

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “이산화염소를 활용한 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 경구 조성물 및 다목적 살균 소독기 개발과 현장 적용 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 1 월 20 일

주관연구기관명 : (주)케모피아

주관연구책임자 : 조 정 혁

세부연구책임자 : 조 정 혁

연 구 원 : 신 용 재

연 구 원 : 이 해 준

연 구 원 : 김 영 하

연 구 원 : 유 미 선

연 구 원 : 노 진 형

협동연구기관명 : 농림축산검역본부

협동연구책임자 : 강 승 원

요 약 문

I. 제 목

이산화염소를 활용한 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 경구 조성물 및 다목적 살균 소독기 개발과 현장 적용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 토종별의 집단 폐사를 일으키는 가장 난치성의 아시아형 낭충봉아부패병을 효과적으로 예방하는 방법을 개발하여 농가에 보급 상용화 하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

이산화염소를 활용한 국내 토종별에 만연되어 있는 아시아형 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 경구 조성물 개발
이산화염소를 활용한 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 신속, 서방형 (slow-releasing) 검용 소독기 개발
개발 제품의 현장 적용 시험 및 상용화

IV. 연구개발결과

- 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 경구 조성물 개발
- 이산화염소 100 ppm 50% 설탕물 투여 부패병 예방 치료 효과 확인
- 이산화염소를 활용한 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 신속, 서방형 (slow-releasing) 검용 소독기 개발
- Dual Type, Single Type 신속 서방형 검용 저가 소독기 Kit 개발
- 소독기: Dual Type 과 Single Type 공히 투입 농도, 시간 매뉴얼 도출
- 개발 제품의 현장 적용 시험 및 상용화
- 경구용 및 소독기: 경제성 및 상온 안정성, 생체 안전성(무독성) 확인
 - 경구용: 즉시 판매
 - 소독기: 별통 소독기로서 즉시 판매
 - 부패병 예방제로서 품목허가 신청

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 이산화염소 활용, 화장실 등 탈취제, 냉장고 탈취, 축산 시설 살균 탈취 즉시 활용 가능
- 이산화염소 제제 및 소독기의 동물용 의약외품 활용에 크게 기여, 조류독감, 구제역 등

SUMMARY

I. Subject

Development & On-Site Assessment of Oral Preventive and Therapeutic Agent and Multi-Purpose Disinfection Kit against Sacbrood Virus Disease of Honeybees using Chlorine Dioxide

II. Purpose & Necessity of Research and Development

The purpose and Necessity of this R&D is to develop and on-Site assessment of oral Preventive and therapeutic Agent and Multi-Purpose disinfection kit against Sacbrood Virus disease of honeybees using chlorine dioxide and to commercialize of developed agent as well as disinfection kit.

III. Contents & Scope of Research and Development

Development & On-Site Assessment of Oral Preventive and Therapeutic Agent against Sacbrood Virus Disease of Honeybees using Chlorine Dioxide

Development & On-Site Assessment Multi-Purpose Disinfection Kit against Sacbrood Virus Disease of Honeybees using Chlorine Dioxide

IV. Results of Research and Development

Development & On-Site Assessment of Oral Preventive and Therapeutic Agent against Sacbrood Virus Disease : Chlorine Dioxide aqueous solution

Development & On-Site Assessment Multi-Purpose Disinfection Kit against Sacbrood Virus Disease : Chlorine Dioxide fast & slow-releasing Kit

V. Further Application of Research and Development

Sanitizing agent for the animals and live-stock related facilities
Deodorizing agent for the household and living space

CONTENTS

I. Introduction-----	6
II. Status of Research and Development-----	31
III. Contents and Results of Research and Development-----	45
IV. Achievements and Contributions of Research and Development--	99
V. Application of Research and Development-----	100
VI. References-----	101

목 차

I. 연구개발과제의 개요-----	6
II. 국내외 기술 개발 현황-----	31
III. 연구 개발 수행 내용 및 결과-----	45
IV. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	99
V. 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	100
VI. 참고문헌-----	101

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구 개발의 목적

◆본 연구의 목적은 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 가장 난치성의 아시아형 낭충봉아부패병을 효과적으로 예방하는 방법을 개발하여 농가에 보급 상용화 하는데 그 목적이 있다.

◆낭충봉아부패병 바이러스 질병의 발생정도에 따른 올바른 방제법의 수립과 질병의 예방을 위하여, 가장 친환경적이고 효능이 우수한 살 바이러스제인 이산화염소를 활용하여, 경구용 예방제제 및 소독 Kit를 개발하여, 토종벌 농가의 소득증대를 도모하려 한다.

◆낭충봉아부패병이 농가에 심각한 타격을 준 지 3년이 지났다. 하지만 이 병은 농가들이 쉬쉬하는 가운데 빠르게 확산돼 토종벌의 씨가 말라가고 있다. 이미 상당수의 토종벌 농가들은 벌 치는 일을 접거나 업종을 전환했다

◆농가 초토화=2007년쯤 발견된 것으로 알려진 낭충봉아부패병은 2010년 전국으로 확산되면서 토종벌 농가를 ‘초토화’ 시켰다. 농가들은 치료약제 개발과 예방책 마련을 요구했지만 개선은커녕 더 심각해지는 양상이다. 김춘일 (사)한국한봉협회 부회장은 “정확한 통계는 잡히지 않지만 현재 토종벌은 고작 1% 정도만 남았을 정도로 심각한 상황이다” 고 진단했다. 그는 2009년까지만 해도 800군의 토종벌에서 연간 5억원 안팎의 매출을 올렸지만 지금은 3군만 남아 건질 게 없다고 말했다.



