

전염병예비용 살충제 등의 효력시험 가이드라인

2008. 12.

목 차

I. 살충제 효력시험법	3
가. 직접분무 시험	4
나. 가열연막 시험	6
다. 잔류분무 시험	8
라. 극미량연무시험	11
마. 수면도포 시험	13
바. 독먹이 시험	15
II. 살서제 효력시험법	17
독먹이용 살서제의 효력시험	18
III. 살충제 저항성 시험법	25
가. 미량국소처리법	25
나. 침지처리법	28
다. 배지혼입법	34

I. 살충제 효력시험법

위생해충의 종류는 모기, 파리, 바퀴, 진드기 등으로 매우 다양하다. 최근 많은 해충들의 살충제에 대한 저항성이 증가하여 몇몇 해충들은 복합저항성을 보여 방제에 어려움을 더하고 있다. 위생해충의 살충제에 대한 감수성은 종간에 큰 차이를 보이며, 살충제에 대한 저항성이 있는 계통은 감수성계통과 다르다. 따라서, 살충제의 효력시험은 여러 가지 종류의 해충을 적용하고, 각 해충에 있어서의 대표적인 저항성계통을 이용하여 살충제의 살충작용이 갖는 특이성을 파악할 필요가 있다. 따라서 살충제의 효력시험은 해충에 대한 작용 특이성을 추측할 수 있는 여러 종류의 시험법으로 수행하여 얻어진 결과를 종합 판단하여 야외에서의 방제효과를 추정하여야 한다. 야외 조건 하에서 살충제 및 살서제의 효력을 평가하기 위해서는 다양한 요인을 고려하여 실험을 수행하지 않으면 재현성, 반복성 및 정확성이 있는 자료를 얻을 수 없기 때문에 이와 같은 요인들을 고려한 표준화된 효력시험법이 필요하다.

살충제의 효력 평가방법은 국가 또는 국제기관별로 다소 차이가 있으나 세계보건기구의 WHOPES(World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme)에서는 살충력 및 기피력을 측정하기 위한 시험방법을 상세히 제시하고 있으며 국제공인시험법으로서 널리 이용되고 있다. “Protocols for laboratory and field evaluation of insecticides and repellents”(CTD/WHOPES/IC/96.1)에서는 살충제 및 기피제 효력 시험법에 대해 전반적으로 소개하고 있으며, “Guidelines for testing mosquito adulticide for indoor residual spraying and treatment of mosquito net”(WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3)에서는 야외 잔류분무 및 모기장 살포에 대한 살충효력실험법을 제시하고 있고, “Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides”(WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13)에서는 모기 유충에 대한 성장억제제와 세균성 살유충제에 대한 효력시험법을 제시하고 있다. 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)에서도 살충력 및 기피력을 측정하기 위한 시험방법을 제시하고 있다.

살충제의 효력은 시험자와 사용하는 살충제의 종류 및 제형, 시험에 사용한 곤충의 상태에 따라서 많은 차이가 발생 할 수 있어, 이러한 오차를 줄이기 위해서는

표준화된 살충제의 효력시험법을 제정하여 각 시험기관에서 동일한 방법을 사용함으로써 제품에 대한 살충력의 비교가 가능하게 하여야 한다. 2003년도에 약사법이 개정되어 전염병예방용 살충제를 허가받기 위해서는 안전성 및 유효성자료의 제출이 의무화되어 있으며 이에 따라 식품의약품안전청은 여러 살충제 효력시험법의 장단점을 고려하여 국내 실정에 적합한 살충제의 효력시험 가이드라인을 마련하였다. 이 가이드라인은 전염병예방용 살충제의 효력을 평가하기 위한 표준화된 방법을 제시하여 살충제, 살서제 등의 심사에 도움을 주기위한 목적으로 작성되었다.

가. 직접분무 시험

개 요 : 살포입자가 100~400 μ m 정도로 크게 분사되는 분무의 형태로서 해충방제를 목적으로 직접 약제를 살포하여 즉시 약효를 발현시키는 살포방식이다. 직접 해충에게 처리하여야 하므로 약제 살포량이 방대하고 노동력이 많이 필요하므로 효율성은 적으나 일시에 많은 해충이 발생하여 순간적으로 그 밀도를 조절하는 데는 유용한 방법이다.

대상해충 : 모기 및 파리 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 생물검정용 노출장(bioassay cage)
 - 항온항습기((25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실((25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
 - 분무기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 막대기 2개
 - 종이컵(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 라벨

- 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다).

<시험액 준비>

- ① 살충제를 증류수 또는 수돗물로 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다. 시험액의 양은 분무기의 용량을 감안하여 1L 이상 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한 지 4~6일된 암컷성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 5반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 실험하는 사람으로부터 1m 떨어진 위치에 2개의 막대기를 세운다. 막대기는 약 60cm 간격을 두고, 지상에서 1m 높이에 생물검정용 노출장을 설치한다.
- ⑤ 대조군은 물만을 처리한다. 물을 분무기 통에 넣고 압력이 40 lb/in²(760ml/분)이 되도록 압축시킨다음 하고, 분무기 노즐은 노출장보다 30cm 더 높은 위치에서 바람을 등지고 분사한다. 2개의 막대기 중앙에서 왼쪽으로 1m 전방에서 시작하여, 막대기를 지나 오른쪽으로 1m까지 분사하는데, 총 2m 거리를 7초간 분사한다. [40 lb/in²(760ml/분)인 경우 7초간 분사하며, 분당 분사되는 양이 적을 경우 분사시간을 길게 한다].
- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 시험한다. 대조군과 마찬가지로 분무기 통에 시험액을 넣고 노출장을 향하여 분사한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 분무 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓아둔다.
- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮기고 나서 망으로 덮고 고무줄로 묶은 다음 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망위에 10% 설탕물을 적신 탈지면을 올려 놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 확인하여 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

나. 가열연막 시험

개 요 : 살충제 용제를 경유(또는 등유)로 희석한 용액이 400~600℃의 연소실을 통과하면서 분사되는 순간 경유는 기화되고 경유에 용해되어 있던 살충제 입자가 공간에 미립화되어 확산됨으로써 깊숙이 은신해 있는 해충을 방제하는 데 효과적이다. 생산되는 살충제 입자의 크기는 대부분 5~15 μm로, 휴대용 연막기의 경우 보통 10m까지 유효하다.

