 되게 한다.

13-1-3-11. 지렁이의 투입 : 시험물질을 처리한 인공토양이 담긴 시험용기에 지렁이를 투입하고 수분방지를 위하여 플라스틱 필름을 덮고 적당하게 공기구멍을 내어 통기가 잘 되도록 한다.

13-1-3-12. 관찰기간 : 약제처리후 7일과 14일에 관찰한다.

13-1-3-13. 관찰사항 : 형태이상, 행동의 변화, 치사수 등을 관찰한다.

13-1-3-14. pH 및 체중측정 : 시험 개시전과 종료후에 시험토양의 pH, 수분함량 및 지렁이의 생체중을 측정한다.

13-1-4. 꿀벌급성독성시험 <개정 2010.2.9.>

13-1-4-1. 꿀벌접촉독성

13-1-4-1-1. 시험물질 : 원제 또는 제품

13-1-4-1-2. 시험생물 : 꿀벌(*Apis mellifera* L.)을 사용하여야 하며 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌 중 어린개체는 제외하고 사용한다.

13-1-4-1-3. 시험용 용기 : 시험용 케이지는 스텐레스 철망을 이용하여 길이 15Cm, 직경 5Cm 크기의 원통형으로 만든 다음 입구를 유리급식관(직경 1Cm, 길이 5Cm 정도)을 끼울수 있도록 구멍을 뚫은 스폰지 마개로 막는다.

13-1-4-1-4. 시험전 처리 : 환기구멍이 있는 밀폐통에 벌을 취하여 CO₂로 벌들을 마취시킨 후 한 케이지당 10마리씩 넣어 25±2℃의 암조건에 두어 회복시킨 다음 시험에 사용한다.

13-1-4-1-5. 시험용액 조제 : 원제의 경우는 아세톤, dimethylformamide, dimethylsulfoxide 등에 녹여 사용하고 제품은 탈이온수로 제조한 0.05% Triton N101용액 또는 아세톤 등에 녹여 사용한다. 다른 유기용매 및 계면활성제를 사용할 경우 사전에 독성을 검토해야 한다.

13-1-4-1-6. 시험농도 설정 및 규모

13-1-4-1-6-1. 예비시험 : 시험농도는 약제의 특성을 감안하여 적절한 농도수준(예:100, 10, 1, 0.1μg a.i./bee)을 설정하고 농도별 20마리씩 반복없이 처리한다. 만일 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상될 경우에는 100μg a.i./bee 농

도에서 10마리씩 3반복으로 시험을 실시하여 치사 개체가 10% 미만인 경우 그 이상의 시험농도수준 설정은 생략한다. 이때에도 용매대조군과 양성대조군을 포함하여야 한다.

13-1-4-1-6-2. 본시험 : 시험농도는 5개수준 이상으로 하며 농도수준당 10마리씩 3반복 이상으로 시험한다.

13-1-4-1-7. 대조군 설정 : 약제조제시 사용된 용매 또는 계면활성제를 음성대조군으로 하고 dimethoate 또는 phenthoate를 양성대조군으로 하여 시험한다. 음성대조군에서 20% 이상 치사될 경우에는 재시험을 실시하여야 한다.
<개정 2018.4.26.>

13-1-4-1-8. 약제처리 : 케이지 안에 10마리씩 수용된 벌들을 비이커에 넣고 마취시킨후 여과지 위에 올려놓고 미량주사기를 사용하여 조제된 시험용액 1 μ l를 흉부에 처리한다.

13-1-4-1-9. 급식 : 약제를 처리한 벌을 다시 케이지에 옮기고 급식관을 넣어준다. 급식관에는 50% 자당용액 2ml을 넣어주고 시험일 48시간 이상 계속되면 48시간 후에 새로운 관으로 교체한다.

13-1-4-1-10. 시험조건 : 약제처리후 온도 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50~70%에서 관찰하며 관찰시간을 제외하고는 조명은 하지 않는다.

13-1-4-1-11. 관찰기간 : 처리후 4, 24, 48시간에 관찰하되, 24시간에서의 치사율과 48시간의 치사율의 차이가 음성대조군에서는 10%이하로 유지되는데 반하여 약제처리군에서 10%를 초과할 경우에는 관찰기간을 최고 96시간까지 연장한다.

13-1-4-1-12. 관찰사항 : 꿀벌의 치사 및 행동이상 등을 관찰 기록한다.

13-1-4-1-13. 반수치사약량(LD₅₀) 산출 : 시험물질 처리후 24시간 및 48시간 LD₅₀치와 95% 신뢰한계를 산출하여야 한다.

13-1-4-2. 꿀벌섭식독성

13-1-4-2-1. 시험물질 : 원제 또는 제품

13-1-4-2-2. 시험생물 : 꿀벌(*Apis mellifera* L.)을 사용하여야 하며 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌 중 어린개체에는 제외하고 사용한다.

13-1-4-2-3. 시험용 용기 : 시험용 케이지는 스텐레스 철망을 이용하여 길이 15cm, 직경 5cm 크기의 원통형으로 만든 다음 입구를 유리급식관(직경 1cm, 길이 5cm 정도)을 끼울수 있도록 구멍을 뚫은 스폰지 마개로 막는다.

13-1-4-2-4. 시험전 처리 : 환기구멍이 있는 밀폐통에 벌을 취하여 2시간동안

절식시킨후 CO₂로 벌들을 마취시킨 후 한 케이지당 10마리씩 넣어 25±2℃의 암 조건에 두어 회복시킨 다음 시험에 사용한다.

13-1-4-2-5. 시험용액 조제 : 물에 잘 녹는 약제의 경우는 탈이온수에 녹이고, 물에 잘 녹지 않는 약제의 경우는 꿀벌에 독성이 낮은 유기용매나 계면활성제 등에 녹여 사용한다. 적절한 용매에 녹인 약제를 50% 자당용액에 균일하게 섞는다. 이때 용매는 최종 부피의 1%를 넘어서는 안된다.

13-1-4-2-6. 시험농도 설정 및 규모

13-1-4-2-6-1. 예비시험 : 시험농도는 약제의 특성을 감안하여 적절한 농도수준(예:100, 10, 1, 0.1 μ g a.i./bee)을 설정하고 농도별 20마리씩 반복없이 처리한다. 만일 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상될 경우에는 100 μ g a.i./bee 농도에서 10마리씩 3반복으로 시험을 실시하여 치사개체가 10%미만인 경우 그 이상의 시험농도수준 설정은 생략한다. 이때에도 용매대조군과 양성대조군을 포함 하여야 한다.

13-1-4-2-6-2. 본시험 : 시험농도는 5개 수준 이상으로 하며 농도수준 당 10마리씩 3반복 이상으로 시험한다.

13-1-4-2-7. 대조군 설정 : 약제조제시 사용된 용매 또는 계면활성제를 음성대조군으로 하고 dimethoate 또는 phenthoate를 양성대조군으로 하여 시험한다. 음성 대조군에서 20%이상 치사될 경우에는 재시험을 실시하여야 한다.
<개정 2018.4.26.>

13-1-4-2-8. 약제처리 : 설탕물에 희석된 약제 100~200 μ l를 유리급식관에 넣어 케이지 입구의 스폰지에 끼워 마취에서 깨어난 벌들이 섭식하도록 한다.

13-1-4-2-9. 급식 : 매시간 케이지를 관찰하여 시험물질이 전부 섭취되었으면(보통 1~4시간안에 소모됨) 시험물질이 처리되었던 급식관을 제거하고 새로운 급식관에 신선한 50% 자당용액 2ml을 채워 급식한다. 만약 꿀벌이 시험물질의 섭취를 회피할 경우 최대 6시간까지 기다린 다음 신선한 자당용액으로 교체한다. 이때에는 꿀벌이 먹은 시험물질의 양을 측정하여야 한다.

13-1-4-2-10. 시험조건 : 약제처리후 온도 25±2℃, 습도 60~80%에서 관찰하며 관찰시간을 제외하고는 조명은 하지 않는다.

13-1-4-2-11. 관찰기간 : 처리후 4, 24, 48시간에 관찰하되, 24시간에서의 치사율과 48시간의 치사율의 차이가 음성대조군에서는 10%이하로 유지되는데 반하여 약제처리군에서 10%를 초과할 경우에는 관찰기간을 최고 96시간까지 연장한다.

13-1-4-2-12. 반수치사약량(LD₅₀) 산출 : 시험물질 처리후 24시간 및 48시간 LD₅₀치와 95% 신뢰한계를 산출하여야 한다. 시험기간이 연장되었을 경우에는 그 기간까지 LD₅₀치와 95% 신뢰한계를 산출하여야 한다.

13-1-5. 미꾸리 야외포장시험 <개정 2025.4.9.>

13-1-5-1. 시험농약 : 제품 농약

13-1-5-2. 시험생물

13-1-5-2-1. 어종 : 미꾸리

13-1-5-2-2. 크기 및 순화 : 전장 5~10cm 정도의 건강하고 균일한 미꾸리를 사용한다. 약제 처리 전 시험포장에 순화조를 설치하고 미꾸리를 넣어 1주일 이상 순화하여야 하며, 시험케이지 안에 미꾸리를 넣어 3일 이상 관찰한 후 이상이 없으면 약제를 처리한다

13-1-5-2-3 생물수 : 시험구 당 100마리 이상을 사용한다

13-1-5-3. 시험구

13-1-5-3-1. 작물이 재배중이어야 하며 구당 면적은 10m²이상으로 한다.

13-1-5-3-2. 시험구 배치는 난피법, 반복수는 3반복 이상을 원칙으로 한다.

13-1-5-3-3. 시험구 수심은 5cm 내외가 유지되도록 한다.

13-1-5-3-4. 시험구내에 설치하는 케이지는 위와 아랫면은 개방되고 옆의 4면은 부드러운 망으로 감싼 4각 스텐레스케이지(최소규격 : 가로35cm 세로35cm 높이30cm, 20마리 이하 수용)를 사용하며, 시험시에는 방조망으로 케이지 윗면을 감싸서 새 등으로부터 미꾸리를 보호한다.

13-1-5-4. 시험방법

13-1-5-4-1. 약제처리 시기 : 시험약제의 사용적기에 1회 사용하는 것을 원칙으로 한다.

13-1-5-4-2. 처리 약량

13-1-5-4-2-1. 시험약제의 처리 약량은 추천 사용량 중 최고 사용량을 기준으로 시험하며 순차적으로 최저 추천사용량까지 시험할 수 있다.

13-1-5-4-2-2. 위해성을 평가하는데 필요할 경우 약제처리후 미꾸리 재투입시험 등 회복성 복원시험을 실시할 수 있다.

13-1-5-4-2-3. 반드시 무처리구를 대조구로 두어 시험한다.

13-1-5-4-3. 재배작물 : 품종, 파종, 재배양식은 일반농가의 경종법에 준한다.

13-1-5-4-4. 조사기간 : 약제 처리 후 7일간으로 하되 약제특성 및 시험목적에

따라 기간을 연장할 수 있다.

13-1-5-4-5. 처리방법 : 시험약제의 추천살포 방법에 준하여 살포한다.

13-1-5-5. 조사 내용

13-1-5-5-1. 수질분석 : 수온은 매 시간대별로 조사하고 각 시험구마다 자를 미리 설치하여 수심을 매일 기록한다. DO(용존산소량), pH는 농약처리직전 및 7일간 매 24시간 간격으로 조사 기록한다.

13-1-5-5-2. 토양분석 : 시험포장 토양의 토성, pH, 유기물함량 등을 조사한다.

13-1-5-5-3. 농약잔류량 분석 : 농약처리 직후(4시간 이내) 및 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 일차 토양과 물을 시험구내 케이스밖에서 취하여 농약잔류량을 분석한다

13-1-5-5-4. 체중 및 전장 측정 : 시험 시작 전 최소 20마리의 개체를 무작위로 선발하여 체중 및 전장을 측정한다.

13-1-5-5-5. 치사수 및 중독증상 : 시험직후(4시간이내) 및 매 24시간 간격으로 육안 관찰하여 치사된 개체는 관찰 즉시 시험케이지 내에서 꺼내 폐기한다. 7 일차는 미꾸리를 모두 포획하여 생사수를 확인한다.

13-1-5-5-6. 기상자료 : 시험기간중 시험지역의 일일 기상자료를 입수하여 첨부한다.

13-1-5-6. 시험의 유효성 판정

13-1-5-6-1. 무처리구에서 시험생물의 치사율은 10%이하여야 한다.

13-1-5-6-2. 시험기간 중 강우 등 환경변화로 인한 수심변동은 $5\pm 3\text{cm}$ 이내로 한다.

13-1-5-7. 보고서 작성

13-1-5-7-1. 시험생물 전장 및 체장

13-1-5-7-2. 논물 및 토양중 농약농도

13-1-5-7-3. 미꾸리치사율과 농약잔류 농도 그래프

13-1-5-8. 첨부자료

13-1-5-8-1. 수질 및 토양특성

13-1-5-8-2. 기상조건

13-1-5-8-3. 농약잔류량 분석법

13-1-5-9. 특기사항 : 위의 시험기준과 방법에 규정되지 않은 세부사항은 등록 검토기관과의 협의를 거쳐 조정할 수 있다.

13-1-6. 어류 생육초기독성시험

- 13-1-6-1. 시험농약 : 원제
- 13-1-6-2. 시험생물 : 송사리(*Oryzias latipes*)
- 13-1-6-3. 시험방법
 - 13-1-6-3-1. 노출방법 : 유수식 또는 반지수식
 - 13-1-6-3-2. 시험농도
 - 13-1-6-3-2-1. 최고농도 : 급성적 치사가 일어나지 않는 농도
 - 13-1-6-3-2-2. 최저농도 : 급성독성치(LC₅₀)의 1/100이하 농도
 - 13-1-6-3-3. 수정란 : 수정란은 배반(blastodisc)의 분열이 시작되기전의 것으로 한 농도당 60개(20개/3반복)씩 처리한다.
 - 13-1-6-3-4. 대조구 : 무처리구와 용매대조구를 반드시 둔다
 - 13-1-6-3-5. 먹이 : 부화직후에는 Tetramin(또는 계란 노른자)을 공급하고 약 1주일이 경과한 다음에는 artemia를 매일 2회 급이한다.
 - 13-1-6-3-6. 온도 : 수온은 수정란은 24±1℃, 자어 및 치어는 23±2℃를 일정하게 유지한다
 - 13-1-6-3-7. 광조건 : 12~16시간
 - 13-1-6-3-8. 시험기간 : 수정란에서 시작하여 수정란이 모두 부화된 후 30일이 경과할 때까지 계속한다.
- 13-1-6-4. 관찰사항 : 매일 죽은 알을 제거하고 부화된 개체수, 비정상어수, 치사어를 조사하여 기록하고 비정상어는 보존액에 보존하고, 시험종료시 시험농도별 생존한 개체의 체중과 전장을 측정한후 보존용액에 보존한다.
- 13-1-6-5. 시험물질의 분석 : 시험기간 동안 각 처리별 시험농도를 확인하기 위해 주 1회 농도분석을 한다
- 13-1-6-6. 시험유효성 인정 : 대조구에서의 부화후 생존율이 80%이상되어야 한다.
- 13-1-6-7. 통계처리 : 분산분석(ANOVA)으로 유의성 검증 후 최저영향농도(LOEC)와 최대무영향농도(NOEC), 그리고 최대허용농도(MATC)를 결정한다.
- 13-1-6-8. 보고서 작성
 - 13-1-6-8-1. 부화일 및 부화수
 - 13-1-6-8-2. 부화후 생존율
 - 13-1-6-8-3. 이상유무 및 이상어수
 - 13-1-6-8-4. 치사수
 - 13-1-6-8-5. 최저영향농도(Lowest observed effect concentration, LOEC)

- 13-1-6-8-6. 무영향농도(No observed effect concentration, NOEC)
- 13-1-6-8-7. 최대허용농도(Maximum acceptable toxicant concentration, MATC)
- 13-1-6-9. 첨부자료
- 13-1-6-9-1. 시험기간동안의 pH, DO, 온도
- 13-1-6-9-2. 시험종료후 시험농도별 생존 송사리의 전장 및 체중
- 13-1-6-9-3. 수질분석 자료(알카리도, 경도 등)

13-1-7. 지렁이 번식독성시험

- 13-1-7-1. 시험물질 : 제품 또는 원재
- 13-1-7-2. 시험생물
 - 13-1-7-2-1. 시험종 : Eisenia fetida, Eisenia andrei 또는 국내종을 사용한다.
 - 13-1-7-2-2. 시험종 크기 : 2개월~1년이내의 성숙하여 환대가 보이는 것으로 250~600mg정도의 건강하고 균일한 개체를 사용하여야 한다.
 - 13-1-7-2-3. 순화 및 급이 : 시험종 도입시 시험조건과 동일한 환경하에서 최소한 1주일이상 순화시켜야 한다. 사육기간동안 매주 10마리당 5g의 건조한 우분가루(소똥가루)를 표면에 뿌려준다.
- 13-1-7-3. 시험용 용기 : 1ℓ의 유리제품 용기를 사용하되 원통형의 경우 직경과 높이의 비율이 비슷한 것이 바람직하다.
- 13-1-7-4. 인공토양의 조제
 - 13-1-7-4-1. 인공토양의 조성 : 인공토양은 sphagnum peat : kaolin clay : 산업용 모래를 1 : 2 : 7의 비율(건조중)로 조제하여 사용한다. 각 조성별 구비조건은 아래와 같다.
 - 13-1-7-4-1-1. sphagnum peat : pH 5.5~6.0, 식물이 남아있지 않는 것으로 분말상이고 건조된 것
 - 13-1-7-4-1-2. kaolin clay : kaolinite 함량이 30%이상
 - 13-1-7-4-1-3. 산업용 모래 : 입경 50~200 micron인 것이 50%이상
 - 13-1-7-4-2. 인공토양 조제방법 : 4-1의 성분들을 정확히 측량한 후 pH를 6.0±0.5로 되도록 CaCO₃를 일정량(인공토양량의 0.5%이하)을 가하여 소형믹서기 등을 사용하여 잘 혼합한다.
- 13-1-7-5. 시험조건
 - 13-1-7-5-1. 온도는 20±2℃로 맞추며, 16시간은 형광등으로 400~800 Lux로 조도가 조절되게 하고 8시간은 어둡게 한다.

13-1-7-5-2. 먹이는 지렁이 10 마리당 5g의 건조시켜 2mm 체로 친 우분가루를 인공토양 위에 뿌려주는데, 약제처리 후 1일 후와 그후 1주당 1회씩 먹이를 준다.