▲ 전남 곡성의 한 토봉농가에서 꿀벌들이 낭충봉아부패병에 감염된 애벌레를 벌통에서 빼내고 있다. 바이러스에 감염된 애벌레는 일벌 10만 마리를 감염시킬 정도로 전염 속도가 빠르다.

◆최근 낭충봉아부패병이 유행했고 효과적인 방제 수단의 부재로 인해 전국적으로 토종벌 농가는 1/20 정도 수준으로 격감한 실정이다.

◆농민들은 낭충봉아부패병으로 인한 피해액이 1700억원에 달한다며 지난해 1500여농가가 정부를 상대로 600억원대의 소송을 제기, 현재 항소가 진행중이다. 농민들은 이대로 가면 토종벌을 ‘천연기념물’로 지정해야 할지도 모른다고 우려한다.



▲ 낭충봉아부패병에 걸려 벌이 사라진 벌집



▲ 죽은 애벌레의 무덤이 된 벌집

◆농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 .

◆농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 . 현재까지 농가가 예방을 위해 취하는 방법은 감염봉군은 철저히 격리하여 소각 하고 더 이상 감염원으로 작용하지 않도록 하며 건강봉군에 대해서는 질병확산 방지를 위해 건강봉군들 주변과 벌통 바깥 및 봉기구들에 소독약을 매일 뿌리고, 꿀벌에게 사료용 비타민, 미네랄 합제, 프로폴리스 등을 설탕물이나 꿀물에 타서 벌에게 직접 분무하여 영양을 충분히 급여해주는 정도이다.

◆농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 . 그리고 세균의 2차 감염 방지를 위해 사료용 항생제 테라마이신(옥시테트라싸이클린) 등을 먹이에 뿌려 준다. 일부 양봉 농가들은 죽 발효액을 예방용 소독약 및 치료용 사양액으로 사용하여 효과를 보았다는 예가 있다.

◆농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 . 이러한 낭충봉아부패병 바이러스에 대한 양봉농가의 방제 방법은 농가마다 각기 독특한 방법으로서의 방제가 이루어지고 있으며 이런 이유로 올바르지 못한 방법으로서의 방제가 이루어지면서 꿀을 포함한 양봉산물에의 항생제 잔류와 같은 문제점이 일어나게 된다.

◆농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 . 따라서 본 연구에서는 이러한 꿀벌 낭충봉아부패병 바이러스 질병의 발생정도에 따른 올바른 방제법의 수립과 질병의 예방을 위하여, 가장 친환경적이고 효능이 우수한 살 바이러스제인 이산화염소를 활용하여, 경구용 예방제제 및 소독 Kit를 개발하여, 토종벌 농가의 복원과 소득 증대 나아가서 국민 건강 도모하려 한다.

제 2 절 연구 개발의 필요성

- ◆ **낭충 봉아 부패병은 꿀벌의 애벌레가 번데기로 변태되기 전에 말라죽게 하는 바이러스성 질병으로, 최근 전국적으로 발생해 토종벌의 95% 이상을 폐사시키고 있다.**
- ◆ **사전(예비) 연구:**
 - **꿀벌 애벌레의 실험실내 인공배양 기술 확립과 배양된 애벌레를 이용한 질병 원인바이러스 배양증식시험, 그리고 이 시스템을 이용한 낭충봉아부패병 치료후보물질의 성공적인 효능검증 확인**
 - **애벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 접종 후 치료제인 이산화염소를 처리하여 효과 실험 실시 결과 대조군인 바이러스 접종군보다 생존율이 높았고 생존기간도 길었음**
- 실() **낭충봉아부패병 바이러스 효과가 확인됨**
- ◆ **사전 연구에 뒤이어 꿀벌 자체에 대한 이산화 염소 제제의 효능 시험 실시 필요**
- ◆ **현재 사용중인 약제 거의 없는 실정, 일부 사용되는 약제 효능 미약, 독성 심각**
 - 여왕벌 격리 또는 벌통 개조 등의 소극적 대처는 효과가 거의 없음
 - 티몰(thymol) : 페놀계, 환경독성물질, 자극(피부, 눈, 허파), 구토, 설사, 어지럼증, 두통을 일으키며, 강한 피부 자극감이 있음
 - 비타민, 미네랄 합제, 프로폴리스, 산양삼, 은나노 : 효과 거의 없음
 - 화분과 면역증강제를 혼합한 당액을 투여하는 등의 방식: 효과 과학적 검증 않됨
 - RNA Interference vaccine: 연구 개발 단계
- ◆ **이산화 염소 의 장점 (첨부 사전 연구 내용 참조)**
 - 인체 무해(작용 후 즉시 소멸), 환경 친화 (소독 부산물 무생성)
 - 저농도 사용으로 경제성 우수
 - 확산이 신속하여 타 소독제가 미치지 않는 공간 및 청결한 표면도 소독 가능
 - 낭충봉아부패병 바이러스 제거 효능 시험 완료
- ◆ **개발하려고 하는 신속, 서방형 겸용(Dual System) 이산화 염소발생기 의 장점**
 - 토종 벌통에 부착할 수 있는 중소형-별도의 중대형 발생기 불필요
 - 저렴한 재료로 제작-저가(low-cost)
 - 발생기 캡 조절 기능으로 이산화 염소 신속, 서방 겸용 발생가능
 - 사용 직전 분말 제제 (유기산과 고흡수성 수지 포함)를 액상 제제에 첨가하여 겔화시키는 방식으로 이산화염소 제제의 자연 분해없는 장기간 유통 보관 실현가능

1. 국내 양봉 산업 현황

국내 꿀벌 사육은 한봉, 토봉, 재래종 등으로 불리는 동양 꿀벌(*Apis cerana*)과 도입 100년이 된 서양 꿀벌(*A mellifera*)로 나눌 수 있다.