대상해충 : 모기 및 파리 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재

- 생물검정용 노출장(bioassay cage)
- 항온항습기((25℃) 또는 항온실(25℃))
- 분석용 저울
- 증류수 제조장치
- 연막기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 막대기 2개
 - 종이컵(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
 - 경유 (또는 등유)

<시험액 준비>

- ① 물에 녹는 살충제(유제, 유탁제)는 증류수(또는 수돗물)로, 물에 녹지 않는 살충제는 경유(또는 등유)를 사용하여 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다. 시험액의 양은 연막기의 용량을 감안하여 1L 이상 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한 지 4~6일된 암컷성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 3반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 연막기 노출로부터 6m 떨어진 위치에 막대기를 2개 설치하고, 각 막대기에 1개씩 노출장을 설치한다. (막대간의 거리는 1m로 한다.) 바람이 전혀 없을 때나 풍속이 10km/h 이상일 때는 피한다.
- ⑤ 대조군은 3개의 노출장에 6m 떨어진 위치에서 경유(또는 등유)만 넣고 분

당 900mℓ로 10초간 분사한다. (시험약제에 영향을 받지 않도록 주의한다)
 총 분사량은 150mL이며, 살포거리를 10m로 보면 살충제의 처리면적은 10
 m²가 된다. 살충제의 적용비율에 따라 분사시간을 달리할 수 있다.

- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 시험한다. 대조군과 마찬가지로 2개의 노출장에
 6m 떨어진 위치에서 10초간 분사한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 연막처리 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓아둔다.
- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮
 기고 나서 망으로 덮고 고무줄로 묶은 다음 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망
 위에 10% 설탕물을 흡수시킨 탈지면을 올려 놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다.
 가볍게 컵을 흔들어 확인하여 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는
 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을
 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기,
 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모
 기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고
 시험한다. 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

다. 잔류 분무 시험

개 요 : 살충제 희석액을 100~400 μm의 큰 입자로 분사하며, 잔류 분무는 해충의 휴
 식장소, 서식장소 또는 활동장소에 잔효성의 살충제를 잔존시켜, 장시간에

걸쳐 대상해충이 접촉할 때마다 치사시키는 방법이다. 잔류 분무는 1회 처리로 장기간 방제효과가 있으며, 유제, 수화제를 대상으로 한다.

대상해충 : 모기, 파리, 바퀴, 개미

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 온도와 습도(25℃, 75±5%)가 잘 유지되는 항온항습기 또는 항온실
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
 - 공기압축분무기
- 초자 및 재료
 - 유리 흡충관
 - 세계보건기구의 생물검정 콘
 - 분무처리 재료 : 수화제-수분흡수가 잘 되는 시멘트블록
유제-페인트 바른 나무판이나 타일, 장판 중 1가지
 - 비이커
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물 (수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다).

<시험액 준비>

- ① 살충제를 증류수 또는 수돗물로 추천농도, 배량, 반량으로 희석한다.

<대상재료 준비>

- ② 살충제 처리용 대상재료는 시험약제가 수화제이면 수분흡수가 잘 되는 시멘트블록 벽면으로 하고, 유제이면 수분 흡수가 잘 안되는 페인트 바른 나무 벽면, 타일 벽면, 장판 벽면 중에서 1가지를 준비한다.

<실험곤충 준비>

- ③ 실험곤충은 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 한다. 모기와 파리의 경우 우화 후 4~6일된 암컷성

충을, 바퀴의 경우 우화 후 10~15일된 암컷성충을 준비한다. 개미의 경우 야외에서 직접 채집한다.

- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다.

- 모기 : 암컷 25마리/1회
- 파리 : 암컷 25마리/1회
- 바퀴 : 암컷 10마리/1회
- 개미 : 암수 구별없이 25마리/1회

<노출실험>

- ⑤ 대조군은 물을 이용하여 대상재료에 40 mL/m²이 되도록 분무한다. 분무요령은 공기압축분무기의 8002호 노즐과 대상재료간의 살포거리가 50 cm가 되도록 유지하면서 2.5 m 거리를 6초간 분무한다.
- ⑥ 낮은 농도의 시험액부터 대조군과 같은 방법으로 대상재료에 분무한다. 농도별로 3반복으로 실시한다.
- ⑦ 처리 벽면이 건조되면 생물검정 콘을 벽면에 부착시키고 실험곤충을 핀셋을 이용하여 넣어 준다. 위의 입구를 솜으로 막아준다.
- ⑧ 30분간 노출시킨 다음 에테르나 탄산가스로 실험곤충을 마취시킨다. 모기, 파리는 종이 컵으로 옮겨 망을 씌운다. 바퀴는 상부로 나오지 못하도록 윗면에서 1/3 정도 위치에 오일을 처리한 비이커로, 개미는 오일을 처리한 작은 비이커로 옮긴다.
- ⑨ 모기와 파리는 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 적신 탈지면을 올려 놓는다. 바퀴와 개미는 먹이와 물을 같이 공급한다.
- ⑩ 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴다.

<실험결과>

- ⑪ 처리 후 3, 7, 14, 21, 28일째에 살충율을 조사한다. 전혀 움직임이 없거나, 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 실험곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

⑭ 처리 21일째에 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 바퀴의 경우 독일바퀴, 이질바퀴, 떡바퀴 중에서 1종을 가지고 시험하며, 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

라. 극미량연무(Ultra low volume) 시험

개 요 : 살충제 유제 또는 극미량 연무제로 가공된 제제를 희석하지 않고 특수화된 노즐의 기계적 변화에 의해 고농도 살충제를 미립화시켜 공간살포하는 방법으로, 생산되는 살충제 입자의 크기는 5~50 μm 이다. 가열연막보다 입자가 크기 때문에 분사할 때 분사구를 45도 정도 상향하여 살포한다.

대상해충 : 모기 및 파리성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 생물검정용 노출장(bioassay cage)
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 메스실린더
 - 증류수 제조장치
 - 극미량 연무기
- 초자 및 재료
 - 흡충관
 - 1 ~ 1.2 m 길이의 딱대기 2개

- 종이컵(200ml)
- 라벨

<시험액 준비>

- ① 살충제를 희석하지 않고 그대로 사용하거나 소량의 물로 희석한다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 모기는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 우화한지 4-6일된 암컷 성충을 준비한다.
- ③ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다. 실험곤충을 생물검정용 노출장에 암컷성충 25마리씩 넣는다. 농도별로 3반복시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 극미량 연무기 노즐로부터 6m 떨어진 위치에 막대기를 2개 설치하고, 각 막대기에 1개씩 노출장을 설치한다. 막대간의 거리는 1m로 하고 풍속이 10km/시간 이상일 때는 피한다.
- ⑤ 대조군은 2개의 노출장에 6m 떨어진 위치에서 물만 넣고 노즐을 45도 각도로 위로 향하여(상향하여) 분사한다. (시험약제에 영향을 받지 않도록 주의한다.)
- ⑥ 시험액은 검체를 희석하지 않고 그대로 사용하여 시험하며 8초간 노즐을 45도 각도로 위로 상향하여 분사한다.
- ⑦ 살포 후 약 10분간 막대기에 노출장이 매달려 있는 상태로 놓아둔다.
- ⑧ 10분 후 노출장에서 실험곤충(모기, 파리)을 흡충관으로 잡아 종이컵에 옮기고 망을 씌운 다음 종이컵에는 라벨을 붙인다.
- ⑨ 실험이 모두 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 종이컵 망 위에 10% 설탕물을 흡수시킨 탈지면을 올려 놓는다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하여 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 불가능한 곤

충은 죽은 것으로 간주한다.

- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑬ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다. 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

마. 수면도포 시험

개 요 : 가공한 기름제제를 수면 위에 뿌리면 단일분자막이나 응결막을 형성하며 모기유충이나 번데기가 호흡을 위하여 호흡기관을 수면 밖으로 내밀때 수면 위의 기름분자나 응결체들이 모기유충의 호흡관을 막거나 호흡을 방해함으로써 질식사시켜 살충시키는 작용을 한다.

대상해충 : 모기유충과 번데기

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 메스실린더
 - 증류수 제조장치
 - 모기유충 채집용 국자나 수서곤충 채집망
- 초자 및 재료
 - 스포이드

- 흰색 사진현상판
- 비이커(500 ml) 10개
- 모기유충 채집컵 (25 ml) 10개
- 라벨

<시험액 준비>

- ① 살충제를 희석하지 않고 그대로 사용하거나 소량의 물로 희석한다.

<실험곤충 준비>

- ② 비이커에는 증류수나 2-3일 동안 방치한 수돗물을 사용하여 225 ml 담는다. 농도구간별로 실험하는 것이 아니기 때문에 실험 개수에 따라 비이커를 준비한다.
- ③ 모기유충은 5개의 25 ml 플라스틱 컵에 미리 25마리씩 담아둔다. 그리고 번데기를 25마리씩 5개의 컵에 담아둔다. 플라스틱컵의 물의 양은 25 ml을 채운다. 총 5반복 시험이 되도록 준비한다.

<노출실험>

- ④ 플라스틱컵에 25마리씩 준비된 모기유충과 번데기를 비이커에 옮겨 담는다.
- ⑤ 대조군은 그대로 두고 시험군 비이커의 수면에 시험액을 분무기로 3회 분사한다.
- ⑥ 처리가 끝나면 항온실(25℃)에 보관한다.

<시험결과>

- ⑦ 24시간 후에 모기유충과 번데기의 살충율을 조사하여 평균 살충율을 산출한다.
- ⑧ 대조군에서 죽은 개체가 있을 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑨ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑩ 평균 살충율이 80% 이상이어야 한다.

※ 모기의 경우 집모기속에 속하는 빨간집모기, 지하집모기 및 작은빨간집모기, 숲모기속에 속하는 한국숲모기, 흰줄숲모기 및 토고숲모기, 그리고 얼룩날개모기속에 속하는 중국얼룩날개모기 중에서 각기 속을 달리하여 2 종을 가지고 시험한다.

바. 독먹이 시험

개 요 : 살충제를 대상 곤충이 선호하는 먹이와 혼합하여 만든 독먹이로 유인하여 효력을 시험하는 방법으로 유인살충제라고도 불린다. 파리 성충, 바퀴 및 개미 등을 대상으로 하며, 과립, 젤, 분말, 고형상(정제, 도너츠 형)이 있다.

대상해충 : 파리 성충, 바퀴, 개미 등

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 사각 유리용기(가로 63cm, 세로 63cm, 높이 6cm)
 - 페트리디쉬
 - 라벨
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물.

<시험액 준비>

- ① 추천약량, 배량, 반량이 되도록 독먹이제의 무게를 단 다음 페트리디쉬 넣고 라벨을 붙인다.

<실험곤충 준비>

- ② 파리 및 바퀴는 야외에서 직접 채집하거나 또는 이것을 실내에서 누대사육한 5세대 이하의 성충으로 한다. 파리의 경우 우화 후 4~6일된 암컷성충을, 바퀴의 경우 우화 후 10~15일된 암컷성충을 준비한다. 개미의 경우 야외에서 직접 채집한다.

- ③ 실험곤충의 섭식율을 높이기 위해 24시간 동안 물만 제공한다.
- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취시킨다. 사육상 바닥에 떨어진 곤충을 여지로 쓸어 담은 후에 핀셋으로 암컷성충만 선별한다.

<노출실험>

- ⑤ 사각 유리용기에 파리 및 바퀴 암컷성충 각각 50마리씩 방사한다. 개미의 경우 100마리씩 방사한다.
- ⑥ 독먹이가 들어 있는 페트리디쉬를 이 유리용기에 넣어 둔다. 농도별로 5반복으로 실시한다.
- ⑦ 대조군은 시험군과 동일한 조건으로 하고 물과 먹이만 제공한다.
- ⑧ 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 후, 10% 설탕물이 들어 있는 삼각플라스크에 탈지면을 넣어 입구 쪽을 평평하게 한다.

<시험결과>

- ⑨ 시험 후 7일간 24시간 마다 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 침금 등으로 가볍게 찢었을 때 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집혀서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑩ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑪ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.

<효과판정>

- ⑫ 추천농도에서 80% 이상의 살충율을 보여야 한다.

※ 바퀴의 경우 독일바퀴, 이질바퀴, 떡바퀴 중에서 1종을 가지고 시험하며, 파리의 경우에는 집파리를 가지고 시험한다.

II. 살서제 효력시험법

살서제는 유효성분을 경구적으로 섭취시켜서 쥐를 치사시키는 약제이기 때문에, 섭식성이 양호하여야 하며, 또한 쥐에 대한 독성이 강하여야 하고 안전성이 높아야 한다. 오늘날 사용되고 있는 살서제는 거의 독떡이로서 사용되고 있으며, 이 방법은 쥐의 구제에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있다.