13-1-7-6. 시험농도 설정 및 시험규모

13-1-7-6-1. 농도수준 : 농도의 범위는 농약 원제시험은 $LC_{50} \sim LC_{50}$ 의 1/100이 포함하게 처리한다. 농약제품의 경우는 최고사용량과 사용횟수에 따라 농도를 정한다.(예를 들어 년 3회 사용할 때는 농도의 범위는 최고사용량과 최고사용량의 3배량을 포함하여야 한다.)

13-1-7-6-2. 시험규모 : 처리구와 대조구는 최소 4반복이상을 시험하여야 한다.

13-1-7-6-3. 농도수준간의 간격 : 1.8이하의 공비(公比)를 둔다.

13-1-7-7. 대조군 설정

13-1-7-7-1. Carbendazim 또는 benomyl을 양성대조군으로 시험한다

13-1-7-7-2. 시험의 적합성

13-1-7-7-2-1. 무처리구는 각 반복구(10마리를 넣은 구)마다 적어도 30마리 이상의 새끼가 생산되어야 한다

13-1-7-7-2-2. 무처리구 번식율의 C.V.(coefficient variation)는 30%이하여야 한다.

13-1-7-7-2-3. 무처리구의 4주후 지렁이치사율은 10%이하이어야 한다.

13-1-7-8. 시험용액 조제

13-1-7-8-1. 수용성물질인 경우(제품 중 수화제, 유제 등 물에 잘 섞일 경우) : 인공토양(500g 건물질중 이상)에 수분함량에 맞는 분량의 증류수(인공토양 500g 인 경우에 증류수 200ml)에 시험물질을 녹여 인공토양에 분고 잘 혼합한다.

13-1-7-8-2. 시험물질을 아세톤에 녹인 경우 : 시험물질을 적당량의 아세톤에 녹인 다음 미리 떼어 둔 모래 10 g을 50 ml용 비이커에 넣고 고르게 편 다음 그 위에 시험물질을 녹인 용매를 고르게 뿌리고 2시간동안 증발시킨 다음 고르게 섞어서 인공토양과 다시 섞는다. 그 다음 증류수를 부어서 수분함량을 맞춘다.

13-1-7-8-3. 시험물질이 난용성인 경우(제품 중 입제) : 시험물질을 적당량의 모래(인공토양 0.5 kg당 모래 5g)와 섞고 막자나 유발에 갈아서 잘 섞는다. 이렇게 처리된 혼합물을 나머지 인공토양에 합치고 혼합기로서 고르게 섞는다. 그 다음 증류수를 부어서 수분함량을 맞춘다

13-1-7-9. 지렁이 투입 : 시험물질을 처리한 인공토양이 담긴 시험용기를 덮지

얇은 상태에서 1시간 방치하여 인공토양에 남아있던 용매가 휘산되게 한 후 지렁이를 투입한다. 그 다음 플라스틱 필름으로 덮고 고무줄로 묶은 다음 적당하게 공기구멍을 내어 통기가 잘 되도록 한다.

13-1-7-10. 관찰기간 및 관찰사항

13-1-7-10-1. 약제 처리후 매일 지렁이 치사와 먹이섭성을 관찰한다.

13-1-7-10-1-1. 약제처리후 28일째 치사수, 체중 및 이상유무를 관찰하며 지렁이는 꺼낸다.

13-1-7-10-1-2. 약제처리후 58일째 인공토양중에 cocoon에서 깨어난 어린 지렁이수와 생체중 및 이상유무를 관찰한다.

13-1-7-11. pH, 수분함량 측정 : 시험개시전과 종료후에 시험토양의 pH, 수분함량을 측정한다.

13-1-7-12. 조사내용

13-1-7-12-1. 처리후 28일에는 원제의 경우 LC₅₀ 및 무영향농도를 산출하고 제품의 경우 치사율과 무영향농도를 구한다

13-1-7-12-2. 시험종료 후 원제의 경우 번식영향농도와 무영향농도를 산출하고, 제품의 경우 번식률과 이상유무를 조사한다.

13-1-7-13. 특기사항 : 위의 시험기준과 방법에 규정되지 않은 세부사항은 등록검토기관과의 협의를 거쳐 조정할 수 있다.

13-1-8. 어류생활사 독성시험 <개정 2010.2.9.>

13-1-8-1. 시험농약 : 원제

13-1-8-2. 시험생물 : 송사리(*Oryzias latipes*), 대륙송사리(*Oryzias sinensis*)

13-1-8-3. 시험방법

13-1-8-3-1. 노출방법 : 유수식 또는 반지수식

13-1-8-3-2. 시험농도

13-1-8-3-2-1. 최고농도 : 급성적 치사가 일어나지 않는 최고 농도(96시간 급성 독성시험 결과 LC₀ 값)

13-1-8-3-2-2. 최저농도 : 급성독성값(96시간 급성독성시험 결과 LC₅₀ 값)의 1/100 이하 농도

13-1-8-3-3. 처리수준 및 반복수 : 처리수준은 5수준 이상을 하여야 하며 처리수준당 3반복 이상을 한다.

13-1-8-3-4. 대조구 : 무처리구와 용매대조구를 반드시 둔다.

- 13-1-8-3-5. 먹이 : 부화시킨 새우(Brine shrimp) 또는 인공사료(플레이크)를 공급한다.
- 13-1-8-3-6. 온도 : 24±1℃
- 13-1-8-3-7. 광조건 : 12-16시간
- 13-1-8-3-8. 시험기간 : 전 생활사(알에서 다음세대 알까지, 성어에서 다음세대 성어까지)
- 13-1-8-3-9. 시험물질 분석 : 시험기간동안 시험물질의 농도가 일정하게 유지되는지 확인하기 위하여 주 1회 분석한다.
- 13-1-8-3-10. 조사내용 : 치사 및 이상 유무를 매 24시간마다 기록하고, 치사개체는 병리조직학적 관찰을 위해 따로 보관한다.
- 13-1-8-3-11. 무게 및 체중 : 시험 종료 후 생존개체에 대한 무게 및 전장을 측정한다.
- 13-1-8-3-12. 통계분석 : 시험결과는 분산분석(ANOVA)으로 유의성을 검증한다.
- 13-1-8-4. 시험 유효성 : 시험의 신뢰성을 위해 무처리구에서의 부화후 생존율이 80% 이상 되어야 한다.
- 13-1-8-5. 보고서 작성
 - 13-1-8-5-1. 산란수, 수정율, 부화일수, 부화수, 부화후 생존율
 - 13-1-8-5-2. 성비, 이상어수, 치사수
 - 13-1-8-5-3. 병리조직학적 이상 유무
 - 13-1-8-5-4. 최저영향 농도(LOEC)
 - 13-1-8-5-5. 무영향농도(NOEC)
- 13-1-8-6. 첨부자료
 - 13-1-8-6-1. 시험기간동안 수질분석자료(pH, DO, 온도, 알칼리도, 경도 등)
 - 13-1-8-6-2. 시험종료후 시험농도별 생존개체의 무게 및 전장

13-1-9. 녹조류생장저해시험 <개정 2010.2.9.>

- 13-1-9-1. 본 시험은 조류의 생장에 대한 시험물질의 영향에 관한 과학적 지식을 얻음으로써 농약사용시에 있어서 안전한 취급방법을 확립하는 것을 목적으로 한다.
- 13-1-9-2. 정의
 - 13-1-9-2-1. 세포농도 : 1mL당 세포수를 말함

- 13-1-9-2-2. 생장 : 시험기간을 통해서 세포농도의 증가를 말함
- 13-1-9-2-3. 생장속도 : 단위시간당 세포농도의 증가를 말함
- 13-1-9-2-4. EC₅₀ (Median Effect Concentration : 반수생장저해농도) : 대조구와 비해 50% 생장저해시키는 시험물질의 농도를 말함
- 13-1-9-2-5. NOEC (No Observed Effect Concentration : 최대무영향농도) : 대조구에 비해 영향이 인정되지 않는 시험물질의 최고농도를 말함
- 13-1-9-2-6. 시험물질 : 시험에 이용되는 농약의 원제 또는 제품을 말함
- 13-1-9-2-7. 대조물질 : 시험조건을 재현성을 확인하기 위해 이용되는 물질을 말함[통상 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇)을 사용]
- 13-1-9-3. 시험생물
- 13-1-9-3-1. 생물종
- 13-1-9-3-1-1. *Selenastrum caprocorntum*을 이용한다. 단, 배양 및 시험에 잘 맞고 생장이 빠른 것이 있다면 아래 종을 이용할 수 있다.
- ① *Selenastrum caprocorntum* (ATCC 22662주)
 - ② *Senedesmus subspicatus* (86.81 SAG주)
 - ③ *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b주)
- 13-1-9-3-1-2. 대조물질로서의 EC₅₀을 확인한다.
- 13-1-9-3-2. 배양방법 : 시험조건과 유사한 배양조건에서 전배양을 하여 대수증가기에 있는 조류를 사용하되, 배양은 무균조건하에서 한다.
- 13-1-9-3-3. 초기세포농도 : 시험배지의 초기세포농도는 약 10⁴ cells/mL 수준으로 한다.
- 13-1-9-4. 노출방법 : 배지에 시험물질을 첨가하여 진탕 또는 정치배양을 한다.
- 13-1-9-5. 시험기간 : 72시간으로 한다. 단, 필요시 96시간까지 연장할 수 있다.
- 13-1-9-6. 시험구 설정
- 13-1-9-6-1. 시험농도구의 설정
- 13-1-9-6-1-1. 등비급수적으로 최소한 5농도구를 둔다.
- 13-1-9-6-1-2. 시험농도 및 농도공비는 예비시험의 결과로 정한다.
- 13-1-9-6-1-3. 농도범위는 시험 조류의 생장을 저해하는 농도와 저해하지 않는 농도를 각각 1수준 이상으로 두고, 조류의 생장을 일부 저해하는 농도를 2수준 이상 되도록 한다.
- 13-1-9-6-2. 대조구의 설정
- 13-1-9-6-2-1. 시험물질을 함유하지 않은 무처리 대조구를 둔다.

- 13-1-9-6-2-2. 시험물질 조제시 유기용매를 사용한 경우는 용매 대조구를 둔다.
- 13-1-9-6-2-3. 시험구의 반복 : 모든 시험구는 3반복으로 시험한다.
- 13-1-9-7. 시험배지의 조제방법 : 시험배지의 조제방법은 아래와 같이 한다. 한편 시험배지는 시험 직전에 조제하는 것이 바람직하다.
- 13-1-9-7-1. 원제를 시험물질로서 이용하는 경우
- 13-1-9-7-1-1. 물에 잘 녹는 원제는 멸균한 배지에 직접 녹여 시험원액을 조제한다. 시험배지는 시험원액을 멸균한 배지로 희석시킨 후 조류현탁액을 가해 조제한다.
- 13-1-9-7-1-2. 물에 잘 녹지 않는 원제의 경우는 유기용매 등을 사용하여 조제한다. 유기용매는 시험생물에 대한 유해성이 인정되지 않으면서 시험물질의 성질을 변화시키지 않는 것으로 시험용액중 100mg/L를 초과하지 않도록 한다.
- 13-1-9-7-2. 제품을 시험물질로 이용하는 경우 : 멸균배지에 직접 가하여 시험원액을 조제한다. 시험배지는 시험원액은 멸균한 배지로 희석시킨 후 조류현탁액을 가해 조제한다.
- 13-1-9-8. 환경조건
- 13-1-9-8-1. 배양방법 : 무균조건에서 배양을 하되 통기를 촉진하기 위해 시험용기를 진탕 또는 교반하는 것이 바람직하다. 정치배양이 이루어지는 경우에는 적어도 하루에 2회 진탕한다.
- 13-1-9-8-2. 배양온도 : 설정온도는 21~25℃로 하고 시험기간중의 변동범위는 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이내로 한다.
- 13-1-9-8-3. 조명 : 400~700nm의 광에서 연속적으로 균일 조사하고, 8000 lux 정도의 조도가 적당하다.
- 13-1-9-8-4. 배지
- 13-1-9-8-4-1. 배지의 종류 : OECD 배지 (OECD Test Guideline 201 Alga, Growth Inhibition Test(1984) 또는 AAP(AGP) 배지 (U.S. EPA: Alga Assay Procedure: Bottle Test, National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon(1971))중에 선택한다.
- 13-1-9-8-4-2. 배지의 양 : 세포농도의 측정법 및 시험물질농도의 측정법에 따라 다르나 100mL 정도가 적당하다.
- 13-1-9-9. 측정
- 13-1-9-9-1. 세포농도의 측정 : 각 시험용기 중의 세포농도는 시험시작 후 24시

간 간격으로 측정한다.

13-1-9-9-2. 시험물질농도의 측정

13-1-9-9-2-1. 시험물질이 원제인 경우 시험 시작과 종료시 농도를 측정한다.

13-1-9-9-2-2. 시험물질농도구마다 각 용기로부터 시험액을 등량 채취하여 혼합 후 측정용 시료로 한다.

13-1-9-9-3. 환경조건의 측정

13-1-9-9-3-1. 각 시험구(시험농도구, 대조구)의 1 용기에 대해서 시험배지의 온도 및 pH를 측정한다.

13-1-9-9-3-2. 측정은 시험시작과 종료시를 포함한다.

13-1-9-10. 결과정리

13-1-9-10-1. 농도-저해율의 산출법 : 시험농도구와 대조구의 세포농도는 측정 시간과 시험물질(원제인 경우는 실측치)의 농도를 모두 표시한다. 각각의 시험농도구와 대조구의 세포수의 평균치를 시간에 대해 plotting하고 성장곡선을 긋는다. 면적법 및 속도법을 이용하여 각 농도에서의 성장 저해율을 계산한다.

13-1-9-10-2. EC₅₀의 산정 : 각 농도에 있어서 성장저해율의 결과로부터 일반적으로 이용하는 기법을 적용하여 EC₅₀을 산정한다.

13-1-9-11. 회복시험의 실시 : 필요한 경우 성장저해가 인정되는 농도의 배양액을 희석 배양하여 조류의 세포농도가 어느 정도 회복되는지를 명확히 밝히기 위한 회복시험을 실시한다.

13-1-9-12. 보고서 작성

13-1-9-12-1. 시험물질

13-1-9-12-2. 시험생물 : 종명, 주명, 입수처, 대조물질의 EC₅₀

13-1-9-12-3. 시험방법 : 노출조건, 환경조건, 관찰 및 측정항목 등

13-1-9-12-4. 시험결과

13-1-9-12-4-1. EC₅₀ 및 95%신뢰한계

13-1-9-12-4-2. EC₅₀ 산정방법

13-1-9-12-4-3. NOEC (NOEC치가 구해지지 않았을 경우는 그 이유를 기재)

13-1-9-12-4-4. 각 관찰시간에 대한 각 시험구의 세포농도 및 그 평균치

13-1-9-12-4-5. 세포의 계수방법

13-1-9-12-4-6. 성장곡선

13-1-9-12-4-7. 농도-성장저해율의 관계를 표시하는 그래프

13-1-9-12-4-8. 관찰된 영향

13-1-9-12-4-9. 시험물질농도의 측정치 (원제)

13-1-9-12-4-10. 환경조건의 측정결과 : 수질, pH 등

13-1-9-12-4-11. 기타 사항 : 시험액의 상태, 시험결과에 영향을 미칠 가능성이 있는 사항 등

13-1-9-13. 시험의 타당성 : 대조구의 72시간후 세포농도는 시험 시작시 보다 16배 이상 증가되어야 한다.

13-1-10. 꿀벌엽상잔류독성시험 <개정 2010.2.9.>

13-1-10-1. 시험물질 : 제품

13-1-10-2. 시험생물 : 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 1~7일령 어린 일벌(*Apis mellifera* L.)을 사용한다.

13-1-10-3. 시험용 용기 : 케이지는 스테인리스 철망을 이용하여 직경 15cm, 높이가 5cm의 원통형으로 만들고, 덮개는 스펀지나 아크릴판으로 제작하되 중앙에 직경 1cm, 길이 5cm 정도의 유리 급식관을 끼울 수 있어야 한다.

13-1-10-4. 시험전 처리

13-1-10-4-1. 작물재배 : 알팔파를 파종하여 재배하되, 시험약제당 최소한 9m² 이상의 면적을 확보하여야 하며, 약제 살포 후 강우에 의한 영향을 피하기 위해 비가림 재배가 바람직하다.

13-1-10-4-2. 시험물질 살포: 분무형 시험물질은 방제를 위해 사용되는 표준농도로 물에 희석하되, 희석배수의 차이가 있는 경우에는 가장 높은 농도가 되도록 희석하여 수동식 분무기로 알팔파에 균일하게 묻도록 1회 살포하며, 직접살포형 시험물질은 실제사용방법과 동일하게 살포한다. <개정 2012.2.7.>

13-1-10-5. 시험규모 : 케이지당 꿀벌수는 25마리씩, 6반복 이상으로 하며, 대조군도 동일한 반복을 둔다.

13-1-10-6. 대조군 설정 : 약제를 처리하지 않은 알팔파에 꿀벌을 노출시킨 것을 대조군으로 하고, 대조군에서 20% 이상이 치사될 경우에는 다시 시험을 하여야 한다.

13-1-10-7. 처리방법: 약제 살포 4시간 후에 알팔파를 채취하여 알팔파 잎을 채취하여 잘게 잘라 케이지 당 15g씩 골고루 넣은 다음, CO₂ 또는 N₂ 가스로 마취시킨 꿀벌을 케이지에 넣는다. 그 다음 부터는 24시간 간격으로 전단의 처리방법을 반복하여 수행한다. <개정 2012.2.7.>

- 13-1-10-8. 먹이공급 : 증류수에 녹인 50% 설탕액(w/w)을 급식관에 넣어 공급한다.
- 13-1-10-9. 시험조건 : 온도 25~35℃, 상대습도 50~80%가 유지되는 실내에서 암조건을 유지하며, 관찰시간이외는 조명을 하지 않는다.
- 13-1-10-10. 관찰기간: 분무형 시험물질은 꿀벌을 노출시킨 후 4, 24시간에 관찰하되, 24시간 관찰에서 꿀벌이 25%이상 치사되거나 무기력, 보행장애, 과다행동 등을 보일 경우, 매 24시간 간격으로 잎을 채취하여 관찰하여 25%미만으로 치사, 무기력, 보행장애, 과다행동 등을 보일 때 시험을 종료한다. 입제나 분제 등 직접살포형 시험물질은 작물흡수를 고려하여 최소 7일 이상 관찰하며 이기간 중 꿀벌이 이상증상을 보일 경우 25% 이하의 이상증상을 확인할 시점까지 매 24시간 간격으로 처리를 반복하고 25% 미만의 이상증상이 확인될 경우 시험을 종료한다. <개정 2012.2.7.>
- 13-1-10-11. 관찰사항 : 지정된 시간에 꿀벌의 치사, 이상행동 증상(보행장애, 무기력, 과다행동) 등을 관찰하여 기록하되, 치사된 개체는 시험 종료까지 방치한다.