동·서양 꿀벌의 전체 농가 수는 2008년 34,102호로유지 되고 있으며, 토봉 사육 농가는 13,883호이고, 서양종 사육 농가는 20,219호이다.

꿀벌군수는 2005년 최대 2,089,762군으로 최대치를 보이다가 2008년 1,858,574군으로 매년 줄어들고 있으며, 농가당봉 군수는2008년을 기준으로 동양 종은 314,511군으로 농가당 227군을 보유하고 있는 반면에 서양종은 1,544,063군으로 농가당 764군을 사육하고 있다.

양봉 농가 수는 1989년도 52만으로 정점을 이루다가 1990년대 평균 42 만 명으로 줄어들었으며, 2005년 이후 평균 5%의 감소세를 보이면서 2008년 34 만 명으로 줄어들었으나,

농가당 소유 봉군 수는 약2.3%씩 꾸준히 증가하고 있다.

토종양봉은 대부분고정양봉이고 소규모이나, 서양종은 고정양봉이 12,671호이고 가구당51.3군이다.

국내 양봉의 꿀 생산액은 지난 20년간 3.2배 증가 한 2,259 억원이며, 세계 전체 봉군 수에서 11위권, 꿀 생산량은 15위권, 1봉군 당 생산량은21위권을 차지하고 있다.

2. 낭충 봉아 부패병(SBV)

“벌이 죽으면 사람도 죽는다.”

2010년 6~7월 강원도에서 토종벌의 폐죽음이 시작됐다. 이 여파로 2010년에만 국내 토종벌 약 31만 7000군(약 77억 마리)이 죽었다. 전체 토종벌의 76.7%에 달하는 수치다.

토종벌 집단 폐사의 원인은 꿀벌 전염병인 ‘낭충봉아부패병(SBV)’. 이 병에 걸린 꿀벌 유충은 번데기가 되지 못하고 죽는다.

꿀벌이 SBV에 감염되는 경로나 원인은 아직까지 정확히 밝혀진 게 없다. 일벌의 분비물이나 오염된 꽃가루를 통해 감염된다는 발표가 있지만 확실치는 않다.

SBV는 주로 봄에 발생한다. 그러다가 꽃에서 꿀이 분비되는 시기에 꿀벌이 영양분을 풍족해 섭취하면 바이러스가 세력을 잃는다. 학계에서는 SBV 발병이 영양

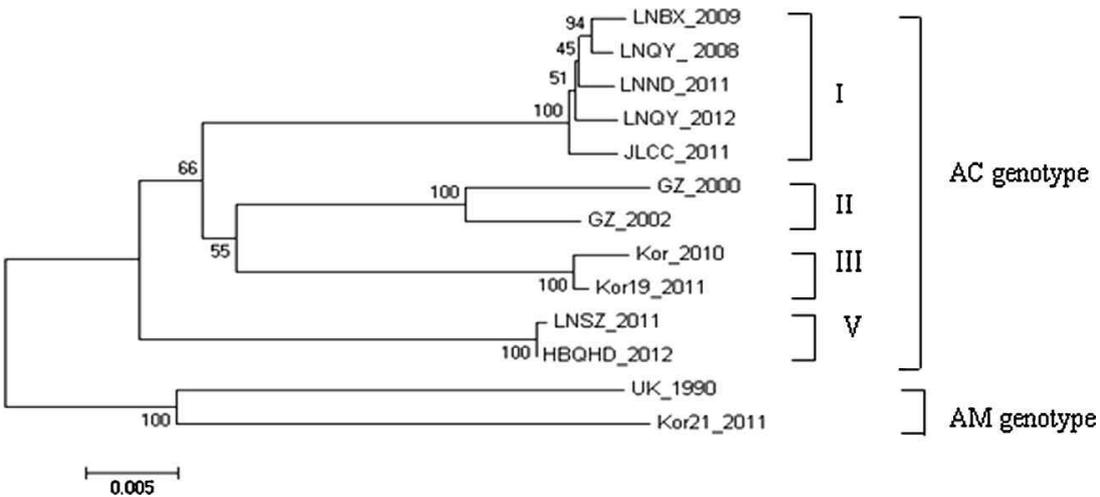
부족과 관계가 있을 것으로 보고 있다.