외국의 살서제의 효력 평가방법은 국가별로 다소 차이가 있으나 살서제의 효력시험법으로 널리 이용되고 있는 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)의 시험방법, 즉 E 1163-98(Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats) 및 E 1372-95(Standard Test Method for Conducting a 90-Day Oral Toxicity Study in Rats)가 현재 이용되고 있으며, E 565-95(Standard Test Method for Efficacy of a Single-Dose Acute Rodenticide Under Laboratory Conditions for Commensal Rodents)는 속효성 살서제의 유효성을 평가하는 시험법이며, E 593-95(Standard Test Method for Efficacy of a Multiple-Dose Rodenticide Under Laboratory Conditions)는 완효성 살서제의 유효성을 평가하는 시험법으로 두 시험법 모두 현재 개정 중에 있다. 또한 독일의 Biologische Bundesanstalt für Land Forstwirtschaft의 시험방법인 “Richtlinie für die Prüfung von Nagetierbekämpfungsmitteln gegen Wanderatten (9-3.2)”도 국제공인시험법으로서 전문학술지에서 널리 이용되고 있다.

살서제 효력시험법은 제형 및 처리 장소 등에 따라 시험법이 다소 복잡하나 오늘날 사용되고 있는 살서제가 거의 독떡이로서 사용되고 있다는 점을 고려하여, 경제적이면서 재현성이 있으며 또한 국내 연구기관 또는 시험기관에서 간편하게 실험할 수 있는 독떡이제용 살서제의 효력시험법을 마련하였다. 이 가이드라인은 전염병예방용 살서제의 효력을 평가하기 위한 표준화된 방법을 제시하여 살서제의 심사에도 도움을 주기 위한 목적으로 작성되었다.

독먹이용 살서제의 효력시험

1. 일반사항

- 1) “전염병예방용살서제”(이하 살서제로 칭함)라 함은 “병원균을 매개하여 사람에게 질병을 일으키는 쥐를 방제하기 위한 목적으로 사용하는 제제”를 말한다(식품의약품안전청고시 제2005-26호).
- 2) 전염병예방용살서제의 사용장소는 「전염병예방법」에 정해진 바에 따라 상업용 건물, 공공기관용 건물, 산업용 건물, 주거지역 및 공공건물, 의료용 건물 등 공중보건을 위한 장소에 처리하여야 한다.
- 3) 본 시험법은 시궁쥐, 곰쥐 및 생쥐를 포함한 가주성 쥐류의 구제를 위해 살서제의 유효성 평가를 위한 시험법이다. 또한, 쥐류와 비슷한 행동양식, 생리 및 섭식 선호성을 보이는 다른 설치류에도 적용할 수 있다.
- 4) 본 시험법은 다음과 같은 ‘독먹이제’ 정의에 부합하는 모든 제품의 심사에 적용될 수 있다. ‘독먹이제’란 살서제를 적당한 고체 사료 또는 음료에 섞거나 혹은 이미 사료 형태의 먹이로 가공 처리되어 사료처럼 섭취되는 고체나 액체 또는 반죽 형태의 물질을 말한다.

또한, 작용방식에 따른 제품의 분류는 다음과 같다.

- ① ‘만성살서제’란 쥐들이 그 제품을 수차례에 걸쳐 섭취한 후에서야 죽는 약제를 말한다.
 - ② ‘지효성 급성살서제’란 쥐들이 그 제품을 단 1회 충분한 양을 섭취하면 죽는 약제를 말하나 이 경우 제품을 섭취한 후 즉시 죽지는 않는다.
 - ③ ‘속효성 급성살서제’란 쥐들이 그 제품을 섭취한 후 즉시 죽는 약제를 말한다.
- 5) 보고서에는 살서제가 어느 그룹에 속하는지를 반드시 명시하여야 한다.
 - 6) 미터법 단위를 사용한다.

2. 실험방법

2.1 실험동물

- (1) 실험동물로는 야외에서 채집된 동물들을 사용하여야 한다. 시궁쥐, 곰쥐 또는 생쥐의 야외 군체는 야외에서 생체로 잡아, 실외에서 군체로 사육하든가 또는

그들의 생리적 및 행동적인 특징의 많은 부분을 자연 그대로 유지할 수 있는 실내조건 하에서 사육한다. 야외 쥐를 사육하는데 이용되는 번식용 군체는 성질이 유순하다든가 또는 그들의 천성을 현저하게 변화시키는 다른 특성들을 염두에 두어 선택하지 않도록 한다.

- (2) 실험 시작 전에, 실험동물들이 일정 정도의 순화기간을 통해 개별적인 섭식양상이나 집단행동에 있어서도 정상적인 행동을 보인다는 사실을 입증하여야 한다.
- (3) 각 실험 마다 10마리(암컷 5마리, 수컷 5마리)를 사용하여 5마리씩 집단실험을 실시한다. 이 때 귀표를 하거나 다른 적당한 방법으로 각각의 동물을 확인한다.
- (4) 각각의 동물의 체중을 적어도 1 g 단위로 기록한다.
- (5) 실험동물들에 대한 자료들을 보고서에 명시한다.

2.2. 실험동물의 조건

- (1) 외견상 상처라든가 피부병에 의한 새로운 상처자국이 없이 건강이 양호한 동물들을 사용한다.
- (2) 실험 및 대조동물은 살서제를 포함한 어떠한 농약에라도 노출되지 않아야 한다. 단, 외부기생충 방제를 위해 적당한 농도의 피레스린 분제를 시험 개시 3일 전에 외적으로 실험 및 대조동물에 처리할 수 있다.
- (3) 시험개시 때의 실험쥐는 표 1에 기술되어 있는 체중등급 내에 들어가야 한다. 암컷과 수컷의 평균체중의 차이는 표 1의 값을 넘지 않도록 한다.

표 1. 실험쥐의 체중 등급

실험동물	체중 범위, g	성별에 따른 체중의 최대 차이, g
생쥐	10 ~ 25	3
시궁쥐	150 ~ 400	50
곰쥐	100 ~ 200	33

2.3 실험공간

- (1) 동물실험은 실험 사육장에서 수행한다.
 - ① 금속제 쥐 사육상은 생쥐의 경우 최소 $270 \times 220 \times 130 \text{ mm}^3$, 쥐의 경우

420 × 260 × 180 mm³ 정도 되어야 한다.

- ② 이들 쥐 사육상은 선반에 놓아둔다.
- ③ 쥐 사육상에 금속망사를 설치해 배설물이나 오줌이 통과할 수 있도록 한다.
- ④ 쥐 사육상 밑에 상자 또는 다른 장비를 설치하여 사료용기에서 떨어진 사료를 회수하고 나서 그 무게를 측정한다. 정확한 섭취량을 측정하기 위하여 먹지 않고 남은 먹이에 보탠 다음 원래 공급한 먹이 무게에서 이를 빼준다. 떨어진 사료가 축축하면 무게를 달기 전에 원래의 수분함량으로 건조한다.
- ⑤ 물은 원하는 만큼 공급한다. 쥐 사육용 유리 물병 또는 물 자동공급장치를 사용한다.