13-1-11. 조류 경구독성 시험

- 13-1-11-1. 시험물질 : 원제
- 13-1-11-2. 시험동물
- 13-1-11-2-1. 시험종 : 물오리(*Anas platyrhynchos*)와 메추라기(*Colinus vinginanus*) 중 1종 이상을 사용한다.
- 13-1-11-2-2. 연령 : 같은 시기에 부화된 16주 이상 된 동일 계통의 종으로서 크기와 체중이 일정해야 하며, 임신과 출산의 경험이 없어야 한다.
- 13-1-11-2-3. 개체선택 : 독성물질에 대한 유전적 저항성을 갖고 있지 않은 건강한 개체로서 비정상적이거나 아스페르길루스증(*Aspergillosis*), 뉴캐슬병(*Newcastle disease*), 병아리 이질(*Pullorum disease*) 등의 병이 없어야 하며, 번식기에 있는 개체는 제외한다.
- 13-1-11-2-4. 시험동물 수 : 각 시험약량 수준 당 10마리 이상 시험한다.
- 13-1-11-2-5. 순화기간 : 시험조건과 같은 조건에서 2주 이상 순화시켜야 한다. 이 기간 중 5% 이상의 치사를 보이는 집단은 시험에서 제외한다.
- 13-1-11-2-6. 사육조건 : 케이지는 과밀사육으로 인한 스트레스를 받지 않을 만큼 충분히 넓어야 한다.

13-1-11-3. 대조군 설정 : 무처리구 이외에 시험물질 조제 시 용매를 사용한 경우는 용매대조군을 추가적으로 설정한다. 대조군에서 시험기간 중 10% 이상의 치사개체가 발생해서는 안 된다.

13-1-11-4. 시험약량 수준설정 및 시험물질 조제

13-1-11-4-1. 시험약량 수준

13-1-11-4-1-1. 기초시험 : 2,000mg/kg(체중)의 수준으로 투여하여 시험한 결과, 치사개체가 없으면 그 이상의 시험을 생략한다.

13-1-11-4-1-2. 본시험 : 기초시험에서 치사개체가 나타나는 경우에는 독성예측시험(range-finding test)을 거쳐 본시험을 실시한다. 시험약량 수준은 용량-반응곡선 및 LD₅₀을 구할 수 있도록 5농도 이상을 시험하며, 이때 각 처리구의 공비는 2 이하로 한다.

13-1-11-4-2. 시험물질 조제 : 시험물질은 증류수에 녹여 사용한다. 가수분해의 가능성이 있는 물질 또는 증류수에 녹지 않는 물질은 옥수수기름, propylene glycol, 1% carboxymethyl cellulose, gum acacia 등에 녹이거나 캡슐에 넣어 투여한다.

13-1-11-4-3. 투여량 : 용매를 포함한 시험물질의 투여량은 체중의 0.1~1.0%를 초과하지 않아야 한다.

13-1-11-5. 시험방법

13-1-11-5-1. 먹이공급 :최소한 시험시작 15시간 전에 먹이공급을 중단한다. 시험물질 투여 후 먹이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하고 시험구별 1일 평균 먹이소모량을 기록한다.

13-1-11-5-2. 시험물질 투여 : 1회 경구 투여한다.

13-1-11-5-3. 시험기간 : 시험물질 투여 후 최소한 14일 동안 관찰하며, 마지막 3일 동안에 치사되거나 독성반응을 보이는 개체가 출현할 때에는 21일까지 연장하여 관찰한다.

13-1-11-6. 관찰항목

13-1-11-6-1. 구토증상 : 시험물질 투여 후 2시간까지 자세히 관찰하며, 투여당일 3회 이상, 그 후에는 시험 종료 시까지 매일 1회 이상 관찰하여 기록한다.

13-1-11-6-2. 임상관찰 : 독성의 징후, 행동이상, 치사 등을 관찰하여 기록한다.

13-1-11-6-3. 먹이섭식량 : 주 1회 이상 조사한다.

13-1-11-6-4. 체중측정 : 시험 시작 시에 투여량 결정을 위해 측정해야 하며, 그 후에는 시험 종료까지 주 1회 이상 측정한다.

13-1-11-6-5. 부검소견 : 각 처리구에서 죽은 개체가 있는 경우 2~3마리까지 실시한

다.

13-1-11-6-6. 반수치사약량(LD₅₀) 산출 : 시험 종료 후 반수치사약량(LD₅₀) 및 95% 신뢰한계를 산출한다.

13-1-12. 조류 섭식 독성시험

13-1-12-1. 시험물질 : 원제

13-1-12-2. 시험동물

13-1-12-2-1. 시험종 : 물오리(*Anas platyrhynchos*), 메추라기(*Colinus vinginanus*), 비둘기(*Columba livia*), 일본 메추라기(*Coturnix coturnix japonica*), 꿩(*Phasianus colchicus*), 자고새(*Alectoris rufa*)중 1종 이상을 사용한다.

13-1-12-2-2. 연령 : 부화 후 10~17일령의 어린개체를 사용하여야 하며 개체간 령의 차이는 1일 이내이어야 한다.

13-1-12-2-3. 개체선택 : 독성물질에 대한 유전적 저항성을 갖고 있지 않은 건강한 개체로서 비정상적이거나 아스페르길루스증(*Aspergillosis*), 뉴캐슬병(Newcastle disease), 병아리이질(*Pullorum disease*) 등의 병이 없는 개체군으로부터 부화한 것을 확인하여야 한다.

13-1-12-2-4. 시험동물 수 : 각 시험약량 수준 당 10마리 이상 시험한다.

13-1-12-2-5. 순화기간 : 시험조건과 같은 조건에서 1주 이상 순화시켜야 하며, 시험 72시간 전에 각 개체의 건강상태를 조사하여야 한다. 건강상태가 불량하거나 불확실한 원인에 의한 개체군의 사망률이 5% 이상인 경우 그 개체군은 시험에 사용할 수 없다.

13-1-12-2-6. 사육조건 : 시험종과 환경 조건은 [표1]과 같으며, 환기가 잘 되는 곳에서 케이지당 5~10마리를 수용한다(비둘기의 경우 한 마리씩 수용). 시험기간 동안 소음이나 진동과 같은 시험에 영향을 줄 수 있는 요인으로부터 격리되어야 한다. 1일 조명시간을 12~16시간으로 한다.

13-1-12-3. 대조군 설정 : 무처리구 이외에 시험물질 조제 시 용매를 사용한 경우는 용매대조군을 추가적으로 설정한다. 대조군에서 시험기간 중 10% 이상의 치사개체가 발생해서는 안 된다.

13-1-12-4. 시험약량 수준설정 및 시험물질 조제

13-1-12-4-1. 시험약량 수준

13-1-12-4-1-1. 기초시험 : 5,000ppm 수준으로 시험물질이 처리된 먹이를 공급하여 시험한 결과, 치사나 독성반응을 보이는 개체가 없으면 그 이상의 시험을 생략한다.

13-1-12-4-1-2. 본시험 : 기초시험에서 치사개체가 나타나는 경우에는 독성예측시험 (range-finding test)을 거쳐 본시험을 실시한다. 시험약량 수준은 농도-반응곡선 및 LC₅₀을 구할 수 있도록 5농도 이상을 시험하여야 하며, 이때의 각 농도 간 공비는 2.0 이하로 하고, 최저 처리농도에서 시험물질에 의한 사망 또는 다른 독성 영향이 발생하지 않아야 한다.

13-1-12-4-2. 시험물질 조제 : 먹이에 첨가된 시험물질은 먹이 전체에 균일하게 분포하여야 한다. 필요한 경우 먹이 내에 균일한 분산을 위하여 시험동물에 독성이 낮고 시험물질의 독성에 영향을 미치지 않는 증류수나 옥수수기름 등의 용매를 사용할 수 있다. 용매의 최대량은 먹이무게의 2%를 초과하지 않도록 하여야 한다.

13-1-12-5. 시험방법

13-1-12-5-1. 먹이 공급 : 시험시작 후 5일간 시험물질이 첨가된 먹이를 공급하고, 그 후에는 시험물질이 함유되지 않은 먹이를 공급한다.

13-1-12-5-2. 시험기간 : 시험물질 투여 후 8일 동안 관찰(시험물질 노출기간 5일, 관찰기간 3일)하며, 7~8일째에 치사개체가 발생하거나 8일째에 독성반응을 보이는 개체가 출현할 때에는 사망이나 회복이 명확하게 확인될 때까지 또는 21일까지 연장하여 관찰한다.

13-1-12-6. 관찰항목

13-1-12-6-1. 중독증상과 기타 이상행동 : 경련이나 비정상적인 운동성 그리고 다른 새와의 이상한 상호작용을 시험 개시일에 2회, 그 이후는 매일 1회 관찰한다.

13-1-12-6-2. 사망률 : 시험개시일에 2회, 그 후는 매일 1회 관찰한다.

13-1-12-6-3. 체중 측정 : 각 케이지마다 생존개체의 평균체중을 시험개시일, 5일, 8일, 시험이 연장된 경우 종료일을 추가하여 측정하고, 사망한 모든 개체의 체중을 기록한다.

13-1-12-6-4. 먹이섭식량 : 노출기간과 그 후의 회복기간에 먹이소모량을 체중으로 나누는 방법으로 측정하며, 0~5일, 5~8일, 8~종료일(연장한 경우)에 측정한다.

13-1-12-6-5. 반수치사약량LC₅₀ 산출 : 시험 종료 후 반수치사농도(LC₅₀) 및 95% 신뢰한계를 산출한다.

[표1] 조류섭식독성시험의 시험종과 환경조건

시 험 종	환경조건				
	온도(℃)	습도(%)	연령(일)	새장 면적 (cm ² /새)	
물오리 <i>Anas platyrhynchos</i>	연령 0- 7일	32-35	60-85	10-17	600
	8-14일	28-32			
	>14일	22-28			
북미산 메추라기 <i>Colinus virginianus</i>	연령 0- 7일	35-38	50-75	10-17	300
	8-14일	30-32			
	>14일	25-28			
비둘기 <i>Columba livia</i>	>35일	18-22	50-75	56-70	2500*
일본 메추라기 <i>Coturnix Coturnix japonica</i>	0- 7일	35-38	50-75	10-17	300
	8-14일	30-32			
	>14일	25-28			
꿩 <i>Phasianus colchicus</i>	0- 7일	32-35	50-75	10-17	600
	8-14일	28-32			
	>14일	22-28			
자고 <i>Alectoris rufa</i>	0- 7일	35-38	50-75	10-17	450
	8-14일	30-32			
	>14일	25-28			

* 비둘기는 케이지 당 한 마리 수용한다.

13-1-13. 물벼룩 번식독성 시험 <12·02·07 신설>

13-1-13-1. 시험물질: 품목 또는 원제

13-1-13-2. 물벼룩종: 국제표준종인 *Daphnia magna*를 사용하되, 국내 서식 종 (*Moina macrocopa*, *Daphnia spp.*, *Simocephalus spp.* 등)을 사용할 수 있다.

13-1-13-3. 시험 물벼룩 조건: 시험 물벼룩은 독성시험 수행기관에서 생산·유지·사육중인 물벼룩을 사용해야 한다. 출산후 24시간 이내의 것으로 실험실 조건에서 최소한 3번 이상의 새끼를 출산한 건강한 어미에서 나온 건강하고 균일한 어린개체를 사용해야 한다. 동일시험에 사용되는 시험 물벼룩은 동일한 사육군으로부터 생산된 것으로 한다. 시험 물벼룩의 출처를 확인할 수 있도록 모계 사육군의 초기 stock의 출처와 사육방법에 관한 내용을 기록하고 유지하여야 한다.

13-1-13-3-1. 아래의 물벼룩을 시험에 사용하여서는 아니된다.

13-1-13-3-1-1. 휴면란(ephippia)이 발생한 사육군

13-1-13-3-1-2. 생후 12일 전까지 출산을 하지 못한 사육군

13-1-13-3-1-3. 시험 전 2일안에 20% 이상 치사가 발생 사육군

- 13-1-13-3-1-4. 시험 전 7일 동안 어미당 3마리 이상의 새끼를 출산하지 못한 사육군
- 13-1-13-3-1-5. 이전 시험(처리군, 무처리군)에 사용된 물벼룩이 포함된 사육군
- 13-1-13-3-2. 시험에 사용할 물벼룩을 생산하는 사육군은 시험에 앞서 48시간 이상 시험환경과 동일한 온도와 사육수 조건에서 유지하는 순화과정을 거쳐야 한다. 순화과정에서는 시험에 사용될 동일한 종류의 먹이를 투여하여야 한다.
- 13-1-13-4. 먹이공급: 먹이는 *Selenastrum*, *Chlorella* 등과 같은 대수기의 녹조류를 배양하여 공급한다. M4 또는 M7 이외의 배양액을 사용하는 경우, 조류 외에 효모(Yeast) 등의 보조 먹이를 공급할 수 있다.
- 13-1-13-5. 시험환경
- 13-1-13-5-1. 시험용액의 pH, 용존산소, 수온, 경도 등을 주기적으로 측정하며 최소한 1주일에 1회 이상(시험시작전, 7일, 14일, 21일) 실시한다. 다만, 반지수식 시험으로 수행할 경우 시험수 교체에 맞추어 측정하여야 한다.
- 13-1-13-5-2. 시험기간 동안 시험용액의 온도는 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, 조명은 명:암=16:8시간을, 광도는 $15\sim 20\text{uE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 범위내로 유지하도록 한다.
- 13-1-13-5-3. 시험 도중에는 폭기하지 않는다. 먹이는 매일 공급하는 것을 원칙으로 하되, 일주일에 최소한 3회 이상 공급한다.
- 13-1-13-5-4. 먹이는 대수기의 녹조류(*Selenastrum* 또는 *Chlorella*)를 충분히 공급한다.
- 13-1-13-5-5. 시험물질을 흡착할 가능성이 있으므로 물벼룩의 먹이를 지나치게 과량으로 공급하지 않아야 한다.
- 13-1-13-5-6. 또한 사육과 순화과정에서도 시험환경과 동일한 광조건과 배경색의 사육시설에서 유지되어야 한다.
- 13-1-13-6. 시험용수: 번식능 시험에 사용하는 희석수는 배양액과 동일한 것을 사용하며, 물벼룩 배양액은 M4 또는 M7 배양액을 사용한다. 한편 배양액의 총 유기탄소(TOC) 값은 2mg/L를 넘지 않게 하며, 배양액 또는 희석수의 pH는 6.0~9.0, 경도는 80mg/L(CaCO_3 로서) 이상, 용존산소는 60~105% 포화농도를 유지하도록 하며, 사용 전에 24시간 이상 폭기시킨다.
- 13-1-13-6-1. 배양액(시험용액) 조성 내용

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 증류수*)	농축도(배)	M4 또는 M7 배양액을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량(mg/L, 멸균증류수)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
1) 농축액 I	-	20	50	50
2) CaCl ₂ ·2H ₂ O	293,800	1,000	1.0	1.0
3) MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,600	2,000	0.5	0.5
4) KCl	58,000	10,000	0.1	0.1
5) NaHCO ₃	64,800	1,000	1.0	1.0
6) Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50,000	5,000	0.2	0.2
7) NaNO ₃	2,740	10,000	0.1	0.1
8) KH ₂ PO ₄	1,430	10,000	0.1	0.1
9) K ₂ HPO ₄	1,840	10,000	0.1	0.1
10) Vitamin 농축액	-	10,000	0.1	0.1
Thiamine hydrochloride	750	10,000	3가지 vitamin을 하나의 멸균증류수에 용해 시켜 "Vitamin 농축액"을 제조한다.	
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10,000		
Biotin	7.5	10,000		

13-1-13-7. 시험시설: 물벼룩 번식독성시험을 수행하기 위해서는 아래의 시설조건을 유지해야 한다

13-1-13-7-1. 사육, 순화, 시험기간 동안 일정수온을 유지할 수 있는 장치

13-1-13-7-2. 명:암 조건 16:8 시간을 자동 조절 유지할 수 있는 장치

13-1-13-7-3. 시험과정에 실험생물에 영향을 주는 VOC(휘발성물질), 부유물질 등을 배출할 수 있는 장치

13-1-13-7-4. 유수식시험의 경우 시험용액이 넘치는 것을 방지할 수 있는 장치, 일정한 시험농도를 유지할 수 있는 시험액 전달장치, 시험생물을 적절히 유지할 수 있는 장치

13-1-13-7-5. 유수식시험 장치는 매 시험 전에 각각의 시험수조의 유량(flow rates)과 농도에 대한 calibration을 수행하여야 한다. 24시간 동안 시험수조의 5배에 해당하는 시험용액이 사용될 수 있도록 유량을 유지하여야 한다. 시험기간 동안 개별 처리농도별 시험수조의 유량오차가 10%를 넘어서는 안 된다.

13-1-13-8. 시험방법

13-1-13-8-1. 시험물질에 물벼룩을 21일 동안 노출하여 물벼룩의 유영저해과 번식능에 영향을 나타내는 반수영향농도를 산출하며, 아울러 유영저해과 번식능에 영향을 나타내지 않는 무영향관찰농도(NOEC)를 구한다.

13-1-13-8-2. 시험물질은 배양액에 용해 또는 분산시켜 사용한다.

13-1-13-8-3. 시험물질이 비수용성이거나 수용해도가 낮은 경우는 농축액(stock solution) 제조 시 유기용매 또는 분산제를 사용할 수 있다. 유기용매의 경우

acetone, ethanol, methanol, triethylene glycol, dimethylformamide, DMSO 등을 사용할 수 있으며, 분산제의 경우는 cremophor RH40, methylcellulose 0.01% 또는 HCO-40 등을 사용할 수 있다. 용매나 분산제는 가능한 한 시험용액의 0.01%(v/v)를 넘지 않도록 한다.

13-1-13-8-4. 총 시험기간은 21일로 하며, 시험물질의 노출은 유수식 또는 반지수식으로 한다. 반지수식으로 할 경우 시험기간 동안 시험물질의 농도는 초기농도의 80% 이상을 유지해야 하고, 최소한 매 3일마다 완전히 새 시험용액으로 교환해야 한다.

13-1-13-8-5. 유수식 시험의 경우는 대조군 또는 처리군당 20~40마리를 사용하며, 4개의 반복구를 둔다. 반지수식 시험의 경우, 대조군 또는 처리군 당 10마리의 물벼룩을 사용하는데 시험용액이 담긴 각 수조 당 1개체씩 투여한다 (대조군 및 시험물질 농도 당 10개의 반복구).