● 토종별이 걸리는 SBV는 동아시아 타입

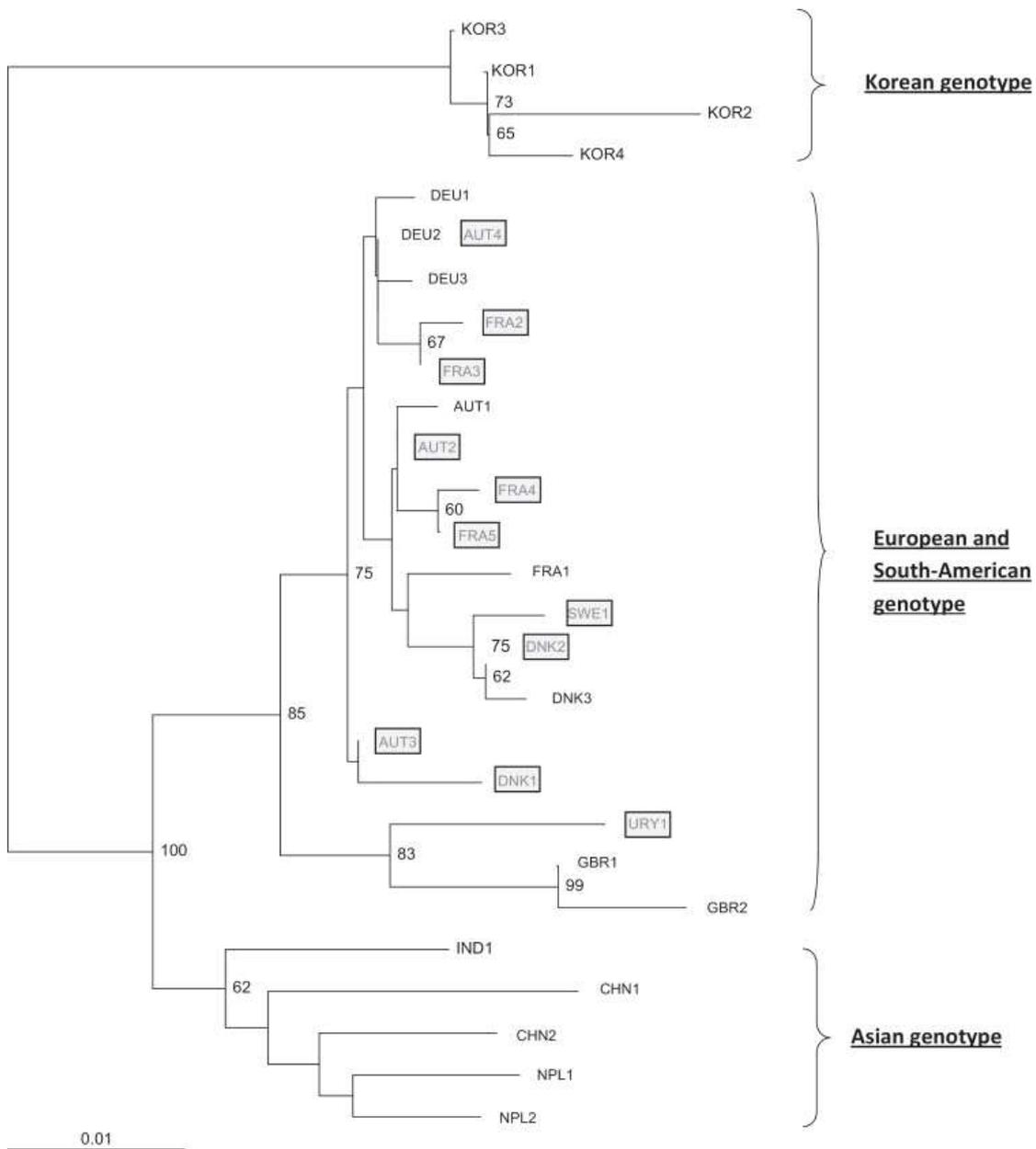
이 바이러스가 처음 발견된 것은 1964년이다. SBV는 신경세포 친화성 바이러스로 RNA(ssRNA)를 갖고 있다. 바이러스막이 없는 둥근 형태를 띠며, 지름이 28nm(나노미터 · 1nm는 10억분의 1m)에 달한다. 구조가 감기를 일으키는 리노바이러스와 비슷하다.

벌에 감염되는 바이러스인데도 같은 곤충인 누에 바이러스보다 포유류가 걸리는 ‘피코르나 바이러스’에 더 가깝다. 피코르나 바이러스는 구제역 바이러스 등이 속한 가장 단순하고 작은 종류의 바이러스를 말한다.

SBV에는 중부 유럽과 영국이 속한 유럽형, 타이SBV라고도 불리는 극동아시아형, 남아프리카 형 등이 세 가지 종류가 있다. 국내 토종별(Apis cerana)은 극동아시아형 SBV에 걸린다.



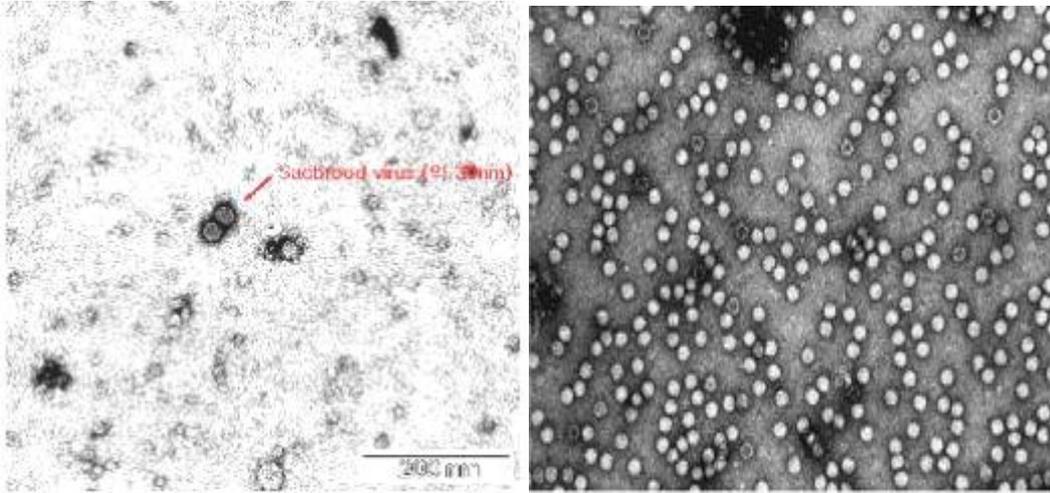
Phylogenetic analysis of VP1 nucleotide sequences of SBV isolates and related published sequences



Maximum likelihood phylogenetic tree of SBV sequences, based on a 429 bp segment of the N-terminal part of the SBV polyprotein

◇주요국 발생 시기

1967년 영국에서 발생 봉군 80%이상 감염되고 30%이상 폐사됐다 1980년대 : 중국, 태국, 인도 등에서 유행했다(아시아중) 1983~93년 호주에서 발생되기 시작했다



남충봉아부패병의 병원균 모양

●백신이나 치료제 없어, 예방이 최우선

SBV는 감염경로가 불분명해 현재까지 개발된 백신을 찾아보기 힘들다. 국립수의 과학검역원에서는 토봉 농가에 예방만이 최선이라고 당부하고 있다. SBV가 발견 되면 감염된 벌 군집과 벌집을 소각하고, 건강한 벌에게는 영양분을 충분히 공급해야 한다.