2.4 동물용 시설

- (1) 동물과 관련한 정밀한 물리적 요구조건을 모두 구비할 필요는 없으나, 동물용 시설은 법 또는 법규가 요구하는 기준에 부합하여야 한다.
- (2) 온도는 20±2℃를 유지하여야 하며, 쥐 및 생쥐 사육용 권장 상대습도는 50~60% 이다.
- (3) 난방기 또는 공조기의 강한 기류가 직접 실험동물에게 향하지 않도록 한다.
- (4) 창문을 통한 자연채광이 바람직하나, 인공채광도 이용할 수 있다. 인공채광은 낮과 밤의 길이가 자연조건과 잘 부합되게 하거나, 12~16 시간의 광주기로 설정한다. 인공채광은 백열등 또는 형광등을 이용한다.
- (5) 실험 중의 동물은 소음이나 인간의 활동(예를 들면, 움직임)에 의한 과도한 또는 불필요한 스트레스를 받지 않도록 한다.

2.5 먹이

- (1) 먹이는 실험쥐들이 잘 수용하여야 한다. 식감이 결여된 먹이는 통상 사망률이 낮기 때문에, 쥐에 의한 먹이의 수용은 시험에 있어서 필수 부분이다.
- (2) 이상한 냄새 또는 방향으로 인하여 먹이를 오염시킬 수 있는 휘발성 화합물의 오염 가능성이 있는 곳에 먹이를 보관하지 않도록 한다.

2.6 실내 적응

- (1) 쥐 사육상에 1마리씩 넣어 둔다.

- (2) 야외에서 채집한 쥐의 경우, 실험 대기기간 중의 마지막 7일간은 실제로 실험이 수행될 실험실과 비교할 수 있는 실내조건(즉, 온도, 습도, 광 등) 하에 두어야 한다.
- (3) 적응기간 동안 사료용기에 시판용 쥐 사료를 매일 섭취하는 양보다 많이 공급한다. 각각의 동물의 기본 섭취량을 설정하기 위하여 이 기간 동안 사료의 섭취량 및 물 소비량을 측정하고 기록한다. 정상적으로 사료를 먹지 않거나 물을 마시지 않은 쥐들은 실험군 또는 대조군에서 제외시킨다.

2.7 실험절차

- (가) 실험동물들에게 심사약제만을 먹이로 제공한다. 각 사육상마다 하나의 사료용기에 충분한 양을 공급한다.
- (나) 섭취위치에 의한 편차를 줄이기 위해, 일단 동물을 쥐 사육상 및 선반위의 쥐 사육상에 놓으면, 실험기간 동안 실험실내의 쥐 사육상 및 선반의 위치를 바꾸지 않도록 한다.
- (다) 실험동물의 일일섭식량을 측정한다. 이 때 사료용기 및 먹이는 매일 새롭게 공급한다. 물은 쥐 사육용 유리 물병 또는 물 자동공급장치를 사용하여 원하는 만큼 공급한다.
- (라) 대조군의 동물들에게 예비실험, 실험 및 실험 후 관찰기간동안 전체를 통틀어 시판용 쥐 사료를 공급한다.
- (마) 실험동물의 사망일자 및 사망 시의 체중을 기록한다. 또한 관찰기간 동안 살아남은 모든 실험동물의 체중을 기록한다.
- (바) 실험기간은 표 2와 같다. 제시된 기간은 심사약제의 특정한 작용방식을 입증하기 위해 단축될 수 있으며, 관찰기간은 최소한의 기간으로서, 상황에 따라 연장될 수 있다.

표 2. 실험기간

약제 유형	쥐의 종류	순화기간	공복기간	노출기간	관찰기간
만성살서제	생쥐	7일 정도	제외	20일	14일
	시궁쥐	7일 정도	제외	10일	14일
	곰쥐	7일 정도	제외	14일	14일
급성살서제	생쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일
	시궁쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일
	곰쥐	7일 정도	하룻밤	1일	7일

2.8 효과 판정

- (1) 대조군의 사망율이 10%를 초과하면, 시험군에서의 사망율과는 관계없이 실험 그 자체를 무효로 하고 다시 실험한다.
- (2) 시험약제가 시궁쥐, 곰쥐 또는 생쥐에 대해 90% 또는 그 이상의 사망률을 보여야 유효한 것으로 평가한다. 단, 급성살서제의 경우에는 시험약제의 섭취 후 2일 이내에 90% 이상의 사망률을 보여야 한다.
- (3) 시험약제가 2 종 또는 그 이상의 가주성 쥐류를 구제하고자 하는 경우, 2 종 또는 3 종 가운데서 어느 1 종에 대한 사망률은 80% 이상이고, 나머지 종에 대해서는 90% 이상의 사망률을 충족하여야 한다.

2.9 보고서

보고서는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

- (1) 실험동물의 종류, 출처, 성 및 실험 개시 때의 체중과 같은 기본 정보.
- (2) 독성물질, 농도, 비활성성분 및 입자크기 등에 관련된 정보.
- (3) 각 실험동물의 섭취량.
- (4) 각 실험동물의 사망일자 및 사망 시의 체중, 노출기간 및 관찰기간 중에 생존한 동물의 체중.
- (5) 이상하거나 자연스럽지 않은 행동양식.
- (6) 본 시험법에서 벗어난 변이 또는 시험기간의 길이, 온도, 먹이 등과 같은 특별한 조건을 명시하고 입증하여야 한다.