13-1-13-8-6. 수조 내 시험용액의 양은 일반적으로 한 마리당 30~100ml 범위를 두도록 하며, 시험용액의 화학적 분석 등을 고려하여 용액의 양을 보다 증가시킬 수 있다.

13-1-13-8-7. 시험농도의 범위는 물벼룩 급성독성시험 결과 등 사전 독성정보를 참조하여 설정한다. 농도는 최소한 5개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 설정하며, 이때 공비가 2를 초과하지 않도록 한다.

13-1-13-8-8. 시험용액 조제 시 용매 또는 분산제를 사용한 경우, 대조군 외에 용매 또는 분산제 대조군을 추가로 두도록 한다. 이때 첨가되는 용매 또는 분산제의 양은 시험군 중 최고 농도군에 첨가되는 용매 또는 분산제의 양과 동일하게 처리한다.

13-1-13-8-9. 무영향관찰농도(NOEC)를 도출하기 위해서는 최저농도에서의 유영저해도와 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮지 않도록 최저농도를 설정하며, 반면 최고농도는 유영저해도와 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮은 수준으로 관찰될 수 있는 농도가 되도록 설정한다.

13-1-13-8-10. 유영저해도 및 번식능에 대한 영향농도(EC_x) 값을 산출하기 위해서 최고농도는 예측되는 영향농도 보다 충분히 높도록 설정한다.

13-1-13-8-11. 시험용액의 교환 시에는 새로 교환할 시험용액을 미리 준비한 후 끝 모서리가 둥근 유리피펫(직경 5mm 이상)을 사용하여 갈아주려는 새로운 시험용액이 담긴 수조로 시험 물벼룩을 조심스럽게 재빨리 옮겨준다. 이때 피펫을 통해 물벼룩과 함께 옮겨지는 시험용액의 양은 최소화한다.

13-1-13-8-12. 관찰은 매일 실시하는데 모체로부터 태어난 자손 개체수를 반드시 측정하고, 그 후 시험용액으로부터 제거한다. 측정되는 자손 개체수는 살아있는 것을 기준으로 하며, 부화되지 않은 알 또는 죽은 개체의 숫자도 별도로 기록해 둔다.

13-1-13-8-13. 생산된 자손 수, 사망한 모체 물벼룩의 수, 모체와 자손의 유영저해 개체수, 이상행동, 외형이상 등은 매일 관찰 조사하며, 시험이 끝난 후 생존한 모체의 체장 또는 체중(건물중)도 빠짐없이 기록하여야 한다. 가급적이면 체장 체중 모두를 조사하는 것이 좋다. 필요한 경우 기타 항목들을 측정할 수 있으며, 관찰된 데이터로 부터 무영향관찰농도와 영향농도를 산출하여야 한다.

13-1-13-8-14. 시험액 농도 분석: 시험물질의 농도는 최소한 1주일에 1회 이상(시험시작전, 7일, 14일, 21일) 실시한다. 다만 유수식 시험으로 수행할 경우 시험수 교체에 맞추어 측정하여야 한다. 실험과정에서 시험용액의 농도는 처리농도의 $\pm 20\%$ 초과해서는 안된다.

13-1-13-8-15. 시험의 유효성 판단: 시험기간 동안 시험용액 내 시험물질의 농도는 초기농도의 80% 이상을 항상 유지해야 한다. 대조군에서 물벼룩 모체의 사망률, 이상증상(유영저해, 병증, stress 등) 개체비율이 시험종료시까지 20%를 초과하지 않아야 한다. 대조군에서 시험종료 시까지 물벼룩 각 모체에서 생산되는 자손의 평균 개체수는 60마리 이상을 유지하여야 한다. 대조군에서 시험종료 시까지 물벼룩 각 모체가 휴면란(ephippia)을 생산해서는 안된다.

13-1-13-9. 시험 보고서 작성: 물벼룩번식독성시험에서 생산된 독성예측치와 독성학적 증빙 자료를 포함하여야 한다.

13-1-13-9-1. 시험명, 신청회사, 시험기관, 시험관리자, 시험책임자, 시험일자

13-1-13-9-2. 시험물질 세부사항: 입수원, lot number, 시험물질의 성분(이름, 주요 성분 함량, 유효성분 농도, 주요 불순물 등), 물리 화학적 특성, 용제·부제 등 첨가제의 농도

13-1-13-9-3. 시험수의 조성, 화학적 특성(전도도, 경도, pH 등)

13-1-13-9-4. 시험 물벼룩 정보: 모계 사육군(학명, 나이, 구입처, 처리, 급이기록, 순화과정, 사육방법), 시험에 사용된 새끼 물벼룩의 출생일 및 나이

13-1-13-9-5. 시험수조의 정보: 시험수조의 시험용액량, 시험시작 방법(순화, 시험물질 투여), 시험수조의 물벼룩수, 반복수, 광조건, 유수식 및 지수식 시험

의 구체적 실험과정 및 내용(유량, 급이방법 등)

13-1-13-9-6. 시험에서 규정된 시간의 시험농도 분석자료

13-1-13-9-7. 시험수조에서 이상증상 발생개체의 비율 및 시기

13-1-13-9-8. 어미와 새끼의 유영저해 개체, 매일의 출산 새끼수, 첫출산일, 어미당 출산수, 생존 어미의 체장 또는 체중(건조중)

13-1-13-9-9. 수질 및 시험물질 농도의 분석결과 및 분석방법

13-1-13-9-10. 사육, 순화 기록

13-1-13-9-11. 시험법에서 제시한 방법에서 이탈된 모든 사항(온도편차, 희석농도 조절 실패 등)

13-1-14. 누에 급성독성시험 <신설 2012. 2. 7.>

13-1-14-1. 시험물질: 품목 또는 원제

13-1-14-2. 농가보급 누에품종(*Bombyx mori*)을 국립농업과학원 등 관련기관에서 분양하여 시험용 누에로 사용하여야 한다. <개정 2022. 3. 8.>

13-1-14-3. 시험용 용기: 사육용 용기는 적당한 크기의 플라스틱 재질 바구니를 사용한다.

13-1-14-4. 시험조건: 온도는 22~25℃ 범위내에서 사육한다. 사육실내 조명과 습도는 별도로 조정하지 않는다. 누에먹이는 뽕잎을 기본으로 하되 인공사료(1~3령까지)도 사용할 수 있다.

13-1-14-5. 시험농도 설정 및 시험규모: 품목의 경우 표준살포 농도를 기준으로 10배씩 순차적으로 희석하여 표준살포농도의 10^{-4} 까지 처리한다. 처리구와 대조구는 3반복 이상으로 시험하여야 하며, 1반복당 50마리로 시험한다.

13-1-14-6. 대조군 설정과 주의사항: 약제를 처리하지 않은 오염되지 않은 먹이로 사육한 무처리구를 대조군으로 설정하여 시험하며, 무처리구에서 감잠율이 5% 이상일 경우 재시험을 실시한다. 제외잠(누에 및 번데기기간 중 곤음병, 쉬파리, 벌, 개미, 쥐, 귀뚜라미, 기타 인위적인 피해를 받은 누에)은 감잠율 계산에 포함하지 않는다.

13-1-14-7. 시험용액 조제

13-1-14-7-1. 품목: 증류수를 사용하여 표준살포농도로 시험용액을 조제한 다음 순차적으로 희석하여 시험용액을 만든다. (뽕잎을 20매씩 가지런히 정돈한 다음 뽕잎 자루쪽에 구멍을 뚫어 끈으로 연결한 뽕잎들을 시험용액에 침지한 다음 그늘에서 적당히 말린다. 뽕잎이 너무 마르면 누에가 잘 먹지 않으므로

주의한다.)

13-1-14-7-2. 원제: 시험물질을 품목으로 만들 경우를 가정하여 표준 최고살포 농도를 설정한 다음 표준 최고살포농도를 10배씩 순차적으로 증류수를 사용하여 희석하여 시험용액을 만들어 시험한다. 용매(계면활성제 등)를 일부 사용한 경우 용매의 영향을 시험하여야 한다.

13-1-14-8. 시험물질이 처리된 뽕잎은 4령기에만 1일 3회씩 먹이로 주도록 하고, 다른 령기에는 오염되지 않은 먹이를 1일 3회 주도록 한다.

13-1-14-9. 관찰기간 및 관찰사항: 약제 처리후 매일 누에의 치사와 먹이섭성, 발육경과 및 상족(고치짓기) 상황을 관찰한다. 4령기와 5령기에는 치사와 각 령의 일수, 외관상 유충발육상태, 상족 일시를 관찰하여 기록한다. 상족 후에는 정상고치와 비정상고치의 숫자를 기록한다. 상족후 10일 이내에 고치를 수확하고 고치를 칼로 잘라 번데기와 분리한다. 탈피각은 버리고 번데기(치사한 것, 정상인 것)와 견충(고치에서 탈피각과 번데기를 뺀것)의 숫자와 무게를 측정하고 기록한다. 본 시험방법에서 규정하지 않은 사항은 등록 및 시험기관과 사전에 설계협의 등을 통하여 시험방법을 조정하여 시험할 수 있다.

13-1-14-10. 기타 규정되지 않은 누에사육에 관한 사항은 농촌진흥청의 육잠시험 사육 요령에 준한다.

13-1-15. 조류 번식독성 시험 <신설 2019.3.21.>

13-1-15-1. 시험물질: 원제

13-1-15-2. 시험생물

13-1-15-2-1. 시험종: 청둥오리(Mallard duck; *Anas platyrhynchos*), 북미산 메추라기(Bobwhite quail; *Colinus virginianus*), 일본산 메추라기(Japanese quail; *Coturnix coturnix japonica*) 중 1종 이상을 사용하고, 시험 종별 연령은 아래와 같다.

표 1. 시험 종별 연령 및 사육공간

조류 종	시험개시기의 연령	시험기간 동안 연령 범위	한쌍당 새장의 최소 바닥면적
청둥오리	9-12 개월	± 2 주	1 m ²
북미산 메추라기	20-24 주	± 1 주	0.25 m ²
일본산 메추라기	*	± 0.5 주	0.15 m ²

* 시험에 사용하기 전, 종의 변이성을 줄이기 위해, 일본산 메추라기는 증명된 번식가능 조류(breeder)를 사용하도록 한다.

13-1-15-2-2. 시험종선택: 시험 종은 사육하기 쉽고, 공급이 용이해야 한다. 상기 종과 다른 종을 사용하는 경우에는 사용에 대한 타당한 이유를 제시하도록 한다. 시험조류는 질병이나 부상이 없어야 하고, 혈통을 명확히 알고 있는 동일 모집단에서 얻어진 것을 사용한다. 시험용 청둥오리 및 북미산 메추라기는 같은 종의 야생 조류와 생김새가 유사해야 한다.

13-1-15-2-3. 시험동물 수: 암·수 한 쌍으로 시험하거나, 수컷 1 마리당 암컷 2 마리(메추라기의 경우) 또는 3 마리(청둥오리의 경우)로 시험할 수 있으며, 타당한 사유를 제시하면 다른 성비의 배치도 가능하다.

13-1-15-2-3-1. 쌍으로 하는 시험에서는 대조군 및 처리군당 최소한 12개의 조류용 케이지를 사용하도록 한다. 그룹으로 시험하는 경우에는 대조군 및 처리군당 최소한 8 개(청둥오리) 및 12개(메추라기)의 조류용 케이지를 각각 사용한다.

13-1-15-3. 순화기간: 시험조건과 같은 조건에서 최소 2주 이상 순화해야 하고, 순화기간동안 3% 이상 사망하거나 건강상태 관찰 시 건강이 쇠약해진 집단은 시험에서 제외한다.

13-1-15-4. 시험환경조건

13-1-15-4-1. 성체조류는 $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 및 상대습도가 50%에서 75%인 통풍이 좋은 시설에서 사육한다.

13-1-15-4-2. 시험 시작 후 8주 동안 동일한 조명조건(예, 매일 7-8 시간의 조명)으로 유지하고, 이때 암조건을 중단하지 않는다. 시험 시작 8주 이후, 산란에 적합한 환경 조건을 만들어주기 위해 매일 16-18 시간 광주기로 유지한다.

13-1-15-4-3. 각 시험종별 사육조건은 아래와 같다.

표 2. 알 및 어린 조류의 사육 조건

	온도 (°C)	상대습도 (%)	방향전환 여부
청둥오리			
저장	14-16	60-85	선택
배양	37.5	60-75	예
부화	37.5	75-85	아니오
새끼(1 주)	32-35	60-85	-
새끼(2 주)	28-32	60-85	-
북미산 메추라기			
저장	15-16	55-75	선택
배양	37.5	50-65	예
부화	37.5	70-75	아니오
새끼(1 주)	35-38	50-75	-
새끼(2 주)	30-32	50-75	-
일본산 메추라기			
저장	15-16	55-75	선택
배양	37.5	50-70	예
부화	37.5	70-75	아니오
새끼(1 주)	35-38	50-75	-
새끼(2 주)	30-32	50-75	-

단, 중력식 인큐베이터 및 부화장에서 사육할 경우, 온도 1.5-2°C 높고, 상대습도는 약 10% 증가되어야 함

13-1-15-4-4. 순화기간 및 시험기간동안의 환경조건은 동일하게 유지되어야 하고, 화학물질 또는 약물 치료는 가능한 피하되, 사용했을 경우에는 기록되어야 한다.

13-1-15-4-5. 조류의 행동변화에 영향을 줄 수 있는 방해요인은 제거해야 하며, 사육 케이지의 온도는 바닥에서 2.5-4 cm 높은 곳에서 측정한다.

13-1-15-5. 대조군 설정: 무처리구 이외에 시험물질 조제 시 용매를 사용한 경우에는 용매대조군을 추가적으로 설정한다.

13-1-15-6. 시험군 및 시험약량 설정: 3 개 이상 농도로 시험한다. 시험군의 농도는 최고농도 섭식독성의 독성값을 기본으로 사용한다. 섭식독성시험에서의 LC10의 1/2에 가깝게 선정하고, 최대농도는 1000 mg/L 이하가 되도록 한다. 또한 농도 간격은 최고농도에서 등급비로 낮게 설정한다. (예: 1/6, 1/36)

13-1-15-7. 시험물질조제: 먹이에 첨가된 시험물질은 먹이 전체에 균일하게 분포하여야 하고, 균일한 혼합을 위해 물, 옥수수기름 등 조류에 독성이 낮은 용매를 사용할 수 있으나, 용매의 최대량은 먹이 무게의 2%를 초과하지 않도록 하여야 한다. 단, 새끼조류의 사료에는 시험물질과 용매를 첨가하지 않은 사료를 공급한다.

13-1-15-8. 시험방법

- 13-1-15-8-1. 시험기간: 순화기간이 끝난 후, 최소 20주 동안 시험물질이 함유된 식이를 섭식하게 한다. 10주 동안 산란된 알을 수거하여 인공배양 시킨 후, 부화 된 새끼를 14일 동안 사육한다.
- 13-1-15-8-2. 시험시작 8주 이후 알을 낳기 적합한 환경을 유지시켜준다. 보통 산란환경조건이 시작된 지 2-4주 후 산란이 시작되면, 최소 8-10주 동안 시험을 지속한다. 실외 환경에서 시험 할 경우, 시험종과 동일한 야생종이 부화 하는 시기와 동일한 기간에 맞춰 시험을 시작하며, 산란 전 최소 10주 동안 시험물질을 함유한 사료를 공급한다.
- 13-1-15-8-3. 사료에 함유된 시험물질 농도가 시험시작부터 첫째 주에 설정농도의 80 % 이하로 떨어지지 않도록 한다. 사료에 함유된 시험물질의 안정성을 설명할 수 없을 경우에는, 시험 첫째 주 동안, 최초 사료와 시험물질을 혼합한 직후와 4 시간 이내에 사료를 분석한다. 이때 사료에 함유된 시험물질 농도가 설정농도의 80 % 이내인 경우, 더 이상의 분석은 실시하지 않고, 설정농도가 유지될 수 있도록 시험용 사료를 자주 교체하도록 한다.
- 13-1-15-8-4. 사료에 함유된 시험물질 농도가 설정농도의 80 % 이하인 경우, 초기 농도를 증가시키거나, 시험용 사료를 자주 바꾸면서 실제 농도가 유지되도록 한다. 이때 시험시작 둘째 주에는 목표치인 80 %에 도달했는지를 알아보기 위해 추가분석을 실시한다.
- 13-1-15-8-5. 케이지 내의 사료는 시험물질의 안정도와 관계없이 최소한 1주일 에 1회 교환하는 것이 바람직하다. 사료를 매일 매일 바꿔 주어야 할 정도로 시험물질이 불안정하다면, 본 시험에는 적합한 물질이 아닌 것으로 판단한다.
- 13-1-15-8-6. 알을 낳기 시작하면, 표기하여 매일매일 수거한다. 매주 또는 2주에 한 번씩 배양 및 분화를 위해 분리한다. 배양 전 알에 금이 간 여부를 확인하고, 깨진 알은 배양하지 않는다. 배양 6-11일 후에는 촛불 등을 사용하여 알을 비춰 보아 생존능을 확인한다.
- 13-1-15-8-7. 케이지 당 최소 2 개의 알을 지정하여 껍질 두께를 측정한다. 금이 간 알은 측정하지는 않지만, 그 수는 기록한다. 알을 꺼내 세척하고 건조시킨 후, 알을 세워 넓은 부위(황단)에 일정한 3-4개의 점을 표시하여 껍질 두께를 측정한다.
- 13-1-15-8-8. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산 메추라기 알은 각각 시험 23일, 21일, 16일째에 배양조건에서 부화조건으로 이동시킨다. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 알의 부화는 각각 25-27일째, 23-24일째, 17-18일

째에 종료된다.

13-1-15-8-9. 부화한 새끼는 각각 케이지에 넣거나, 혹은 표시한 후 동일한 케이지에 함께 넣는다. 새끼는 14일 동안 시험물질이 함유되지 않은 사료를 공급하도록 한다. 조명은 낮을 기준으로, 새벽 및 해질 무렵에 15-30분 동안 전환기를 갖는 것이 좋다. 타당한 사유가 있는 경우, 다른 조명 방식도 사용할 수 있다.

13-1-15-9. 관찰항목

13-1-15-9-1. 사망 및 중독 증상을 매일 관찰한다.

13-1-15-9-2. 체중측정: 성체조류, 새끼조류의 체중

13-1-15-9-3. 사료섭취량: 성체조류(1-2주 간격), 새끼조류(부화 후 1-2주)

13-1-15-9-4. 조직병리학적 관찰: 모든 성체 조류

13-1-15-9-5. 조직 잔류량 분석: log POW 3.0 이상 일 경우

13-1-15-10. 시험 유효성

13-1-15-10-1. 시험 종료 시 대조군의 사망률은 10%를 초과하지 않아야 한다.