아시아 식량비료기술센터(FFTC)는 2주마다 벌집을 체크해 5~20%가 감염됐다면 새로운 여왕벌을 넣어주라고 권고한다. 건강한 새 여왕벌이 벌집에 들어온지 3주가 지나면 바이러스는 사라진다. 그러나 전체 개체수의 20% 이상이 감염됐다면 모든 어른 벌과 유충을 제거하고 벌집을 태워야 한다.

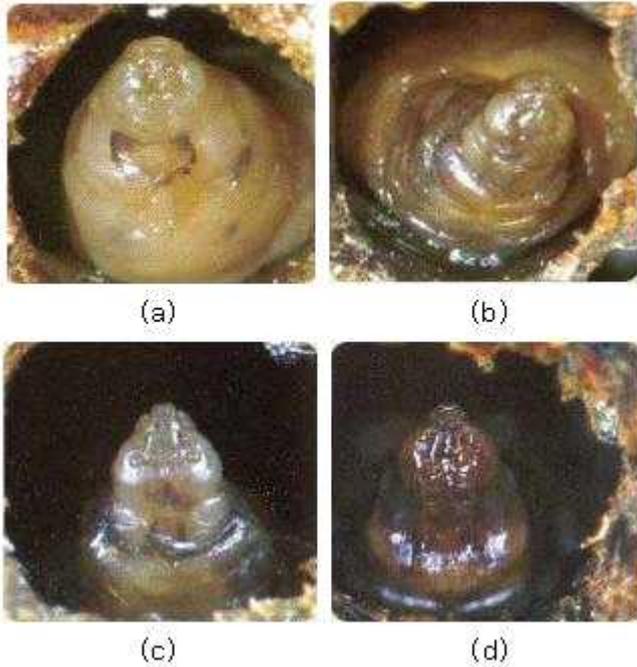


낭충봉아부패병은 꿀벌의 유충에서 발생하는 바이러스성 질병으로 감염초기에는 백색에서 회황색으로 변하고 병세가 진행됨에 따라 머리부터 갈색 또는 회갈색으로 변하며 마지막으로 암갈색으로 변해 차차 건조, 폐사까지 이르는 병이다. 이 병은 폐사한 유충이 마치 물주머니와 같이 부패해가기 때문에 ‘낭충봉아부패병’이라는 이름이 붙었다.

바이러스 병원체가 애벌레 체내로 증식하여, 번데기로 발육하기 전에 죽게 하는데 보통 한 마리당 1,000만개이상의 바이러스 입자로 피해증세가 나타난다. 그러나 애벌레가 없는 상태가 되면 바이러스가 증식할 수 없고 건조한 환경에 노출되면 급속도로 활성을 잃게 된다.

원인체낭충봉아부패병의 원인체는 Picoronaviridae의 각종 Sacbrood virus들로 ssRNA virus이다. 양봉에 낭충봉아부패병을 일으키는 바이러스와 토종벌에 토종벌낭충봉아부패병을 일으키는 바이러스는 다르다. Sacbrood virus는 양봉에만 낭충봉아부패병을 일으키고 Chinese Sacbrood virus는 토종벌에만 토종벌 낭충봉아부패병을 일으킨다.

감염경로이 병의 전염경로에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지는 않다. 다만, 꽃을 통해 벌통 간에 전파되는 것이 거의 확실해 보인다. 바이러스에 오염된 벌 기구, 벌 자재, 도봉, 벌 솔림, 관리자 등을 통해서도 확산될 수 있지만 벌들의 일상적이고 정상적인 활동 중 감염 봉군에서 미감염 봉군으로의 확산 과정과 봉군 내에서의 확산 과정은 다음과 같다.



낭충봉아부패병에 걸린 유충 및 소비

- (a) 전체적으로 부어있는 애벌레의 모습, (b) 암적색 애벌레, (c) 병중기 증상,
 (d) 병후기 증상; 두부가 흑색으로 변함

- ① 감염된 밖일벌이 꽃에서 꽃가루/꽃꿀을 수집하는 과정에서 꽃에 바이러스를 묻혀둔다. 일부는 바이러스를 묻힌 꽃가루/꽃꿀을 벌통으로 가져간다.
 - ② 미감염 봉군의 미감염 밖일벌이 1의 꽃에서 바이러스가 포함된 꽃가루/꽃꿀을 수집해간다. 이 과정에서 미감염 밖일벌이 감염될 수도 있다.
 - ③ 벌통속에 들어온 바이러스가 포함된 꽃가루/꽃꿀을 안일벌과 애벌레가 먹는다.
 - ④ 바이러스를 먹은 안일벌과 애벌레의 몸 속에서 바이러스가 증식하여 그 수가 엄청나게 늘어난다.
 - ⑤ 감염된 애벌레는 죽는다. 감염된 안일벌의 분비물 먹이를 먹은 애벌레가 감염돼 죽는다(분비물 먹이에 바이러스가 섞여나옴).
 - ⑥ 이 질병으로 죽은 애벌레 사체를 내다버리는 안일벌이 감염된다. 감염된 안일벌은 당분간 안일을 더 하면서 애벌레를 감염시키거나 밖일벌로 전환된다. 밖일벌로 전환되면 1로 순환한다.
- 종합해보면, 벌통 안과 밖이 맞물린 바이러스의 확대 재생산 과정이다.