<보고서의 예시>

1 시험기관 :

2 심사제품

가) 제품명 :

나) 배치번호 :

다) 제조업자 :

라) 출하일자 :

마) 보관조건 :

바) 유효성분 및 농도 :

사) 비활성성분 :

아) 입자크기 :

3 실험동물

가) 종류 : (생쥐, 시궁쥐, 곰쥐)

나) 출처 :

다) 수 및 성별 : (암컷 5마리, 수컷 5마리)

라) 시험 개시 때의 체중 : (g)

4 실험조건

가) 실험공간의 종류 및 크기 : (케이지)

나) 실험의 종류 : (강제실험)

다) 작용방식 : (만성독물)

5 공복기간 : (시간단위로)

6 음료 및 사료

가) 음료 : (원하는 만큼)

나) 사료 : (밀)

7 사용

가) 혼합비 : (살서제:떡이)

나) 사용한 미끼 :

- 다) 시작시기 :
- 라) 노출기간 :
- 마) 관찰기간 :
- 8 제공량
 - 가) 사료 : (g)
 - 나) 제품 : (g)
- 9 날짜별 검사 :
- 10 섭취량
 - 가) 사료 :
 - 나) 제품 :
- 11 사망수 및 병든 수 :
- 12 비고 : 체중
- 13 시험결과
- 14 결론
- 15 장소, 날짜, 서명

III. 저항성 시험법

야외 개체군의 경우 살충제에 대한 저항성 발달로 실제 방제에 있어서 실패하는 경우가 일어날 수 있다. 따라서 살충제의 효력시험에서는 실험곤충에 대하여 살충제에 대한 저항성을 시험할 필요가 있다. 다음은 모기, 파리 및 바퀴의 성충에 대한 살충성분의 저항성 시험에 가장 보편적으로 이용되고 있는 미량국소처리법, 침지처리법 및 배지혼입법 등에 대하여 기술한다.

가. 미량국소처리법(Topical application method)

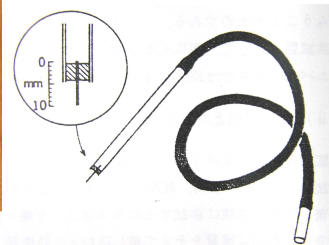
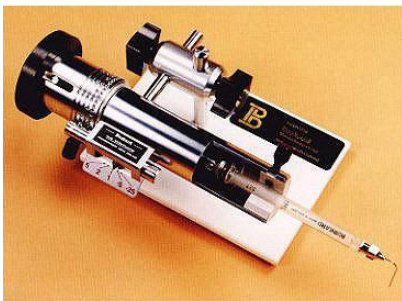
개 요 : 속효성 약제의 살충원제를 용매에 녹여 일정량을 미량국소처리기로 곤충체의 일부에 점적, 부착시키는 방법으로 반수치사약량(median lethal dose, LD₅₀)을 구한다. 위생해충의 성충에 대한 살충성분의 효력 평가라든가 저항성 시험에 가장 보편적으로 이용되고 있다.

대상곤충 : 모기, 파리 및 바퀴 등의 성충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 수동식 미량국소처리기(hand microapplicator) 또는 자동식 미량국소처리기(automatic microapplicator)를 이용하며, 미량국소처리기가 없는 경우에는 1ml 용량의 미량 주사기(microsyringe)를 이용할 수 있다.



- 스테인레스 또는 철사를 이용하여 프레임(30 x 30 x 30 cm³)을 제작한 망

- 사를 씌운 사육상
- 냉장고(4℃)
- 항온항습기(온도 25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실
- 분석용 저울
- 증류수 제조장치
- 탄산가스 통
- 초자 및 재료
 - 실험곤충 보관용 종이컵 또는 비닐컵(지름 9 cm, 높이 15 cm)
 - 500ml 삼각플라스크
 - 10ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 에테르
 - 아세톤
 - 10% 설탕물
 - 비닐봉지(사육용기가 충분히 들어갈 수 있는 크기)
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 검체(살충제)를 아세톤에 희석하여 1% 농도가 되도록 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<실험곤충 준비>

- ② 실험곤충 준비
 - 모기 : 표준감수성 계통, 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.
 - 파리 : 표준감수성 계통(예를 들면 SRS 계통, CSMA 계통) 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.
 - 바퀴 : 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 암컷성충.

<노출실험>

- ③ 먼저 예비시험을 실시한다. 1% 시험액을 아세톤으로 10배 희석하여 0.1% 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만

든다.

- ④ 실험곤충 사육상을 적당한 크기의 비닐봉지 안에 넣은 후 에테르 또는 탄산가스를 사용하여, 실험곤충이 치사되지 않도록 적정시간 노출시켜 마취한다. 마취된 실험곤충을 500ml 삼각플라스크에 담는다. 실험 도중에 마취에서 깨어나면 다시 마취시킨다.
- ⑤ 마취된 실험곤충 암컷 25마리를 여지 위에 일렬로 배치한다.
- ⑥ 농도별로 준비된 살충제 희석액을 미량국소처리기에 취한 다음 (집)파리의 암컷 흉부배면에 $0.5\mu\text{l}$ 를 점적한다(모기 및 바퀴의 경우, 암컷의 흉부복면에 각각 $0.25\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$ 를 점적). 이때 대조군은 아세톤만을 처리하며, 대조군을 가장 먼저 실시하고 낮은 농도부터 실험곤충에 처리, 3 반복으로 실시한다. (주의 : 아세톤은 휘발성이 강해 실험곤충의 점적 시간이 늦어지면 주사기에서 나오는 약량이 적어진다. 그 때는 미량국소처리기의 핸들을 돌려 휘발된 바늘끝 약액을 제거하고 새로 나오는 약제에 실험곤충을 점적시킨다)
- ⑦ 처리 24시간 후 예비실험 결과를 조사하여 0%에서 100%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하고, 총 5 구간의 본 시험구간을 설정한다.
- ⑧ 본 실험은 예비실험과 마찬가지로 대조군을 먼저 실시하고 실험곤충에 제시된 약량으로 처리, 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑨ 벽이로서 10% 설탕물을 탈지면에 흡수시킨 후, 약제농도가 기록된 청결한 종이컵(모기의 경우) 또는 비닐컵(파리, 바퀴의 경우)의 벽면에 붙이고, 점적된 실험곤충을 컵에 넣고 망사를 씌운다. 그리고 환기가 잘 되는 장소에 놓고 마취에서 깨어나도록 도움을 준다. 모기의 경우 비닐컵에 넣으면 정전기로 인하여 벽면에 달라붙는 경우가 있다.
- ⑩ 모든 실험이 끝나면 항온항습기(온도 25℃, 상대습도 75± 5%) 또는 항온실로 옮긴다.

<실험결과>

- ⑪ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 가볍게 컵을 흔들어 확인하며 전혀 움직임이 없거나 경미한 움직임 또는 뒤집어서 이동이 거의 불가능한 곤충은 죽은 것으로 간주한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정 살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 다시 실험한다.
- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수치사약량(LD₅₀) 또는 95%(LD₉₅)나 99%(LD₉₉) 치사약량 및 95% 신뢰한계를 구한다. 표시단위는 실험목적에 따라 약량(μ g)/개체 또는 약량(mg)/체중(g) 등으로 나타낸다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종성충에 대한 LD}_{50}\text{값}}{\text{감수성계통성충에 대한 LD}_{50}\text{값}}$$

[실험예]

1. 빨간집모기 감수성 계통과 야외 채집종의 암컷성충에 살충원제 A를 약량별로 처리하였을 때 다음과 같은 성적을 얻었다.