13-1-15-10-2. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군의 케이지에서 14일간 생존한 조류의 평균수는 최소한 각각 14마리, 12마리, 24마리이어야 한다.

13-1-15-10-3. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군 알 껍질의 평균 두께는 최소한 각각 0.34, 0.19, 0.19 mm이어야 한다.

13-1-15-10-4. 권장한 농도범위에서 최대농도에서 번식에 대해 어떤 영향도 발견되지 않은 경우, 무영향관찰농도(NOEC)는 최대농도 이상으로 보고할 수 있다.

13-1-15-10-5. 시험기간 동안, 사료에 함유된 시험물질의 농도가 최소 80% 이상 유지되어야 한다.

13-1-15-11. 시험결과 및 결과보고서 작성

13-1-15-11-1. 결과의 처리: 시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

13-1-15-11-2. 결과보고서

13-1-15-11-2-1. 시험결과보고서에는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

13-1-15-11-2-1-1. 기본사항: 시험기관의 명칭 및 소재지, 시험책임자, 시험담당자 정보

13-1-15-11-2-1-2. 시험물질 정보: 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명),

시험물질 입수정보, 순도 등

13-1-15-11-2-1-3. 시험동물: 종의 학명, 조류의 계통, 시험시작의 조류 연령, 시험 조류 공급처, 기타 시험동물에 관한 사항

13-1-15-11-2-1-4. 시험조건

13-1-15-11-2-1-4-1. 사육조건: 시험기간 동안 케이지의 형태, 크기, 재질, 온도 및 상대습도, 광주기, 통풍 등

13-1-15-11-2-1-4-2. 사료정보: 기본섭식 사료 공급처, 성분 및 성분분석 자료 (단백질, 탄수화물, 지방, 칼슘, 인 등), 사용된 모든 첨가물 및 용매에 대한 설명

13-1-15-11-2-1-4-3. 시험용 사료: 조제방법, 사용된 설정농도 및 농도 수, 시험 물질과 사료의 혼합방법, 사료 분석방법, 사료 공급횟수 및 조제 주기, 용매 (사용된 경우), 사료 저장조건 등

13-1-15-11-2-1-4-4. 순화방법, 케이지에서의 시험 조류의 성비 및 배치방법

13-1-15-11-2-1-4-5. 케이지 당 조류 수, 처리군 및 대조군당 반복군 수

13-1-15-11-2-1-4-6. 알 및 조류에 대한 확인 방법

13-1-15-11-2-1-4-7. 온도, 습도 및 방향전환 빈도를 포함한 알 저장, 배양 및 부화 조건

13-1-15-11-2-1-4-8. 대조물질 정보, 조제 방법 등(사용하였을 경우)

13-1-15-11-2-1-5. 시험결과

13-1-15-11-2-1-5-1. 독성증상, 영향을 받은 개체 수, 발생빈도, 독성이 나타난 기간

13-1-15-11-2-1-5-2. 성체 및 새끼 조류의 사료소비량 및 체중

13-1-15-11-2-1-5-3. 조직병리학적 증상에 대한 설명

13-1-15-11-2-1-5-4. 조직 잔류량 분석결과(수행한 경우)

13-1-15-11-2-1-5-5. 산란율, 생존율, 부화율(정상적인 부화 포함), 생존한 새끼 조류, 알 껍질 두께(시험기간 동안 매주 각 농도 및 케이지 별 결과를 표로 작성)

13-1-15-11-2-1-5-6. 통계 분석방법 및 결과 해석

13-1-15-11-2-1-5-7. 무영향관찰농도(NOEC) 및 통계적으로 유효한 모든 영향 수준

13-1-15-11-2-1-5-8. 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 모든 사항

13-1-15-11-2-1-6. 고찰

13-1-16. 꿀벌 반야외시험

13-1-16-1. 시험물질: 제품

13-1-16-2. 시험생물 및 작물

13-1-16-2-1. 시험생물: 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 봉군을 사용한다.

13-1-16-2-2. 시험작물: 유채(*Brassica napus*), 파셀리아(*Phacelia tanacetifolia*), 야생겨자(*Sinapis arvensis*) 등

13-1-16-3. 시험조건

13-1-16-3-1. 환경조건: 낮시간 동안 기온이 15℃이하가 되거나 30℃이상 되는 조건을 피한다. 시험물질 살포일에는 비가 오지 않아야 하며 꿀벌 활동이 활발하고 바람이 초속 2m/s을 초과하지 않아야 한다.

13-1-16-3-2. 시험용 터널: 터널 면적은 60㎡이상, 높이는 2.5m 이상, 터널 망사 너비는 3mm이하가 되게한다. 비행활동측정을 위한 1㎡의 구획 3지점을 지정한다.

13-1-16-4. 시험전 준비

13-1-16-4-1. 작물재배: 터널안에 시험작물을 파종하여 꽃이 만개할 때 까지 재배한다.

13-1-16-4-2. 봉군준비: 봉군의 벌 개체수는 최소 6000마리 이상, 3-4장의 육아소비(brood comb)를 포함하여야 한다. 먹이판 1장, 봉판 1장, 산란판 3장의 비율로 맞춘다. 또한, 봉군은 변이와 유전적 다양성을 최소화하기 위해 같은 자매 여왕벌(sister queen)에서 생산된 봉군, 질병이 없는 건강한 봉군을 사용해야 하며, 순화 4주 전부터 약제처리를 하지 않아야 한다.

13-1-16-4-3. 터널 내부에 죽은 벌 개체수 측정을 위해 터널 중앙과 양 끝에 흰 천(흰 부직포 등)을 덮어 준비한다.

13-1-16-5. 시험방법

13-1-16-5-1. 순화: 시험물질 처리 최소 3일전에 벌통을 터널안에 입식하여 꿀벌이 터널 환경에 적응할 수 있도록 한다. 각 봉군마다 관찰 대상 알 구역을 지정하고 BFD(brood area fixing day) 0을 정한다. 벌통 앞에 사충수집통(dead bee trap)을 설치하고 터널 안에 급수통을 배치한다.

* BFD(brood area fixing day): 관찰할 알을 200개 이상 지정한 날, 농약살포 2(±1)일전에 관찰할 알을 지정한다.

13-1-16-5-2. 시험기간: 터널안에서 농약살포 후 7일까지, 그 후 터널 밖에서 BFD +28일까지 시험을 진행한다.

13-1-16-5-3. 시험물질처리

13-1-16-5-3-1. 시험물질: 최대 살포량(ml or g/ha)으로 살포하고, 최소 3반복 이상 시험한다.

13-1-16-5-3-2. 대조군: 음성대조군은 물 400L/ha을 사용하고, 양성대조군은 dimethoate(600 g a.i./ha) 또는 diflubenzuron(800 g a.i./ha)을 사용하여 시험한다.

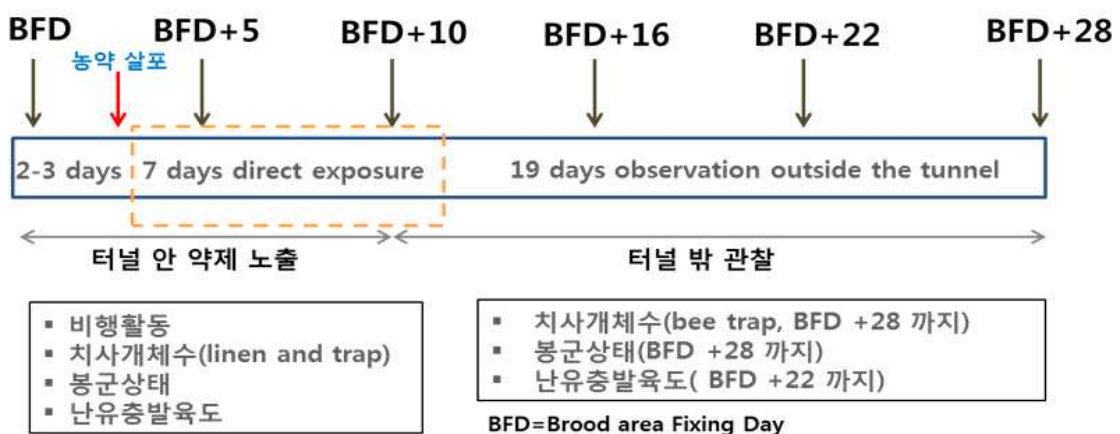
13-1-16-5-3-3. 처리방법: 봉군 당 관찰 대상 알 구역을 지정한(BFD 0) 후 2~3 일 이내에 시험물질을 살포하고, 살포 후 7일까지 터널 안에서 관찰한다. 시험물질 처리 시 급수통을 터널 밖으로 이동하여 오염되지 않게 한다.

13-1-16-5-4. 시험물질 처리 후 7일 이후에는 벌통을 터널 밖으로 이동하여 관찰한다. 이동 장소는 3km 반경 내 과수원 등 밀원 지역을 피하고 농약 등 오염원에 노출되지 않는 장소를 선정하여야 한다.

관찰시기	관찰장소	관찰항목
시험물질 살포일부터 7일까지	터널 안	기상데이터, 비행활동, 치사 개체수(흰천과 사충수집통), 봉군상태, 난유충 발육도.
살포 7일 이후부터 시험종료	터널 밖	기상데이터, 치사개체수(사충 수집통), 봉군상태, 난유충 발육도

13-1-16-5-5. 조사항목

<시험일정 및 관찰항목 모식도>



13-1-16-5-5-1. 기상데이터: 시험기간 동안 온도, 상대습도, 강우량, 풍속의 기상데이터를 매일 기록한다.

13-1-16-5-5-2. 비행활동: 비행활동을 위해 지정된 터널 안 1m²의 구획 3 지점에서 10~15초간 꽃 주위를 맴돌거나 화분활동을 하는 개체 수를 측정한다.

13-1-16-5-5-2-1. 비행활동 측정

시험 일시	치사 개체수 측정
농약살포일 전(최소 2-3일 전)	꿀벌 비행활동 중 하루 한번, 같은 시간
농약살포일(day 0)	<ul style="list-style-type: none"> • 농약살포전 • 살포 후 1시간(2-4번 측정) • 살포 후 2시간 • 살포 후 4시간 • 살포 후 6시간
농약살포일 다음날(day 1)	꿀벌 비행활동 중 하루 세번(아침, 점심, 저녁)
터널 안 농약 노출기간(day 2 to 7)	꿀벌 비행활동 중 하루 한번, 같은 시간

13-1-16-5-5-3. 치사개체 수: 흰 천(벌통앞, 터널중간 및 터널 양 끝부분), 사충 수집통(dead bee trap)에서 죽은 벌 개체수를 매일 아침 확인한다. 일벌, 유충, 번데기, 숫벌로 나누어 기록한다.

13-1-16-5-5-3-1. 치사개체수 측정

시험 일시	치사 개체수 측정
농약살포일 최소 2-3일 전	하루에 한번, 아침에 측정
농약 살포일(day 0)	<ul style="list-style-type: none"> • 농약 살포 전 • 농약 살포 후 2시간 • 벌 활동 시간이 지난 저녁 시간
터널 안 농약 노출기간(day 1 to 7)	하루에 한번, 매일 아침 같은 시간
BFD +28 까지 (터널밖, 사충 수집통 (dead bee trap)에서만 측정)	하루에 한번, 매일 아침 같은 시간

13-1-16-5-5-4. 봉군상태: 봉군세력(꿀벌 개체수), 건강한 여왕벌, 꿀과 화분의 소비면적, 알, 유충, 번데기를 포함한 소비면적을 관찰하고 기록한다. 관찰은 BFD 0일, 농약살포일, BFD +5, +10, +16, +22, +28(± 1 day)에 실시한다.

13-1-16-5-5-5. 난유충발육도: 각 봉군에서 BFD 0일 날 200마리 이상의 알을 지정하고 BFD +5, +10, +16, +22(± 1)일 날 포토박스를 이용하여 소비판 촬영을 하거나 아세테이트지를 이용하여 난유충 발달단계를 아래와 같이 체크하여 숫자로 기록한다. 필요시 BFD 0일 날 알뿐만 아니라 어린 유충(young larvae)과 노숙유충(old larvae)을 같이 지정하여 관찰할 수 있다.

값	내용
0	발달 종료(termination of development)
1	알(egg)
2	어린유충(young larvae) (L1 - L2)
3	노숙유충(old larvae) (L3 - L5)
4	번데기(capped cell)
5	우화 후 빈 셀 또는 알 또는 어린 유충으로 채워진 셀
N	꿀(nectar)
P	화분(pollen)

13-1-16-5-5-6. 난유충발육도 관련 수치계산 : 시험종료 후 각 시험조건 별로 Brood termination-rate(BTR), Brood-index(BI), Compension-index(CI)를 계산한다.

13-1-16-5-5-6-1. Brood termination rate(BTR):

$$\frac{\text{관측일자에 난 유충 발달단계에 도달하지 못한 셀의 수}}{\text{관찰한 셀의 총 수}}$$

13-1-16-5-5-6-2. 난유충 발달지표(BI. Brood-index): 평가 일정에 예상되는 발달 단계에 도달한 셀은 1부터 5점까지 해당 점수를 기록한다. 난 유충 셀이 정상 발달 단계에 도달하지 못했거나 BFD +5일에서 +16일동안 먹이가 셀 (BFD 0일에 알인 경우)에 저장되어 있다면, 다시 셀이 산란에 이용되는 여부와 상관없이, 평가일과 평가일 이후에도 0점 처리한다. 봉군의 BI는 BFD 일자별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구한다.

13-1-16-5-5-6-3. 봉군 회복의 지표(CI. Compension-index): 평가일에 확인된 셀의 성장단계만을 토대로 1부터 5점까지 점수를 부여한다. BI와 달리 셀이 정상 발달단계에 도달하지 못해도 셀 안에 산란이 있으면 점수를 부여한다. 봉군의 CI는 BFD 일자별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구한다.

13-1-16-5-6. 결과정리: 시험물질의 물리화학적 특성, 봉군 준비일자, 봉군건강 상태, 기상데이터, 터널 디자인, 시험디자인, 시험 수행기간, 시험결과(꿀벌 치사개체수, 비행활동, 봉군상태, 난유충발육도), 통계처리에 대한 정보를 기록한다. 필요시 시험물질의 작물 잔류분석 결과를 작성한다.

13-1-17. 꿀벌 유충 급성독성시험

13-1-17-1. 시험물질: 원제

13-1-17-2. 시험생물: 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 유충을 사용하여야 하며 건강한 세 봉군에서 생산된 1일령 유충을 사용한다.

13-1-17-3. 시험용 용기: 시험용기는 48 well plate를 사용한다. 이충용기(grafting cell)를 에탄올(70%) 또는 소독액에 30분 동안 담그고 건조시킨후 48 well plate에 배치한다

13-1-17-4. 시험전 처리: 시험은 여왕벌의 산란 기간 동안 진행하며 시험 시작 4주 전에는 어떠한 약제처리도 하지 않는다. 여왕벌과 일벌들을 빈 벌집 및 번데기장과 함께 격왕판(隔王板)에 가둔다. 격왕판은 벌통내에 유충과 번데기가 들어있는 벌집 가까이에 배치한다. 격왕판을 설치한 1일 후(격리된 후 최

대 30시간) 새로 갓 낳은 알이 있는지 확인하고 여왕벌을 격왕관에서 제거한다. 여왕벌의 번식력에 따라, 알 연령의 변동을 최소화하기 위해 격리 시간을 줄이는 것을 권장하며, 알이 있는 벌집은 알이 부화될때까지 벌통 내에 남겨둔다.

13-1-17-5. 유충 수집 : 알을 확인하고 3일 후에 1일령 유충이 있는 벌집을 신속히 실험실로 옮기며, 주변온도가 20℃ 이하로 내려가지 않게 주의하여야한다. 이후 클린벤치 등 깨끗한 환경에서 이충을 수행한다. 아직 “C”모양이 형성되지 않은 갓 부화한 유충을 무작위로 선택하여 시험용 용기에 이충한다. 약제처리 당일(D4)에 세 봉군에서 각각 최소 12마리의 유충이 필요하므로 이충일(D1)에는 각 봉군에서 12마리 이상의 유충을 이충한다.

13-1-17-6. 유충 사육: 시험기간 동안 유충을 이충한 시험용 용기는 황산칼륨 (K₂SO₄) 포화용액을 이용하여 상대습도 95±5%로 맞춘 밀폐형 데시게이터에 넣고, 데시게이터는 34~35℃를 유지하는 인큐베이터에 배치한다. 유충 먹이는 1일령 유충은 20 µl, 3일령 유충은 20 µl 공급하며, 4일령, 5일령, 6일령 유충은 각각 30 µl, 40 µl, 50 µl씩 공급한다.

13-1-17-6-1. 유충먹이 조성 및 급여량

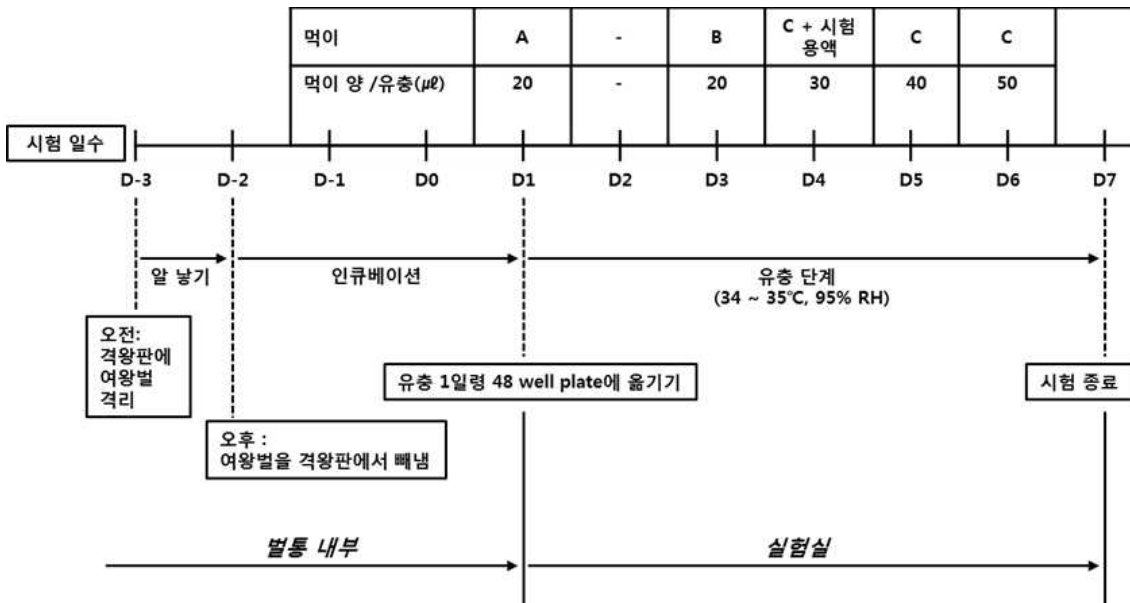
먹이 종류	시험 일수	먹이 양/ 유충(µl)	로열 젤리 (%)	효모추출물 (%)	포도당 (%)	과당 (%)	증류수 (%)
A	D1	20	50	1	6	6	37
B	D3	20	50	1.5	7.5	7.5	33.5
C	D4~D6	30/40/50	50	2	9	9	30

효모추출물(yeast extract), 포도당(dextrose), 과당(D-Fructose)을 증류수에 완전히 녹인 후 로열젤리와 혼합한다. 채집 후 12개월이 지나지 않은 신선한 로열젤리를 사용하며 영하 10℃ 이하로 냉동 보관한다. 각 시험 전에 신선하게 준비된 유충먹이는 시험 기간 동안 5℃ 이하로 냉장보관하며 먹이 공급전에 인큐베이터에 넣어 34~35℃로 따뜻하게 데운다.