국내외 발생 현황우리나라에서는 2009년에 토종벌(동양종꿀벌;Apis Cerana)에서 중국 낭충봉아부패병 바이러스(Chinese Sacbrood Virus;CSBV)가 보고되었다. 이 바이러스는 아시아 대륙에 도착하여 오랜 세월을 동양종 꿀벌과 함께 진화해온 것으로 보인다. 태국에서는 1981년에 발견된 이래 인도, 파키스탄, 네팔 그리고 동양종 꿀벌이 분포하는 거의 모든 아시아 국가에서 동양종 꿀벌과 함께 발견되고 있다.

안일벌[nurse bee; 젓(로열젤리)을 주거나 먹이(꿀과 화분)를 먹여주는 모든 육아 활동을 담당]의 분비선에서 나오는 분비물을 통해 애벌에게 감염된다고 보고된 바 있다. 우리나라에서는 2009년 봄부터 발생하기 시작하여 전국적으로 확산되어 2010년 9월 현재 약 90%의 토종벌이 폐사한 것으로 추정된다.

이 전염병이 도착한 벌터에서는 약 한 달 안에 모든 봉군이 감염되며 약 두 달이면 모두 폐사된다. 바이러스가 벌터에 도착하지 않아야 봉군이 살아남을 수 있으며 일단 바이러스가 도착했다면 현재로서는 예방과 치료가 불가능한 실정이다. 확산방지를 위해서는 반경 6킬로미터 안의 모든 토종벌을 살 처분해야 할 것으로 보인다.

2010년도 피해규모한국토봉(토종벌)협회에 따르면 충청·전라·강원지역의 2만 5000여 토종벌 사육농가에서 5만5000여 통의 토종벌이 이 병에 감염, 폐사가 진행되고 있다. 국립수의과학검역원에서도 전북 남원·순창·임실지역 3개 농가에 대한 조사 결과 감염이 심한 농가의 경우 봉군의 70%이상이 이 병에 감염된 것으로 확인됐다.

농민신문은 강원·충북·전남·전북·경남 등 39.9%(7월 말 기준)의 토종벌 농가가 피해를 입은 것으로 보도했다.

농림수산식품부 집계에 따르면 낭충봉아부패병으로 2007년 전체 41만8000군의 39.9%인 16만6649군에서 토종벌이 폐사하거나 감염됐다. 1군은 벌통 하나로 대략 1만마리의 벌이 산다. 2007년 5월 강원도에서 처음 발병된 이병은 올해 충남·북과 경남을 거쳐 전남·북까지 확산됐다. 이미 강원도에서는 토종벌의 절반이 피해를 입었다. 생산량 급감으로 토종꿀 가격이 크게 상승하는 것은 물론 벌이 사라진 지역은 예전처럼 자연 수정이 어려워져 과수 및 화훼 농가에 2차 피해가 우려된다.

지역	조사 농가수	조사결과							비고
		사육군수	피해군수				폐사		
			완전 폐사	%	부분폐사	%	폐사	%	
강원	5	484	351	72.5	100	20.6	451	93.1	
경기	7	384	180	46.8	99	25.7	279	72.6	
충남	5	680	180	26.4	178	26.1	358	52.6	
충북	4	864	40	4.6	12	1.3	52	6.0	
전북	3	1,040	820	78.8	60	5.7	880	84.6	
전남	3	847	482	56.9	255	30.1	737	87.0	
경북	2	2,060	1,174	56.9	636	30.8	1,810	87.8	
경남	5	1,600	960	60.0	440	27.5	1,400	87.5	
합계	34	7,959	4,187	52.6	1,780	22.3	5,967	74.9	



청원군 낭성면에 낭충봉아부패병으로 망가진 벌통

3. 낭충봉아부패병 치료 및 예방의 국내외 현황 및 문제점

최근 유행하여 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병의 효과적인 방제 수단의 부재로 인해 2012년 한해에만 전국적으로 토종벌 농가는 1/2 정도 수준으로 격감되었다.

2013년도 에는 충청도, 강원도에 발병 , 유행하여 토종벌이 모두 폐사하였다.

농림수산식품부는 토종벌의 집단 폐사를 일으키는 낭충 봉아 부패병에 대한 공인된 치료제 및 예방약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라는 입장이다 .

현재까지 농가가 예방을 위해 취하는 방법은 감염봉군은 철저히 격리하여 소각하고 더 이상 감염원으로 작용하지 않도록 하며 건강봉군에 대해서는 질병확산 방지를 위해 건강봉군들 주변과 벌통 바깥 및 봉기구들에 소독약을 매일 뿌리고, 꿀벌에게 사료용 비타민, 미네랄 합제, 프로폴리스 등을 설탕물이나 꿀물에 타서 벌에게 직접 분무하여 영양을 충분히 급여해주는 정도이다.

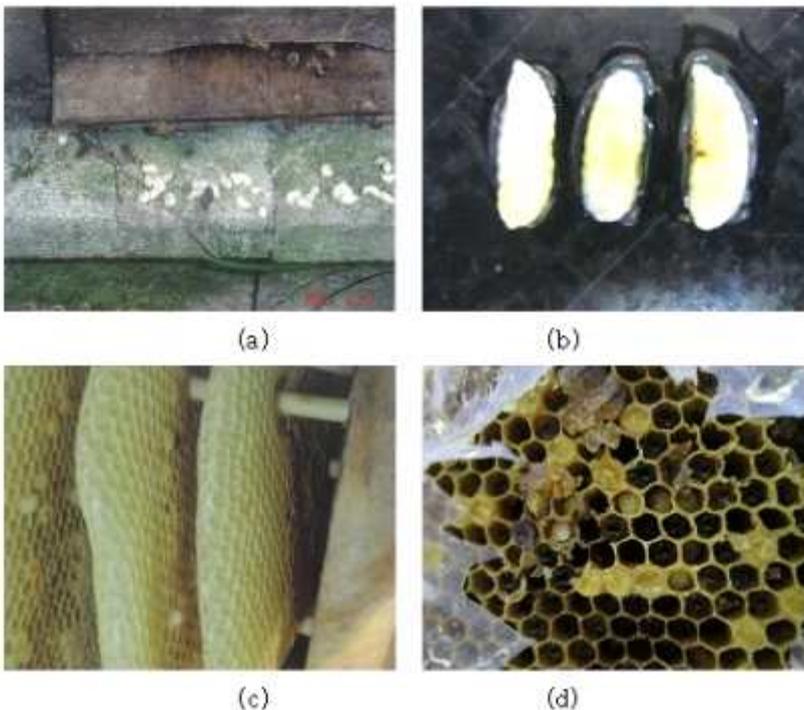
그리고 세균의 2차 감염 방지를 위해 사료용 항생제 테라마이신 (옥시테트라싸이클린) 등을 먹이에 뿌려 준다. 일부 양봉 농가들은 썩 발효액을 예방용 소독약