실험충	농도	마리수	살충율
-----	----	-----	-----

감수성 계통

무처리

야외 채집종

무처리

2. 보정살충율을 구한다.
3. Probit analysis 프로그램을 이용하여 반수치사약량(LD₅₀) 및 95% 신뢰한계를 구한다.
4. 저항성비를 구한다.

나. 침지처리법(Immersion test)

개 요 : 주로 모기유충에 대한 속효성 유기합성살충제, 곤충생장조절제와 같은 지효

성 유기합성살충제, 또는 미생물 살충제의 효력시험 및 저항성 평가의 목적에 이용되고 있는 생물검정법이다. 시험액으로서 살충원제의 에탄올용액 또는 유제(乳劑), 유제(油劑), 수화제 등의 제제에 대해서 실시할 수 있다.

대상해충 : 모기 3령 유충 등

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재
 - 냉장고(4℃).
 - 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)
 - 분석용 저울
 - 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 300ml 종이컵, 플라스틱컵 또는 비이커
 - 피펫(선단을 약간 넓힌 것이 편리)
 - 10ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 100ml, 500ml 메스실린더
 - 25ml 종이컵, 플라스틱컵 또는 비이커(이하 유충컵으로 표시)
 - 에탄올
 - 계면활성제 Triton-X 100
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
 - 라벨

[1] 속효성 합성살충제

<시험액 준비>

- ① 살충제를 에탄올에 희석하여 1% 농도의 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<모기유충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대

이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 위해 희석액을 만든다. 1% 시험액을 에탄올로 10배 희석하여 0.1% 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만든다.
- ④ 살충원제를 물에 잘 용해되도록 하기 위해 만든 1% Triton-X 100 수용액 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제 희석액 1ml씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준 다음 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어준다. 대조군은 1% Triton-X 100 수용액 230ml에 에탄올을 1ml를 첨가한다.
- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑥ 처리 24시간 후 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도 간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑦ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 종이컵 또는 비이커(300ml)에 상기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.
- ⑧ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 실험은 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑨ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.

<시험결과>

- ⑩ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 용기 바닥에 가라앉아 부상하지 않는 빈사상태의 유충은 죽은 것으로 한다. 생사의 판정에는 침금 등을 이용한다.
- ⑪ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율}(\%) = \frac{\text{실험군의치사율}(\%) - \text{대조군의치사율}(\%)}{100 - \text{대조군의치사율}(\%)} \times 100$$

- ⑫ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 다시 실험한다.

⑬ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀) 또는 95%(LC₉₅)나 99%(LC₉₉) 치사농도 및 95% 신뢰한계를 구한다.

⑭ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에대한LC}_{50}\text{값}}{\text{감수성계통유충에대한LC}_{50}\text{값}}$$

[실험예]

침지처리법의 실험예는 다음과 같은 방식으로 진행된다.

1. 빨간집모기 감수성 계통과 야외 채집종의 3령 유충에 살충제 A 10% 유제(乳劑)를 농도별로 처리하였을 때 다음과 같은 성적을 얻었다.
2. 보정살충율을 구한다.
3. Probit analysis 프로그램을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀) 및 95% 신뢰한계를 구한다.
4. 저항성비를 구한다.

[2] 지효성 합성살충제

<시험액 준비>

- ① 생장조절제를 에탄올에 희석하여 1% 농도의 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<모기유충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 실시한다. 1% 시험액을 에탄올로 희석하여 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, 0.01ppm, 0.001 ppm의 시험액을 만든다.
- ④ 생장조절제의 원제를 물에 잘 용해되도록 하기 위해 만든 1% Triton-X 100 수용액 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제

희석액 1ml 씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준다. 대조군은 1% Triton-X 100 수용액 230ml에 에탄올을 1ml를 첨가한다.

- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 일정기간 방치한다. 2일 간격으로 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다. 3반복으로 실시한다.
- ⑥ 시험 후 24시간 마다 치사된 유충 수, 용화된 번데기 수, 치사된 번데기 수를 기록한다. 유충이 모두 치사될 때까지 확인한다.
- ⑦ 번데기를 끄집어내어 별도의 깨끗한 컵이나 비이커에 옮긴 다음 우화수를 기록한다.
- ⑧ 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 우화율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑨ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 컵 또는 비이커(300ml)에 상기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.
- ⑩ 상기 컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 실험은 최소 3반복으로 실시한다.
- ⑪ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴 다음 2일 간격으로 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.
- ⑫ 시험 후 24시간 마다 치사된 유충 수, 용화된 번데기 수, 치사된 번데기 수를 기록한다. 유충이 모두 치사될 때까지 확인한다.
- ⑬ 번데기를 끄집어내어 별도의 깨끗한 컵이나 비이커에 옮긴 다음 우화수를 기록한다.

<시험결과>

- ⑭ 대조군의 유충 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.
용화율, 우화율에 대해 각각 반수유효약량(Effective Dose, ED₅₀) 및 우화억제율(emergence inhibition, IE)을 구한다.

$$\text{우화억제율 } IE(\%) = 100 - \left(\frac{T \times 100}{C} \right)$$

T = 처리군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

- ⑮ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수유효약량(ED₅₀) 또는 95%(ED₉₅)나 99%(ED₉₉) 유효약량 및

95% 신뢰한계를 구한다.

⑩ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에대한}ED_{50}\text{값}}{\text{감수성계통유충에대한}ED_{50}\text{값}}$$

[3] 미생물 살충제

<시험액 준비>

- ① 박테리아성 살유충제의 성분함량(%)을 고려하여 수돗물 또는 증류수에 1% 용액이 되도록 희석하여 시험액을 만든다. 박테리아성 살유충제는 물에 희석할 경우 변성되기 쉬우므로 실험할 때마다 시험액을 새로 제작한다.