13-1-17-7. 시험용액 조제: 시험용액은 4일령의 유충먹이에 혼합하여 사용한다. 원제의 경우 물에 녹지 않을 경우 아세톤 등 용매에 녹여 사용하며, 그 양은 최종 먹이 공급양의 5%를 초과하지 않아야 한다.

13-1-17-8. 시험농도 설정 및 규모

13-1-17-8-1. 시험 일정



13-1-17-8-2. 예비시험: LD₅₀ 범위를 정하기 위해 공비(公比) 5~10으로 예비시험을 진행한다. 만일 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상될 경우에는 100 μg a.i./larva 농도에서 최소 12마리씩 3반복으로 시험을 실시하며, 음성대조군과 통계적인 유의성을 보이면 본시험을 시행한다. 이때에도 용매대조군과 양성대조군을 포함하여야 한다.

13-1-17-8-3. 본시험: 시험농도는 공비가 3을 넘지 않게 5개 수준 이상으로 하며 농도수준당 세 봉군에서 각각 가져온 유충 12마리씩 3반복 이상으로 시험한다.

13-1-17-9. 대조군 설정: 약제조제시 사용된 물 또는 용매를 음성대조군으로 하고 dimethoate 8.8 \pm 0.5 μg /larva를 양성대조군으로 하여 시험한다. 양성대조군 72시간 누적 치사율이 50% 미만이거나 음성대조군 누적치사율이 15%을 초과할 경우에는 재시험을 실시하여야 한다.

13-1-17-10. 약제처리 : 유충 4일령 시험일 날(D4) 유충먹이 C에 약제를 혼합하여 최종 양 30 μl 를 시험용기에 처리한다.

13-1-17-11. 시험조건 : 약제처리 후 암조건, 온도 34~35 $^{\circ}\text{C}$, 습도 95 \pm 5%에서 사육하되 관찰을 위해 사육조건을 이탈한 시간이 일일 15분을 넘지 않도록 한다. 단, 온도는 23 $^{\circ}\text{C}$ 밑으로 내려가거나 40 $^{\circ}\text{C}$ 보다 높아서는 안된다.

13-1-17-12. 관찰기간 : 약제처리 다음날인 유충 5일차부터 7일차까지 매일 1회 관찰하며, 관찰기간 동안 치사한 유충은 시험용기에서 제거한다.

13-1-17-13. 관찰사항: 이상증상, 치사개체수를 기록한다. 시험 7일차(D7)에 남아 있는 유충 먹이를 기록한다.

13-1-17-14. 결과정리: 각 시험일자(D5, D6, D7) 유충 치사율, 시험물질 처리 후 72시간 LD50 값과 95% 신뢰한계를 산출한다. Stock solution의 측정 농도를 기록한다.

13-1-18. 꿀벌유충 만성 독성시험 <신설 2025.1.23.>

13-1-18-1. 시험물질: 원제

13-1-18-2. 시험생물: 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 유충을 사용하여야 하며 건강한 세 개의 봉군에서 생산된 1일령 유충을 사용한다.

13-1-18-3. 시험용 용기: 시험용기는 48 well plate를 사용한다. 이충용기(grafting cell)를 에탄올(70%) 또는 소독액에 30분 동안 담그고 건조시킨후 48 well plate에 배치한다

13-1-18-4. 시험전 처리: 시험은 여왕벌의 산란 기간 동안 진행하며 시험 시작 4주 전에는 어떠한 약제처리도 하지 않는다. 여왕벌과 일벌들을 빈 벌집 및 번데기장과 함께 격왕판에 가둔다. 격왕판은 벌통내에 유충과 번데기가 들어 있는 벌집 가까이 배치한다. 격왕판을 설치한 1일 후(격리된 후 최대 30시간) 새로 갓 낳은 알이 있는지 확인하고 여왕벌을 격왕판에서 제거한다. 여왕벌의 번식력에 따라, 알 연령의 변동을 최소화하기 위해 격리 시간을 줄이는 것이 권장된다. 알이 있는 벌집은 알이 부화될때까지 벌통 내에 남겨둔다.

13-1-18-5. 유충 수집 : 알을 확인하고 3일 후에 1일령 유충이 있는 벌집을 신속히 실험실로 옮기고, 주변온도가 20℃ 이하로 내려가지 않게 주의하여야한다. 이후 클린벤치 등 깨끗한 환경에서 이충을 수행하며, 아직 “C”모양이 형성되지 않은 갓 부화한 유충을 무작위로 선택하여 시험용 용기에 이충한다. 약제처리 당일(D3)에 세 봉군에서 각각 최소 12마리의 유충이 필요하므로, 이충일(D1)에는 각 봉군에서 12마리 이상의 유충을 이충한다. 약제처리 직전(D3)에 유충을 무작위로 배분하며 죽거나 부적합한(너무 작은) 유충을 살아있고 건강한 유충으로 모두 대체하여야 한다.

13-1-18-6. 유충 사육: 이충한 날을 기준으로 시험 1일차(D1)에 유충 시험용기는 황산칼륨(K_2SO_4) 포화용액을 이용하여 상대습도 $95\pm 5\%$ 로 맞춘 밀폐형 데시게이터에 넣고, 데시게이터는 시험 1일차부터 7일차까지 온도 34~35℃를 유지하는 인큐베이터에 배치한다. 시험 8일차부터 유충 시험용기는 염화나트륨(NaCl) 포화용액을 이용하여 상대습도 $80\pm 5\%$ 로 맞춘 밀폐된 데시게이터로 옮기고, 시험 15일차에 시험용기는 통기성이 있는 우화박스로 옮겨 습도 50~80%로 맞추고 온도는 항상 34~35℃을 유지하는 조건에서 시험한다. 우화박

스에는 자당용액을 배치하여 벌들이 자유롭게 먹을 수 있도록 한다. 유충먹이로는 1일령 유충에게 먹이 A 20 μ l, 3일령 유충에게 먹이 B 20 μ l 씩 공급한다. 4일령, 5일령, 6일령 유충은 먹이 C를 각각 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l씩 공급한다.

13-1-18-6-1. 유충먹이 조성 및 급여량

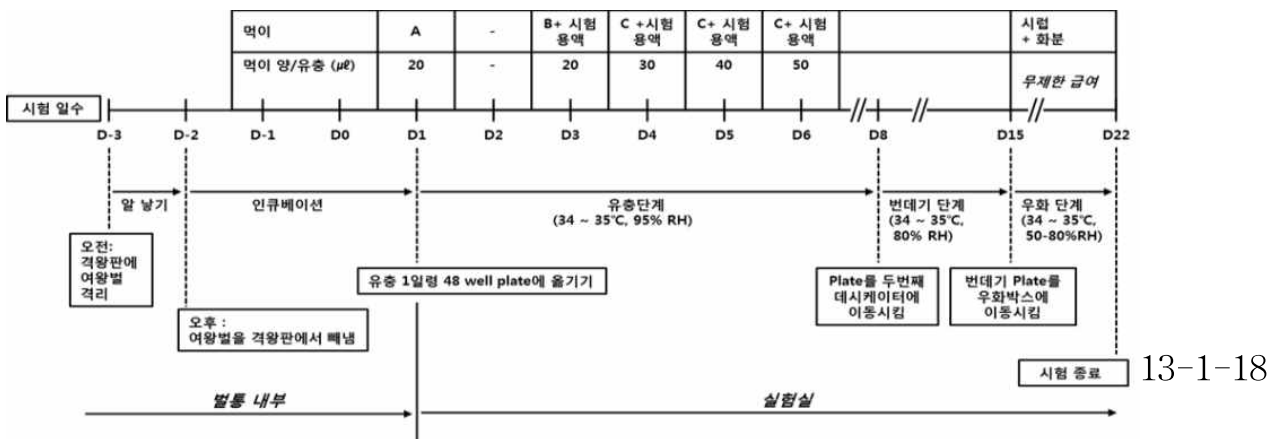
먹이 종류	시험 일수	먹이 양/유충(μ l)	로알젤리 (%)	효모추출물 (%)	포도당 (%)	과당 (%)	증류수 (%)
A	D1	20	50	1	6	6	37
B	D3	20	50	1.5	7.5	7.5	33.5
C	D4~D6	30/40/50	50	2	9	9	30

효모추출물(yeast extract), 포도당(dextrose), 과당(D-Fructose)을 증류수에 완전히 녹인 후 로알젤리와 혼합한다. 채집 후 12개월이 지나지 않은 신선한 로알젤리를 사용하며 영하 10 $^{\circ}$ C 이하로 냉동보관한다. 각 시험 전에 신선하게 준비된 유충먹이는 시험 기간 동안 5 $^{\circ}$ C 이하로 냉장보관하며 먹이 공급전에 인큐베이터에 넣어 34~35 $^{\circ}$ C로 따뜻하게 데운다.

13-1-18-7. 시험용액 조제: 시험용액은 3일령, 4일령, 5일령, 6일령의 유충먹이에 혼합하여 사용한다. 원제의 경우 물에 녹지 않을 경우 아세톤 등 용매에 녹여 사용하며, 그 양은 최종 먹이 공급량의 2%를 초과하지 않아야 한다.

13-1-18-8. 시험농도 설정 및 규모

13-1-18-8-1. 시험 일정



-8-2. 예비시험: NOEC/NOED 또는 EC₅₀/ED₅₀ 범위를 정하기 위해 공비(公比) 5~10으로 예비시험을 진행한다. 만일 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상될 경우에는 시험물질이 100 μ g a.i./larva(650 mg a.i./kg of diet)가 되도록

한계시험을 진행한다. 세 개의 봉군에서 각각 가져온 유충 12마리씩 3반복으로 시험을 실시하며, 이때에도 용매대조군과 양성대조군을 포함하여야 한다.

13-1-18-8-3. 본시험: 시험농도는 공비가 3을 넘지 않게 5개 수준 이상으로 하며 농도 수준당 세 개의 봉군에서 각각 가져온 유충 12마리씩 3반복 이상으로 한다.

13-1-18-9. 대조군 설정: 약제조제 시 사용된 물 또는 용매를 음성대조군으로 하고 시험물질의 작용기작에 따라 dimethoate(48 mg a.i./kg of diet) 또는 fenoxycarb(0.32 mg a.i./kg of diet) 원제를 양성대조군으로 하여 시험한다. Dimethoate 처리군의 유충 치사율이 50% 미만이거나, fenoxycarb 처리군의 우화율이 20%를 초과할 경우에는 재시험을 실시하여야 한다. 또한 음성대조군에서 유충의 치사율이 15% 초과하거나 우화율이 70% 미만일 경우에도 재시험을 실시하여야 한다.

13-1-18-9-1. 양성대조군 처리 양

처리	시험물질	D3	D4	D5	D6	총량/유충
양성 대조군	Dimethoate (µg)	1.06	1.58	2.11	2.64	7.39
	Fenoxycarb (ng)	7.04	10.56	14.08	17.60	49.28

13-1-18-10. 약제처리: 유충 3일령부터 6일령까지(D3-D6) 유충먹이에 약제를 혼합하여 최종 양 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl를 시험용기에 처리한다.

13-1-18-11. 시험조건: 시험기간동안 온도 34~35℃, 시험 1일차부터 7일차까지 습도 95±5%, 시험 8일차부터 14일까지 습도 80±5%, 시험 15일차부터 시험 종료시까지 습도 50~80%를 유지하며, 암조건에서 사육하되 관찰을 위해서 사육조건을 이탈한 시간이 일일 30분을 넘지 않도록 한다. 단, 온도는 23℃ 밑으로 내려가거나 40℃보다 높아서는 안된다.

13-1-18-12. 관찰기간: 첫 약제처리 다음날인 유충 4일차부터 8일차까지 매일 1회 관찰하고, 시험 후 9일차부터 시험 후 22일차까지 매일 또는 격일 1회 관찰한다. 관찰기간 동안 치사한 유충 및 번데기를 시험용기에서 제거한다.

13-1-18-13. 관찰사항: 이상증상, 치사개체수를 기록한다. 시험 8일차(D8)에 남아 있는 먹이를 기록한다.

13-1-18-14. 결과정리: 유충치사율(D3-D8), 번데기 치사율(D8-D15), 우화율(D22), 시험종료일(D22) 기준 NOEC/NOED, EC₅₀/ED₅₀을 산출한다. Stock solution 측정농도를 기록한다.

13-1-19. 꿀벌 10일 만성섭식독성시험 <신설 2025.1.23.>

13-1-19-1. 시험물질: 원제

13-1-19-2. 시험생물: 꿀벌(*Apis mellifera* L.)을 사용하여야 하며 최소 한 달 동안 화학물질을 처리하지 않은 건강한 봉군을 사용한다. 같은 날 우화할 것으로 예상되는 번데기장을 항온항습기에서 보관하거나 벌통안에 일벌격리상자를 넣고 그 안에 번데기장을 넣어 최대 2일이 넘지 않는 어린 꿀벌만 수집하여 사용한다. 동일한 육아장에 있는 꿀과 꽃가루 또는 먹이를 함유한 벌집을 추가하여 충분한 먹이를 공급해야 한다.

13-1-19-3. 시험용 용기: 시험용기는 스테인리스강, 판자, 철망, 플라스틱, 나무 등으로 청소가 쉽고 일회용이며 환기가 가능하게 제작된 최소 200 cm³의 싱글케이지를 사용한다.

13-1-19-4. 시험전 처리: 무작위 수집한 최소 2일령의 꿀벌 일벌을 마취시키지 않고 시험용 용기에 넣는다. 약제를 처리하지 않은 50%(w/v) 자당용액을 튕을 제거한 2 ml 용량의 플라스틱 주사기에 넣고 시험용 용기에 고정시켜 일벌에게 무제한 공급하며 최소 하루 동안 시험조건에 순응시킨다. 시험 시작 전 공복기간은 필요하지 않다.

13-1-19-5. 시험용 먹이 및 급여량: 시험용 먹이는 50% 자당용액을 사용하며 임의로 매일 공급한다.

13-1-19-6. 시험용액 조제: 사용되는 약제가 수용성인 경우 물에 녹이고 수용성이 낮을 경우 아세톤 등 유기용매에 녹여 사용한다. 적절한 용매에 녹인 약제를 50% 자당용액과 혼합한다. 이때 용매의 양은 최종 부피의 5%를 초과하지 않아야 한다. 최종 먹이급여용액은 사용하지 않을 때는 냉장보관(약 6±2℃)하며 제조후 4일이 지나면 폐기하고 새로 만든다.

13-1-19-7. 시험농도 설정 및 규모

13-1-19-7-1. 예비시험: 화학물질의 독성이 알려져 있지 않은 경우 먼저 적절한 예비시험을 진행한다. 독성이 알려지지 않은 경우, 본시험의 적절한 농도를 도출하기 위해 한계시험을 수행 할 수 있다. 한계시험은 음성대조군과 약제처리군을 농도수준당 10 마리씩 5 반복, 양성대조군을 10 마리씩 3 반복으로 시험을 실시한다.

13-1-19-7-2. 본시험: 시험농도는 공비(公比)가 2.5 를 넘지 않게 5 개 수준 이상으로 하며 농도 수준당 10 마리씩 3 반복 이상으로 한다.

- 13-1-19-8. 대조군 설정: 약제조제시 사용된 물 또는 용매를 음성대조군으로 하고 dimethoate를 양성대조군으로 하여 시험한다. 먹이의 증발량을 측정하기 위해 꿀벌을 넣지 않은 케이지를 증발처리군으로 하여, 계산된 먹이 소비량에서 증발량을 뺀 값이 음수인 경우 해당일의 먹이 소비량은 "0"(먹이 소비량 없음)으로 간주한다. 양성대조군 0.5~1.0 mg a.i./kg feeding solution 처리시 치사율이 50% 미만일 경우 재시험을 실시하여야 한다.
- 13-1-19-9. 약제처리: 50% 자당용액에 약제를 혼합하고 팁을 제거한 2 ml 용량의 주사기에 1 ml씩 넣어 공급한다. 매일 24시간(± 2 시간) 간격으로 먹이주사기를 교체하여 먹이용액을 교체한다. 먹이공급 전과 후의 주사기 무게를 측정하여 먹이 소비량을 기록한다.
- 13-1-19-10. 증발: 먹이의 증발량을 측정하기 위해 꿀벌을 넣지 않은 추가 시험케이지가 필요하며, 이 케이지는 시험 기간 동안 동일한 시험조건에 배치되며, 약제처리군의 먹이주사기가 교체될 때 무게가 측정된 새로운 먹이주사기로 교체한다. 이 증발량을 계산된 먹이 소비량에서 제외하여 증발에 의한 손실을 보정한 먹이소비량을 계산할 수 있다.
- 13-1-19-11. 시험조건: 시험기간 동안 온도 $33\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60\pm 10\%$, 일정한 암조건을 유지해야한다. 관찰을 위해서 권장 범위를 이탈한 시간은 2시간을 넘지 않도록 한다.
- 13-1-19-12. 관찰기간: 약제 처리 후 10일간 관찰한다.
- 13-1-19-13. 관찰사항: 이상증상을 매일 기록한다. 약제를 처리하고 10일간의 시험기간 동안 일정한 시간마다 (24 ± 2 시간 후) 치사개체수 및 이상증상을 기록한다. 매일 24시간(± 2 시간) 간격으로 먹이주사기를 교체하여 먹이공급 전과 후의 주사기 무게를 측정하여 먹이 소비량을 기록한다.
- 13-1-19-14. 먹이가 교체되어 다음 단계가 시작할 때 살아있는 일벌의 수는 해당 먹이의 평균소비량 계산에 사용된다. 관찰된 데이터로부터 일벌 당 평균 먹이 섭취량(mg/bee), 시험 기간 동안 처리군 당 공급 먹이의 일일 평균 섭취량(mg/bee/day), 시험 기간 동안 반복 실험군 당 공급 먹이의 일일 평균 섭취량(mg/bee/day), 일벌 한 마리 당 시험물질의 일일 평균 섭취량(μg or ng a.i./bee/day), 시험 기간 동안 일벌 한마리 당 시험물질의 누적 섭취량(μg or ng a.i./bee/day) 등을 산출하여야 한다.
- 13-1-19-15. 결과정리 : 시험물질 처리 10일 후 $\text{LC}_{50}/\text{LDD}_{50}$, NOEC/NOEDD 를 산출한다.