및 치료용 사양액으로 사용하여 효과를 보았다는 예가 있다.

이러한 낭충봉아부패병 바이러스에 대한 양봉농가의 방제 방법은 농가마다 각기 독특한 방법으로서의 방제가 이루어지고 있으며 이런 이유로 올바르게 못한 방법으로서의 방제가 이루어지면서 꿀을 포함한 양봉산물에의 항생제 잔류와 같은 문제점이 일어나게 된다.

토종별 농가에서도 낭충 봉아부패병이 감염되어도, 이런 사실을 신고하지 않는 실정으로, 이는 바이러스의 확산을 야기하고, 지역 집단 폐사로 연결되는 문제점이 있다.

일부 연구자들이 이산화염소 제제라는 이름으로 농가에 판매를 하기도 하는 바, 그 효능이나 안전성에 대한 구체적인 자료가 전혀 없는 실정이다.



▲ 낭충봉아부패병에 폐사한 애벌레 형태 (a) 벌통 입구나 벌통 주변 등 밖으로 버려진 애벌레, (b) 버려진 애벌레를 확대한 모습, (c) 색깔이 누렇게 변하고 연변이 무디게 변한 소비의 모습, (d) 소방 내에 애벌레가 부패한 모습

4. 사전(예비) 연구 내용

사전 연구 내용은 본연구진이 농림축산검역본부 바이러스 연구팀과 공동으로 이산화염소를 활용한 꿀벌 낭충봉아부패병 바이러스 질병 실험을 한 내용으로서, 본 제제의 탁월한 효능과 안전성을 나타내주는 자료입니다.

또한, 이어지는 이산화 염소 소개 자료는 연구 내용의 이해를 돕기 위하여 첨부하였습니다.

염소가 이름에 염소가 들어 있어, 염소계 소독제, 예를 들면, 차염, 염소, 클로라민, 클로로칼키, sodium dichloroisocyanurate 등과 같은 부류로 인식되는 오류가 있어, 그것을 방지할 목적으로 실게 되었습니다.

이산화 염소는 산소계 소독제로서, 염소가 작용하는 것이 아니고, 산소가 작용하는 산화제입니다.

그러므로 , 염소는 유기물과 반응하여 발암성 소독 부산물, 대표적인 THM(트리 할로 메탄)을 생성하는데 반해, 이산화 염소는 발암성 소독 부산물을 생성하지 않는 친환경 소독제입니다.

연구 내용 (Abstract)

낭충봉아부패병치료제 효능 Screening System 개발

1. 실험실내 꿀벌 애벌레 인공배양

● 실험실내 꿀벌 애벌레 인공배양 성공(그림1. 참조)

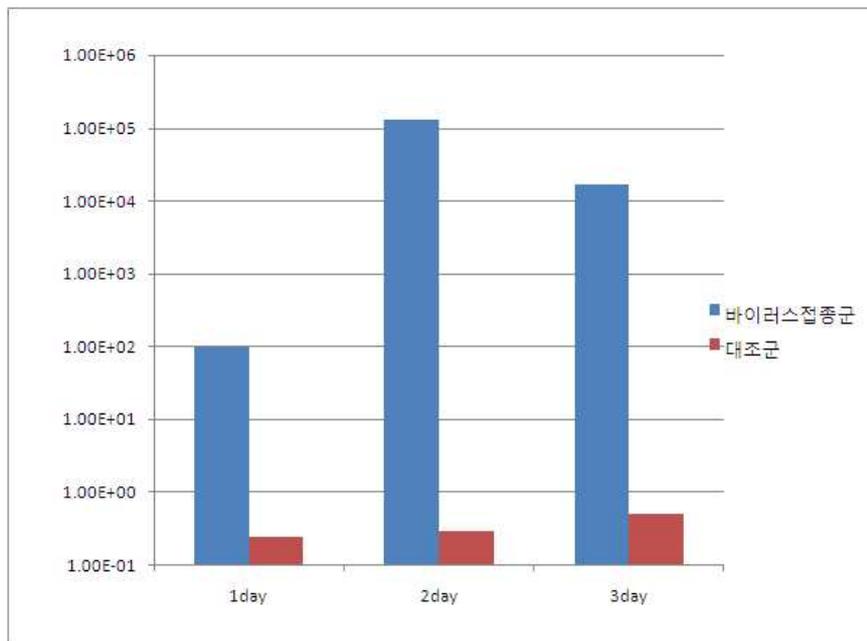
- 꿀벌 애벌레를 세포배양용 플레이트로 이충
- 37°C, 90%의 습도 조건에서 배양
- 개량 인공사양액(6% D-glucose, 6%D-fructose, 1% yeast extract, 50% Royal jelly)을 이용하여 7일간 동안 꿀벌 애벌레 배양
- 꿀벌 애벌레 7일간 생존 확인
- 낭충봉아부패병(Sacbrood virus) 감염군과 비교 시 배양일수에 따른 유의성 있는 생존율을 보였음