<실험곤충 준비>

- ② 표준감수성 계통 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 모기 3령 유충을 피펫에 취하여 25ml 유충컵에 25마리씩 넣고 증류수 또는 수돗물로 20ml로 맞춘다. 3령 유충을 사용할 경우 침지시험 중에 번데기가 나오지 않는다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 한다. 1% 시험액을 증류수 또는 수돗물로 10배로 희석하여 0.1% 시험액 10ml를 만들고, 같은 방법으로 0.001%, 0.0001%, 0.00001%의 시험액을 만든다.
- ④ 증류수 또는 수돗물 230ml를 종이컵 또는 비이커(300ml)에 넣은 다음 상기 살충제 희석액 1ml 씩을 넣고 고루 섞이도록 잘 저어준다. 대조군은 증류수 또는 수돗물 230ml에 물 1ml를 첨가한다.
- ⑤ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml로 한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑥ 처리 24시간 후 예비실험 결과에 따라 10~90%의 치사율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 침지용 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑦ 18개(실험군 15개, 대조군 3개)의 종이컵 또는 비이커(300ml)에 상기 5단계 희석액을 ④항과 같이 처리한다.
- ⑧ 상기 종이컵 또는 비이커에 ②항의 3령 유충 25마리를 넣어 주어 총 250ml

로 한다. 실험은 최소 3 반복으로 실시한다.

- ⑨ 모든 실험이 끝나면 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)로 옮긴다.
- ⑩ 10mg/L의 농도로 먹이를 넣어 준다.

<시험결과>

- ⑪ 24시간 후에 살충율을 조사하고, 각 농도마다의 평균 살충율을 산출한다. 용기 바닥에 가라앉아 부상하지 않는 빈사상태의 유충은 죽은 것으로 한다. 생사의 판정에는 침침 등을 이용한다.
- ⑫ 대조군에서 죽은 개체가 보일 경우 Abbott 공식을 이용하여 보정살충율을 구한다.

$$\text{보정살충율(\%)} = \frac{\text{실험군의치사율(\%)} - \text{대조군의치사율(\%)}}{100 - \text{대조군의치사율(\%)}} \times 100$$

- ⑬ 대조군의 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.
- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀) 또는 95%(LC₉₅)나 99%(LC₉₉) 치사농도 및 95% 신뢰한계를 구한다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에대한LC}_{50}\text{값}}{\text{감수성계통유충에대한LC}_{50}\text{값}}$$

다. 배지혼입법

개 요 : 파리유충의 사육배지에 곤충생장조절제와 같은 지효성 유기합성살충제를 혼입해서 우화율까지 조사함으로써 살충효력을 보는 방법으로 저항성 평가의 목적에도 이용되고 있다. 시험액으로서 살충원제의 에탄올 용액, 유제(乳劑), 유제(油劑), 수화제, 분제 등 각종 제제에 대해서 실시할 수 있다.

대상해충 : 파리 2령 유충

시험과정

<준비물>

- 장비 및 시험기자재

- 냉장고(4℃).
- 항온항습기(25℃) 또는 항온실(25℃)
- 분석용 저울(실험약제 측정용) 및 일반저울(떡이 측정용)
- 증류수 제조장치
- 초자 및 재료
 - 원통형 유리용기(지름 9cm, 높이 6cm)
 - 10 ml 시험관(뚜껑을 돌려서 막을 수 있는 형태)
 - 에탄올
 - 계면활성제 Triton-X 100
 - 증류수 또는 2~3일 이상 방치한 수돗물(수돗물에는 소독용 염소가 함유되어 있어 살충제의 종류에 따라서는 분해되는 경우가 있다.)
 - 라벨

<시험액 준비>

- ① 성장조절제를 에탄올로 희석하여 1% 시험액 5ml를 만든다. 시험액을 10ml 시험관에 넣고 용매가 증발하지 않도록 마개를 한 다음 4℃ 냉장고에 보관한다.

<파리유충 준비>

- ② 표준감수성 계통(SRS 계통 또는 CSMA 계통) 또는 실험실 계통 및 야외 채집종 또는 누대사육 5세대 이하의 파리 2령 유충을 50마리씩 용기에 담아 총 실험구간에 맞춰 준비한다.

<노출실험>

- ③ 1차로 예비실험을 실시한다. 1% 시험액을 에탄올로 희석하여 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, 0.01ppm, 0.001ppm의 시험액을 만든다.
- ④ 떡이 50g을 달아 시험구간과 반복시험 수에 따라 유리용기에 담아 둔다.
- ⑤ 증류수 50ml에 성장조절제 5개 희석액 1ml 씩을 첨가하고 떡이 50g에 넣어 둔 다음 고루 섞이도록 잘 혼합한다. 대조군은 에탄올 1ml를 넣어준다.
- ⑥ 상기 떡이에 파리유충 50마리씩을 넣고 유충이 기어 나오지 못하도록 유리용기에 망을 씌워둔 다음 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)에 7일간 방치한다. 3 반복으로 실시한다.
- ⑦ 7일 후에 번데기를 끄집어내어 그 수를 기록하고, 번데기를 별도의 깨끗한

용기에 옮긴 다음 7일 후에 우화수를 기록한다.

- ⑧ 예비실험 결과를 조사하여 10~90%의 우화율을 보이는 구간을 세분화하여 총 5구간의 본 시험구간을 설정한다. 희석액의 농도간격은 2배씩을 취하는 것이 보통이나 약제의 특성 또는 기타 이유로 간격을 좁히고 싶을 때는 1.4를 곱한 농도 간격으로 한다.
- ⑨ 18개의 유리용기(실험군 15개, 대조군 3개)에 떡이 50g을 담아 둔 다음 상기 5단계 희석액을 ⑤항과 같이 처리한다.
- ⑩ 상기 약제 처리된 떡이에 파리유충 50마리씩을 넣고 유충이 기어 나오지 못하도록 유리용기에 망을 씌워둔 다음 항온기(25℃) 또는 항온실(25℃)에 7일간 방치한다. 실험은 최소 3 반복으로 실시한다.
- ⑪ 7일 후에 번데기를 끄집어내어 그 수를 기록하고, 번데기를 별도의 깨끗한 페트리디쉬에 옮긴 다음 7일 후에 우화수를 기록한다.

<시험결과>

- ⑫ 대조군의 유충 치사율이 10% 이상인 경우에는 재 실험한다.
- ⑬ 용화율, 우화율에 대해 각각 반수유효약량(Effective Dose, ED₅₀) 및 우화억제율(emergence inhibition, IE)을 구한다.

$$\text{우화억제율 } IE(\%) = 100 - \left(\frac{T \times 100}{C} \right)$$

T = 처리군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%) 또는 우화율(%)

- ⑭ 각 시험 목적에 맞게 Probit analysis 프로그램(SAS 또는 SPSS 등)을 이용하여 반수유효약량(ED₅₀) 또는 95%(ED₉₅)나 99%(ED₉₉) 유효약량 및 95% 신뢰한계를 구한다.
- ⑮ 저항성비(resistance ratio)를 구한다.

$$\text{저항성비} = \frac{\text{야외채집종유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}{\text{감수성계통유충에 대한 } ED_{50} \text{ 값}}$$