13-1-20. 꿀벌 봉군먹이급이시험 <신설 2025.1.23.>

13-1-20-1. 시험물질: 품목

13-1-20-2. 시험생물: 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 봉군을 사용한다.

13-1-20-3. 시험전 준비

13-1-20-3-1. 시험조건: 시험은 가급적 봄과 여름에 실시하며 주변에 과수원, 유채꽃 등 밀원 식물이 있는 곳은 피해야 한다. 봉군의 먹이가 급격히 감소할 경우 무처리된 화분떡 및 설탕용액을 추가로 공급할 수 있다. 단, BFD(brood fixing day) 0일 전이나 BFD 4-5일까지(급성시험) 또는 BFD 10일까지(만성 시험)는 추가 먹이 공급을 해서는 안된다. 모든 봉군에 동일한 먹이의 양을 같은 시간대에 공급해야 한다.

13-1-20-3-2. 봉군준비: 시험 시작 일주일 전에 봉군을 준비한다. 변이와 유전 적 다양성을 최소화하기 위해 우화한지 2년 이하의 번식기에 있는 같은 자매 여왕벌(sister queen)을 사용한다. 시험 시작 4주 전부터 약제처리를 하지 않아야 하며, 질병이 없는 건강한 봉군을 사용한다. 초기 봉군 세력은 봉군 당 일별 10,000~15,000 마리 정도가 되어야하며 알, 유충, 번데기로 구성된 4-6 개의 육아 소비판(brood comb)과 먹이판을 포함하여야 한다. 단, 과도한 화밀 /꿀이 저장되어 있는 벌통은 피한다.

13-1-20-4. 순화기간: 시험 시작 최소 3일 전에 시험장소에 벌통을 배치하여 꿀벌이 새로운 환경에 적응할 수 있도록 한다. 시험장소에 봉군을 배치한 직후 벌통에 사충수집통(dead bee trap)을 설치한다.

13-1-20-5. 시험기간: BFD 0일부터 22일까지를 한 번의 주기로 하여 시험을 진행한다. 필요시 2회 이상의 주기를 추가적으로 평가할 수 있다.

13-1-20-5-1. 시험 일정



* BFD = Brood fixing day

** 먹이 공급 1일 전 또는 먹이 공급 당일

13-1-20-6. 시험군 구성: 무처리군, 처리군 및 양성대조군을 설정하고, 용매가 사용되는 경우 용매대조군도 설정한다.

- 13-1-20-6-1. 무처리군: 50% (w/v) 자당용액을 공급한다.
- 13-1-20-6-2. 양성대조군: fenoxycarb 또는 diflubenzuron을 유효성분으로 하는 제품을 사용한다.
- 13-1-20-6-3. 시험규모: 각 처리군당 최소 4반복(4개 봉군) 이상 시험한다.
- 13-1-20-7. 시험농도 설정: 시험농약의 최대 살포량 기준, 또는 화밀의 농약잔류량, 꿀벌 유충독성시험의 무영향농도(NOEC, No observed effective concentration)를 이용하여 시험농도를 설정한다.
- 13-1-20-8. 시험농약 처리
- 13-1-20-8-1. 처리군 및 양성대조군은 50% (w/v) 자당용액에 시험농약을 녹여 공급한다. 먹이공급기는 벌통 상부쪽에 배치하고 벌이 익사하지 않도록 적절하게 조치한다. 다음날 먹이공급기 무게를 측정하여 남은 먹이량을 기록한다. 첫 급이는 BFD 0일이나 또는 1일 후(BFD 1)에 수행한다. 연구 목적에 따라 두가지 급이 방식이 가능하다. 급성급이시험은 1회 먹이를 공급하고, 만성급이시험은 9회 먹이를 공급한다.
- 13-1-20-8-2. 급성급이시험: 봉군 당 1 L 자당용액에 시험농약을 녹여 1회 노출한다. 면적 1 ha 당 100 g/400 L 살포하는 경우 봉군당 1 L 자당용액에 250 mg 농약을 녹여 봉군에 공급한다.
- 13-1-20-8-3. 만성급이시험 : 봉군 당 0.5 L 자당용액에 시험농도의 1/9 농도씩 녹여 9일 동안 매일 노출한다. 면적 1 ha 당 100 g/400 L 살포하는 경우 봉군당 0.5 L 자당용액에 14 mg 농약을 녹여 봉군에 공급한다.
- 13-1-20-9. 관찰사항: 시험기간 동안 꿀벌 치사개체수, 봉군상태, 난유충발육도를 관찰하고 기록한다. 또한 기상데이터를 매일 기록한다.
- 13-1-20-9-1. 꿀벌 치사개체수: 사충수집통에서 죽은 벌 및 번데기를 수집하여 매일 아침 같은 시간대에 치사개체수를 기록한다. 치사개체수가 갑자기 증가하는 경우 벌통 바닥의 죽은 벌도 기록한다. 죽은 벌은 기록 후 반드시 제거한다.
- 13-1-20-9-2. 꿀벌 이상증상: 치사개체를 관찰하는 동안 벌통 입구와 그 주변에서 관찰되는 벌의 이상증상을 기록한다(예: 떨림, 경련, 마비, 활동성이 저하된 벌 등)
- 13-1-20-9-3. 봉군상태: 봉군 세력(꿀벌 개체수), 건강한 여왕벌, 꿀과 화분의 소비면적, 알, 유충, 번데기를 포함한 소비면적을 관찰하고 기록한다. 꿀벌 질병 증상을 육안으로 확인하고 기록한다. 모든 처리군에 대한 평가는 같은 날

에 실시하며, 약천후의 경우 봉군 평가를 연기한다. 관찰은 BFD 0(초기 평가, 첫 급이 1일 전 또는 당일), BFD 10(± 1 day) 및 BFD 22(± 1 day)에 실시한다. 필요시 봉군 발달에 대한 추가 데이터를 수집하기 위해 BFD 4-5 및 BFD 16(± 1 day)에 대한 평가를 수행할 수도 있다. 또한, 목적에 따라 시험 주기를 연장하거나 봉군 평가 주기를 추가할 수 있다.

13-1-20-9-4. 난유충발육도: 각 봉군에서 BFD 0일에 최소 200마리의 알을 지정하고, BFD 4-5, 10(± 1), 16(± 1), 22(± 1)일 날 포토박스를 이용하여 소비편을 촬영하고 난유충발달단계를 기호, 색상 또는 문자로 기록한다. 지정된 셀의 발육단계를 평가하기 위해 0에서 5의 점수를 부여한다(Brood-index). 급성 급이시험에서 알 및 어린 유충뿐만 아니라 노숙 유충을 같이 지정하여 관찰할 수 있다. 만성급이시험에서 알을 지정하여 관찰하고 필요시 어린 유충 및 노숙 유충도 같이 지정하여 관찰할 수 있다.

값	내 용
0	발달 종료(termination of development)
1	알(egg)
2	어린유충(young larvae) (L1 - L2)
3	노숙유충(old larvae) (L3 - L5)
4	번데기(capped cell)
5	우화 후 빈 셀 또는 알 또는 어린 유충으로 채워진 셀
N	꿀(nectar)
P	화분(pollen)

13-1-20-9-4-1. 난유충발육도 관련 수치계산: 시험종료 후 Brood termination-rate(BTR), Brood-index(BI), Brood compensation-index(BCI)를 계산한다.

13-1-20-9-4-2. Brood termination-rate(BTR): (평가일에 예상 발달단계에 도달하지 못한 셀의 수/BFD일자별로 평가된 셀의 총 수) \times 100

13-1-20-9-4-3. Brood-index(BI): BI는 난 유충발달의 지표이며 평가 일정에 예상되는 발달 단계에 도달한 셀은 1부터 5점까지 해당 점수를 기록한다. 예상되는 발달 단계에 도달하지 못했거나 셀이 비어 있거나 각 BFD 평가일 동안 cell에 먹이가 저장되어 있으면 발달이 종료된 것으로 간주하고 0점 처리한다. 봉군의 BI는 BFD 일자별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구한다.

13-1-20-9-4-4. Brood compensation-index(BCI): BCI는 봉군 회복의 지표이며 셀은 평가일에 확인된 성장단계만을 토대로 1부터 5점까지 점수를 부여한다. BI와 달리 셀이 정상 발달단계에 도달하지 못해도 셀 안에 산란이 있으면 점

수를 부여한다. 봉군의 BCI는 BFD 일자별로 평가된 셀의 값을 모두 합한 후 관찰된 셀의 수로 나누어 구한다.

13-1-20-9-5. 기상데이터: 가장 가까운 기상관측소로부터 기상데이터를 확보하고, 대기온도, 상대습도 및 강수량의 기상데이터를 매일 기록한다.

13-1-20-10. 시험 유효성 기준: 급성급이시험에서는 BFD 22일 무처리군의 평균 BTR_{egg} 와 $BTR_{young\ larva}$ 가 30% 이하여야 한다. 만성급이시험에서는 BFD 22일 무처리군의 평균 BTR_{egg} 가 30% 이하여야 한다. BFD 22일 양성대조군의 평균 BTR_{egg} 은 70% 이상이어야 하고 무처리군에 비해 평균 번데기 치사율이 증가하여야 한다.

13-1-20-11. 결과정리: 시험물질의 물리화학적 특성, 봉군 준비일자, 봉군건강 상태, 기상데이터, 시험디자인, 시험 수행기간, 시험결과(꿀벌 치사개체수, 이상증상, 봉군상태, 난유충발육도), 통계처리 등에 대한 정보를 기록한다. 필요시 제조 먹이의 시험물질 분석 결과를 작성한다.

13-1-21. 개구리밥 생장저해시험 <신설 2025.4.9.>

13-1-21-1. 시험물질 : 원제

13-1-21-2. 시험생물

13-1-21-2-1. 시험종: *Lemna gibba* 또는 *Lemna minor* 종을 사용한다. 시험에 사용할 종을 야외에서 채취한 경우, 시험 전 약 8주 동안 계대배양 과정을 거쳐야 한다. 반면, 타 시험기관에서 제공받거나 선별 배양된 종의 경우, 약 3주간 계대배양 후 선별하여 사용한다.

13-1-21-2-2. 선별: 조류 및 원생생물의 오염이 없는 건강한 개구리밥을 선별해야한다. 건강한 *Lemna minor*일 경우 잎이 2~5개, *Lemna gibba*인 경우 7개 정도이다. 잎에는 육안으로 확인 가능한 병변이나 변색이 없어야 하며, 환경적 스트레스나 영양 부족 등으로 인해 뿌리 하나에 한 개의 잎만 있는 단일 잎이 다량으로 발생한 경우에는 사용하지 않는다.

13-1-21-2-3. 계대배양: 계대배양은 4~10°C 온도에서 수행하는 것을 권장한다.

13-1-21-2-4. 전배양: 시험 시작 전에 시험 조건과 동일한 환경에서 배양하며, 시험 시작 7~10일 전에 전배양을 진행한다. 전배양 과정에서 오염이 발생한 경우 해당 배양체는 폐기한다.

13-1-21-3. 배지: 개구리밥 배양 시 종에 따라 적합한 배지를 사용하는 것을 권장한다. *Lemna minor*의 경우, 스웨덴 표준화기구(Swedish Standard)에서

제안한 배지를 일부 수정한 스웨덴 표준배지를 사용하는 것이 좋다. 반면, *Lemna gibba*는 OECD 시험지침에서 권장하는 20X-AAP 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 배지에서 pH를 조절할 때, 시험물질이 가수분해로 불안정할 경우 각 종에 따라 다른 pH 완충제를 사용한다. *Lemna minor*에는 MOPS (4-morpholinepropane sulphonic acid, CAS No. 1132-61-2)를, *Lemna gibba*에는 NaHCO_3 를 사용하는 것을 권장한다.

13-1-21-3-1. 스웨덴 표준배지일 경우 pH를 6.5 ± 0.2 로 맞추고, 20X-AAP 배지일 경우 7.5 ± 0.1 로 맞춘다.

13-1-21-4. 시험용 수조: 유리로 된 수조를 사용하며, 뿌리가 바닥에 닿을 정도의 높이와 시험 종료 시까지 잎이 겹치지 않을 만큼 충분히 큰 용기를 사용한다. 용기는 최소 깊이 20 mm 이상, 용량 100 mL 이상이어야 한다. 또한, 배양액의 증발을 최소화하고 빛의 전달과 공기 순환이 원활하게 이루어질 수 있도록 뚜껑을 준비해야 한다.

13-1-21-5. 초기 생물량: 2~4개의 잎을 가진 개구리밥 콜로니(부모세대 잎과 자식세대 잎이 같이 있는 상태)를 무작위로 선택하여 시험용기로 옮긴다. 각 시험용기에는 2~4개의 잎을 가진 개구리밥 콜로니의 총 잎 수가 9~12개가 되도록 배치한다.

13-1-21-6. 시험농도 설정 및 규모

13-1-21-6-1. 기초시험: 시험농도는 100 ppm으로 설정한다.

13-1-21-6-2. 본시험: 시험농도는 5단계 이상으로 설정하며 농도수준당 3반복 이상으로 시험한다.

13-1-21-6-3. 농도수준간의 간격: 반수영향농도(EC_{50})를 구할 수 있는 적당한 농도수준을 두고 농도수준 단계간에는 일정한 공비를 둔다. 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다.

13-1-21-6-4. 시험수 교체: 반지수식 또는 유수식을 권장한다. 반지수식으로 시험물질을 노출하는 경우 최소 2회(3일째 및 5일째)에 걸쳐 새로 준비한 대조군과 처리군 배지에 노출시킨다.

13-1-21-7. 대조군 설정: 시험물질을 함유하지 않은 무처리 대조군을 둔다. 시험물질 조제 시 사용된 용매 및 계면활성제를 첨가한 시험용수 자체를 음성대조군으로 한다. 용매와 계면활성제는 식물에 독성이 없는 것을 사용해야 하며, 사용량은 최대 100 $\mu\text{L}/\text{L}$ 를 초과하지 않도록 한다. 또한, 사용한 양은 기록해야 한다.

13-1-21-7-1. 양성대조물질은 3,5-dichlorophenol을 사용한다. 양성대조시험은 최소 1년에 2회 이상 수행한다.

13-1-21-8. 온도: 온도는 24°C의 범위를 유지하며, 설정온도의 $\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지한다.

13-1-21-9. 광조건: 냉백색 또는 주백색 형광등을 연속적으로 사용하며, 광도는 약 6,500 lux에서 1,000 lux 사이로 유지해야 한다. 모든 시험은 광원으로부터 동일한 거리에 배치해야 하며, 동일한 거리를 유지할 수 없는 경우 시험 용기의 위치를 매일 교체하는 것이 권장된다. 또한, 배양 영역 전체의 평균 조도 차이는 $\pm 15\%$ 이내로 유지해야 한다.

13-1-21-10. 시험용수 pH: 시험 시작 전과 시험 종료 후에 측정하며, 시험기간 동안 대조군의 pH 변화는 1.5를 초과해서는 안 된다.

13-1-21-11. 시험용액 농도분석

13-1-21-11-1. 시험기간 중 시험용액의 농도 측정: 시험기간 중 최소한 최고 시험농도, 최저 시험농도, 예상되는 EC_{50} 에 가까운 시험농도의 시험물질 농도를 측정한다. 하지만 가능한 한 모든 시험농도를 측정하는 것이 바람직하다. 반지수식 시험에서는 시험용액 교체 전·후로 시험물질 농도를 측정한다. 유수식 시험에서는 시험물질의 농도를 노출 시작 시점, 시험 중간, 그리고 종료 시점에 측정한다. 또한, 시험물질 원액 용액과 희석배양 용액이 혼합되는 유속과 해당 시점의 농도를 매일 측정해야 한다.

13-1-21-11-2. 시험기간 중 시험농도의 유지: 시험기간 중 시험물질의 농도는 설정농도의 80% 이상 유지되어야 한다. 시험농도가 설정농도의 80~120%로 유지될 가능성이 없는 경우, 모든 시험농도를 측정하고 분석 횟수를 추가한다.

13-1-21-11-3. 시험결과 산출농도: 일반적으로 시험결과는 측정농도로 산출하되, 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 초기측정농도의 $\pm 20\%$ 이내일 경우 설정농도 또는 초기측정농도로 산출할 수 있다.

13-1-21-12. 관찰기간 및 관찰사항

13-1-21-12-1. 관찰기간: 시험은 총 7일 동안 진행되며, 최소 3일에 한 번, 총 2회 이상 육안으로 관찰을 실시해야 한다. 비정상적인 형태를 관찰하며, 잎 크기의 급격한 변화, 형태 변형, 괴사, 황백화(잎의 황화 현상), 콜로니 분열 또는 부력 상실, 뿌리 길이 및 형태 변화 등을 관찰한다.

13-1-21-12-2. 관찰사항: 개구리밥 잎의 개수를 관찰한다. 추가적으로 총 개구리밥 잎의 면적, 건조중량, 생중량 중 하나 이상의 측정 요소를 관찰해야 한다.

13-1-21-12-2-1. 잎의 면적 : 시험기간 동안 촬영한 사진을 활용하여 분석 및 측정할 수 있다.

13-1-21-12-2-2. 건조중량 : 배양배지에서 선별한 시험용 콜로니를 탈이온수로 세척한 후, 60℃에서 수분을 완전히 건조시켜 측정한다. 측정값은 최소 0.1 mg 이상의 정확도로 기록한다.

13-1-21-12-2-3. 생중량 : 개구리밥 콜로니를 바닥에 직경 1 mm 크기의 구멍이 있는, 사전에 무게를 측정한 폴리스틸렌 튜브에 넣는다. 그 후 실온에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리한다. 측정값은 콜로니를 넣기 전 튜브의 무게와 수분 건조된 콜로니가 들어 있는 튜브의 무게 차이를 통해 측정한다.

13-1-21-13. 시험결과 산출

13-1-21-13-1. 시험종료 후 평균생장률과 수율에 대한 반수영향농도(EC₅₀), 무영향농도(NOEC), 최소영향농도(LOEC)를 산출하여야 한다.

13-1-21-13-2. 각 농도별 처리군과 대조군에서 관찰된 반응 변수들을 기반으로 평균 성장저해율(I_r) 또는 생산량저해율(I_y)을 계산한다. 이후, 처리 농도의 로그값과 저해율 간의 관계를 그래프로 나타내어 곡선을 그린다.

13-1-21-13-3. 배가 시간: 시험 적합성을 입증하기 위해 대조군에서 잎 수 또는 다른 특정 변수들의 2배수 시간(T_d)을 계산한다. 2배수 시간은 개체 또는 변수의 양이 두 배가 되는 데 걸리는 시간으로, 아래 식을 통해 계산한다.

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

μ : 평균 비성장률

13-1-21-13-4. 평균 성장률: 시험기간 동안의 비성장률은 잎의 수와 총 잎의 면적, 건조중량, 생중량 등의 측정 변수가 대수학적(Logarithmic)으로 증가하는 비율을 기반으로 계산된다. 평균 비성장률은 다음 공식을 통해 계산한다.

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

μ_{i-j} : 평균 비성장률 (i에서 j까지 시간)

N_i : i 시간에서의 생물량

N_j : j 시간에서의 생물량

t : i 시간부터 j 시간까지의 총 기간

평균 비성장률에 대한 저해율(%I_r)은 다음 공식을 통해 계산된다.

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

%I_r : 평균 비성장률에 대한 저해율

μ_c : 대조군에서의 평균 비생장률(μ)의 평균값

μ_T : 각 처리군에서의 평균 비생장률

각 농도별 처리군의 생장률을 계산한 뒤, 이를 대조군의 생장률과 비교하여 농도별 상대적 성장저해율을 산출하고, 이를 기반으로 영향 농도(EC_x)를 계산한다. 용매대조군이 포함된 경우에는 용매대조군의 μ_c 를 기준으로 % I_r 을 계산한다.

13-1-21-13-5. 수율: 시험 시작 시점과 종료 시점에서 각 시험용기의 잎의 수와 총 잎의 면적, 건조중량, 생중량 등의 측정 변수의 변화량을 계산한다. 수율에 대한 저해율(% I_y)은 다음 공식을 통해 계산된다.

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

% I_y : 수율에 대한 감소율

b_c : 대조군의 시험 종료 시의 생물량 - 시작 시의 생물량

b_T : 각 처리군의 시험 종료 시의 생물량 - 시작 시의 생물량

13-1-21-14. 시험의 유효성 기준: 대조군의 잎 수가 초기값의 두 배에 도달하는 배가시간은 2.5일(60시간) 미만이어야 한다.

13-2. 살아있는 미생물을 유효성분으로 하여 제조한 천연식물보호제(이 기준에서 정해지지 않은 사항은 화학농약 기준을 준용)

13-2-1. 담수어류영향시험 <개정 2010.2.9.>

13-2-1-1. 시험물질 : 원제 및 품목

13-2-1-2. 시험생물

13-2-1-2-1. 어종: 잉어(*Cyprinus carpio*), 송사리(*Oryzias latipes*) 등 국제적으로 어류영향시험에 사용되는 어종으로 시험해야 한다. 단, 벼재배용 농약(품목)에 대해서는 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 시험을 추가하여야 한다.

13-2-1-2-2. 크기: 잉어는 전장 5cm정도, 송사리는 2~3cm정도 크기의 건강하고 균일한 개체를 사용하여야 한다.

13-2-1-2-3. 처리군

13-2-1-2-3-1. 처리농도는 물 1ml당 미생물 농도 1×10^6 unit 또는 단위면적당 살포량을 수심 15cm 물 중에 직접 살포한 경우로 환산한 농도의 1,000배 농도로 처리한다.

- 13-2-1-2-3-2. 상기 농도의 시험에서 영향이 인정될 경우는 영향을 나타내는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응 시험을 실시한다.
- 13-2-1-2-3-3. 시험군당 어류는 10마리 이상, 3반복으로 시험한다.
- 13-2-1-4. 노출방법 및 사육조건: 시험어류를 처리농도의 시험액에 반지수식으로 노출시킨다. 시험용수는 탈염소 수돗물 혹은 양질의 지하수를 사용하고, pH는 6.5~8.0 범위이어야 한다. 시험용수량은 1ℓ 이상/g체중으로 하고, 수온은 시험에 사용한 종의 적온 $\pm 2^{\circ}\text{C}$, 용존산소는 포화농도의 60% 이상으로 한다. 사료는 매일 일정량의 배합사료 (건조중량으로 어체중의 약 3%)를 준다.
- 13-2-1-5. 시험기간: 노출개시일부터 30일간을 원칙으로 한다. 시험기간 중 영향이 나타난 경우에 회복, 사망, 빈사 상태를 확인할 때까지 시험기간을 연장한다.
- 13-2-1-6. 검사항목
- 13-2-1-6-1. 수질검사: 수온, 용존산소농도, pH, 총경도 및 시험용수중 미생물농도를 정기적으로 측정한다.
- 13-2-1-6-2. 체중측정: 시험시작 및 부검 시에 측정한다.
- 13-2-1-6-3. 증상관찰: 외관, 먹이섭식, 유영이상, 사망 등을 매일 관찰한다.
- 13-2-1-6-4. 병리검사: 시험기간 중 치사나 병원성을 보이면 시험생물 조직으로부터 균을 분리 동정하여야 하고, 시험 종료후 생존한 전 개체는 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조구와 비교하여 기록한다.
- 13-2-1-7. 결과정리
- 13-2-1-7-1. 검사항목에 따른 성적을 정리한다.
- 13-2-1-7-2. 영향이 인정될 경우는 LC_{50} (또는 IC_{50})을 산출하거나 최대무작용량을 산출한다.

13-2-2. 담수무척추동물영향시험 <개정 2010.2.9.>

- 13-2-2-1. 시험물질: 원제 또는 품목
- 13-2-2-2. 시험생물: 물벼룩류(*Daphnia magna*, *D. sp.*, *Moina macrocopa*)중 1종을 사용한다.
- 13-2-2-3. 시험군 구성
- 13-2-2-3-1. 대조군 : 무처리군과 살균하여 여과한 배양균을 음성대조군으로 둔다.
- 13-2-2-3-2. 처리군

- 13-2-2-3-2-1. 처리농도는 물 1ml당 미생물 농도 1×10^6 unit 또는 단위면적당 살포량을 수심 15 cm 물 중에 직접 살포 한 경우로 환산한 농도의 1,000배 농도로 처리한다.
- 13-2-2-3-2-2. 상기 농도의 시험에서 영향이 인정될 경우에는 영향을 나타내는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응시험을 실시한다.
- 13-2-2-3-2-3. 시험군당 시험생물수는 20마리 이상, 3반복으로 시험한다.
- 13-2-2-4. 노출방법 및 사육조건 : 처리농도의 시험액에 반지수식으로 노출시킨다. 시험용수는 탈염소수돗물 혹은 양질의 지하수를 사용하고 pH는 6.5~8.0 범위이어야 한다. 시험용수의 양은 40ml 이상/마리로 하고 수온은 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 용존산소농도는 포화농도의 60% 이상으로 한다.
- 13-2-2-5. 시험기간 : 노출개시일부터 21일간(시험생물에 따라 달라질 수 있음)을 원칙으로 한다. 시험기간 중에 영향이 나타난 경우에는 회복, 사망, 빈사 상태를 확인할 때까지 시험기간을 연장한다.
- 13-2-2-6. 검사항목
- 13-2-2-6-1. 수질검사 : 수온, 용존산소농도, pH, 총경도 및 시험용수중 미생물 농도를 정기적으로 측정한다.
- 13-2-2-6-2. 증상의 관찰 : 외관, 유영이상, 사망 등을 매일 관찰한다.
- 13-2-2-7. 결과정리
- 13-2-2-7-1. 검사항목에 따른 성적을 정리한다.
- 13-2-2-7-2. 영향이 인정될 경우에는 LC_{50} (또는 IC_{50})을 산출하거나 최대무작용량을 구한다.

13-2-3. 조류(鳥類)영향시험 <개정 2010.2.9.>

- 13-2-3-1. 시험물질 : 원제 또는 품목
- 13-2-3-2. 시험생물 : 14~28일령의 메추라기 또는 청둥오리를 사용하되 평균체중 $\pm 20\%$ 범위내에서 균일한 개체를 사용한다.
- 13-2-3-3. 시험군 구성
- 13-2-3-3-1. 대조군 : 무처리군과 살균하여 여과한 배양균을 음성대조군으로 둔다.
- 13-2-3-3-2. 처리군
- 13-2-3-3-2-1. 개체당 10^8 단위에 해당하는 미생물농약 0.2 ml를 5일간 매일 경구 투여한다.
- 13-2-3-3-2-2. 상기 투여량의 시험에서 독성/병원성이 인정될 경우 독성/병원성

을 일으키는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응시험을 실시한다.

13-2-3-3-2-3. 시험군당 조류는 군당 10수, 3반복으로 시험한다.

13-2-3-4. 시험기간 : 투여개시일부터 30일간을 원칙으로 한다. 30일차에도 시험기간 중에 독성/병원성이 나타난 경우에는 회복, 사망, 빈사상태를 확인할 때까지 시험기간을 연장한다.

13-2-3-5. 사육조건 : 사료는 항생물질이 함유되지 않은 어린 새끼용 사료를 성장 정도에 따라 적당량 급여한다. 음용수는 매일 교환하여 준다. 온도 및 습도는 일령에 따라 최적조건으로 하고 16시간 밝고, 8시간 어둡게 주기적으로 조명한다.

13-2-3-6. 검사항목

13-2-3-6-1. 증상관찰 : 깃털세움, 날개처짐, 원기소실, 머리떨굼, 눈감음, 침흘림, 설사, 호흡곤란, 쇠약, 사망 등을 매일 관찰한다.

13-2-3-6-2. 체중측정 : 체중은 투여 직전, 투여 후 7일, 14일, 21일, 28일 또는 사망시에 측정하고 시험기간을 연장할 경우는 매 주마다 측정한다.

13-2-3-6-3. 병리검사 : 시험기간중 치사나 병원성을 보이면 즉시 부검하여 주요 장기별로 병리조직학적 검사를 하여 미생물 감염여부를 조사하고, 시험종료 후 생존한 전 개체는 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조구와 비교하여 기록한다.

13-2-3-7. 결과정리

13-2-3-7-1. 증상관찰, 병리검사 결과를 기본으로 하여, 다음 항목에 관하여 정리한다.

① 일반 증상 ② 사망률 ③ 체중변화 ④ 병리적 소견 ⑤ 장기별 감염의 유무

13-2-3-7-2. 영향이 인정될 경우에는 LD₅₀(또는 ID₅₀)을 산출하거나 최대무작용량을 산출한다.

13-2-4. 꿀벌영향시험 <개정 2010.2.9.>

13-2-4-1 시험물질 : 원제 또는 품목

13-2-4-2 시험생물 : 서양종 황색꿀벌(*Apis mellifera*)로 한 벌통에서 생산된 건강한 일벌을 사용한다.

13-2-4-3 시험군 구성

13-2-4-3-1. 대조군 : 무처리군

13-2-4-3-2. 처리군

13-2-4-3-2-1. 추천사용약량의 10~100배 농도로 처리하되 가능한 한 고농도액을 처리한다.

13-2-4-3-2-2. 상기 약량의 시험에서 영향이 인정될 경우는 영향을 일으키는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응시험을 실시한다.

13-2-4-3-2-3. 시험군당 25마리이상으로 하고, 3반복으로 실시한다.

13-2-4-4. 노출방법 및 사육조건 : 미생물농약이 사상균일 경우에는 분무기를 사용하여 꿀벌이 완전히 덮힐 때까지 분무한다. 꿀벌에 부착이 잘 안 되는 경우에는 꿀벌에 영향이 없는 전착제를 첨가하여 분무한다. 이 때 체표면의 분무액이 마른 후 먹이를 급여한다. 사상균 이외의 미생물농약은 미생물농약을 섞은 설탕용액(50%)을 급여기에 넣어서 48시간 섭취시킨 후 깨끗한 먹이를 급여한다.

13-2-4-5. 시험기간 : 노출 후 30일간을 원칙으로 한다. 단, 꿀벌이 30일간 관찰이 불가능한 경우에는 대조구 치사율이 20%이상 될 때까지로 한다.

13-2-4-6. 검사항목

13-2-4-6-1. 증상관찰 : 행동, 사망 등에 대해 관찰하되 노출 4시간 후에 첫 번째 관찰을 행한다. 그 후는 매일 일정시각에 관찰한다. 이상행동 판정은 처리구와 대조구를 비교하여 행한다.

13-2-4-6-2. 병리검사 : 시험 중 사망 개체는 2차 감염을 막기 위하여 즉시 꺼내어 농약미생물의 감염유무 등을 조사하고, 영향이 인정된 개체에 대하여는 반드시 감염의 원인을 밝혀야 한다.

13-2-4-7. 결과 정리

13-2-4-7-1. 검사항목에 따른 성적을 정리한다.

13-2-4-7-2. 영향이 인정될 경우에는 LC₅₀(또는 IC₅₀)을 산출하거나 최대무작용량을 산출한다.

13-2-5. 토양미생물 영향시험

13-2-5-1. 시험물질 : 원제 또는 품목

13-2-5-2. 시험토양 및 시험구 크기 : 미생물농약이 논에 사용될 경우는 논토양을, 밭(과수원 등)에 사용될 경우는 밭토양을 사용하되, 시험구는 1m×1m 정도의 크기로 격리, 관리할 수 있는 시설을 사용한다.

13-2-5-3. 시험구 구성

- 13-2-5-3-1. 대조구 : 미생물이 제거(멸균)된 배양액을 대조구로 둔다.
- 13-2-5-3-2. 처리구
 - 13-2-5-3-2-1. 단위면적당 추천사용량의 10배량을 토양에 혼합하되, 혼합깊이는 20cm로 한다.
 - 13-2-5-3-2-2. 상기 사용량의 시험에서 영향이 인정될 경우는 영향을 일으키는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응시험을 실시한다.
- 13-2-5-4. 시험기간 : 3개월간을 원칙으로 한다.
- 13-2-5-5. 토양채취 : 시험구당 4개소 이상에서 토양시료채취기구(직경 4cm × 길이 4cm정도) 등을 사용해서 시료를 채취하고 잘 혼합한다. 채취시기는 처리 후 1일, 10일, 30일, 90일로 한다.
- 13-2-5-6. 검사항목 : 채취한 토양중 진균, 세균 및 방선균에 대한 균수를 측정한다.
- 13-2-5-7. 결과정리
 - 13-2-5-7-1. 검사항목에 따라 조사성적을 정리한다.
 - 13-2-5-7-2. 영향이 인정될 경우에는 최대무작용량을 구한다.

13-2-6. 표적외 곤충영향시험 <개정 2010.2.9.>

- 13-2-6-1. 시험물질 : 원제 또는 품목
- 13-2-6-2. 시험곤충은 아래의 7목중 적어도 2개의 목에 속하는 3종의 곤충을 선택한다.
 - 13-2-6-2-1. 기생성 파리목
 - 13-2-6-2-2. 기생성 벌목
 - 13-2-6-2-3. 포식성 노린재(매미)목
 - 13-2-6-2-4. 포식성 딱정벌레목
 - 13-2-6-2-5. 포식성 풀잠자리목
 - 13-2-6-2-6. 포식성 응애목
 - 13-2-6-2-7. 포식성 거미목
- 13-2-6-3. 시험군 구성
 - 13-2-6-3-1. 대조군 : 미생물이 제거(멸균)된 배양액을 대조구로 둔다.
 - 13-2-6-3-2. 처리군
 - 13-2-6-3-2-1. 추천사용농도의 10~100배 농도로 처리한다.
 - 13-2-6-3-2-2. 상기 약량의 시험에서 영향이 인정될 경우는 영향을 일으키는 미생물농약의 용량을 밝히기 위하여 용량반응시험을 실시한다.

13-2-6-3-2-3. 시험은 3반복 실시한다.

13-2-6-4. 노출방법 : 농약미생물의 종류, 작용기작 및 시험곤충을 감안하여 감염되기 쉬운 노출경로를 선택한다.

13-2-6-5. 시험기간 : 사상균은 8~10일, 나머지는 21~30일로 한다. 단, 시험곤충이 시험기간까지 생육할 수 없을 경우는 대조구 치사율이 20% 이상일 때까지 관찰한다.

13-2-6-6. 검사항목

13-2-6-6-1. 증상관찰 : 병원성여부나 치사여부를 조사한다.

13-2-6-6-2. 병리검사 : 시험중 사망 및 영향이 인정된 개체에 대하여 농약미생물의 감염유무 등을 조사한다.

13-2-6-7. 결과정리

13-2-6-7-1. 검사항목에 따른 성적을 정리한다.

13-2-6-7-2. 영향이 인정될 경우에는 LC_{50} (또는 IC_{50})을 산출하거나 최대무작용량을 구한다.

13-2-7. 환경 중 행적에 관한 시험

13-2-7-1. 시험물질 : 품목

13-2-7-2. 시험방법 : 미생물농약의 생물적 성상, 사용방법, 환경생물에 대한 영향시험에서 영향이 인정된 생물의 종류 및 특성 등을 충분히 감안하여 그 생물종에 대한 미생물농약의 환경 중에서의 노출가능성 및 노출량을 평가할 수 있는 적절한 시험방법을 설정하여 시험한다.

13-2-7-3. 조사항목 : 미생물농약의 환경 중에서 살아 남아있는 정도, 증식성 등의 동태를 조사한다.

13-3. 자연계에서 생성된 유기화합물 또는 무기화합물을 유효성분으로 하여 제조한 천연식물보호제 (이 기준에서 정해지지 않은 사항은 화학농약 기준을 준용)

13-3-1. 조류(鳥類)급성독성시험 <개정 2010.2.9.>

국제적으로 통용되는 시험방법에 따른다.

13-3-2. 담수어류영향시험: 천연식물보호제에 해당되지 않는 농약의 13-1-1.

담수어류급성독성시험 기준을 따른다. <개정 2010.2.9., 2021.9.28.>

13-3-2-1. ~ 13-3-2-14. <삭제 2021.9.28.>

13-3-3. 담수무척추동물영향시험 <개정 2010.2.9.>

국제적으로 통용되는 시험방법에 따른다.

13-3-4. 적용외 식물 영향 시험

국제적으로 통용되는 시험방법에 따른다.

13-3-5. 표적외 곤충 영향 시험

국제적으로 통용되는 시험방법에 따른다.

13-3-6. 환경중 행적에 관한 시험

국제적으로 통용되는 시험방법에 따른다.