그림1. 꿀벌 애벌레 낭충봉아부패병 바이러스 감염군과 비감염군 비교

2. 꿀벌 애벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 증식 확인(그림2. 참조)

- 현재 국내 토종벌에서 발생 중인 낭충봉아부패병 바이러스 꿀벌 애벌레를 이용한 배양 확인
 - Real Time PCR법을 이용하여 바이러스의 농도(copies/ μ l)를 측정함으로써 바이러스의 증식을 경시적으로 확인
 - 낭충봉아부패병 바이러스 비접종군과 비교 시 바이러스 접종군에서 낭충봉아부패병 바이러스의 유의성 있는 증식을 확인 함



2. 꿀벌 애벌레 낭충봉아부패병 바이러스 감염 시킨 후 바이러스 확인

3. 치료제 티몰 및 안정화이산화염소 효과 실험(그림3. 참조)

- 에벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 접종 후 치료제인 티몰 및 안정화이산화염소를 처리하여 효과 실험 실시
 - 대조군인 바이러스 접종군보다 생존율이 높았고 생존기간도 길었음
 - 치료제로 사용 중인 티몰 및 안정화이산화염소합제의 살() 바이러스 효과를 인정할 수 있음



그림3. 꿀벌 에벌레 낭충봉아부패병 바이러스 감염군과 티몰 및 이산화탄소 처리군 비교

사전 연구 내용

◆ 낭충봉아부패병 유전자 치료법 개발 및 이산화염소 적용 연구

- 유전자 치료제 및 dsRNA 및 siRNA의 개발 연구
 - 유전자 치료제 후보 유전자 선발 (dsRNA 및 siRN)
 - 국내 낭충봉아부패병 원인체인 SBV 분자생물학적 특성분석
 - 선발된 유전자의 대체바이러스 이용 증식억제능 평가법 확립 및 평가

- 이산화염소(ClO₂)의 토종벌 낭충봉아부패병에 대한 예방 및 소독효과 평가
 - 이산화염소 기체 이용 토종벌 소독기 적용방법 고안 및 시제품 제작
 - 치료제 효과 평가법 확립을 위한 Sacbrood virus 대체 바이러스 선정 및 확보
 - SBV 대체 바이러스에 대한 토종벌 소독기 예방 효과 평가
 - 이산화염소 이용 토종벌 벌통 소독법 확립

- 유전자 치료제 및 이산화염소의 토종벌 농가적용 시험

■ < 염소 소개서 >

염소 소개 자료는 연구 내용의 이해를 돕기 위하여 첨부하였습니다.

이산화 염소가 이름에 염소가 들어 있어, 염소계 소독제, 예를 들면, 차염, 염소, 클로라민, 클로로칼키, sodium dichloroisocyanurate 등과 같은 부류로 인식되는 오류가 있어, 그것을 방지할 목적으로 실게 되었습니다.

이산화 염소는 산소계 소독제로서, 염소가 작용하는 것이 아니고, 산소가 작용하는 산화제입니다.

그러므로, 염소는 유기물과 반응하여 발암성 소독 부산물, 대표적인 TH(트리 할로 메탄)을 생성하는데 반해, 이산화 염소는 발암성 소독 부산물을 생성하지 않는 친환경 소독제입니다.

◎ 이산화 염소 소개

가. 이산화염소 물리 화학적 특성

이산화염소는 어는점이 -59°C 이고 끓는점이 11°C 인 상온에서 녹황색을 띠는 기체이다.

약간 염소냄새가 나며 물과 에테르 등에 잘 녹는다. 강력한 산화력으로 (산화상태 : +4) 살균효과를 가진다.

이산화염소는 저장시 서서히 분해되어 ClO_2^- , ClO_3^- , Cl^- 등으로 변환된다.

나. 이산화염소의 역사

- 1811년 Sir Humphrey Dary 발견
- 1834년 Watt와 Gurgess 표백력 발견
- 1930년 Matieson Alkali Work사, Sodium Chlorate원료로 최초 공업적 제조 공정 개발
- 1939년 Matieson Chemical Corp사 Sodium Chlorite 원료로 최초 공업적 제조 공정 개발
- 1944년 No.2 나이에가라 폭포(뉴욕주)에 최초로 수처리 시설에 적용
- 현 재 미국 900 유럽 수천곳에 주 살균 소독제로 사용중

다. 이산화염소 장점

이산화염소의 장점은 유기물을 산화시키지 않는데 있다.

즉 발암성 trihalomethane (THM), 할로아세트산(HAAs) 및 기타 염소화 유기화합물을 생성하지 않는다. 기타 장점은

- 염소 보다 선택성이 높음
- 염소 보다 2.6배 산화능
- 암모니아, 암모늄 기타 유기물과 반응하지 않음
- 넓은 pH 범위에서 살균효능을 유지

라. 이산화 염소 각국 공인

1) 미국환경보호청(EPA)공인 21164-3

음용수의 정수처리시 발암물질인 THMs 나 HAAs등을 생성하지 않기 때문에 안전한 살균. 소독제로 권장하고 지난해 탄저균 테러로 인해 폐쇄된 미국 의원회관의 살균. 소독에 이산화염소를 사용하였다.

2) 미국식품의약청(FDA) CAS Reg No 10049-04-4

“과일이나 야채, 식품 용기 등의 세척에 사용할 수 있다”
라고 규정 하였다.

3) 세계보건기구(WHO)공인 안전기준 A-1

이산화염소는 안정성에 있어서 식품첨가물중 가장 안전한 기준인 A-1등급 이다.

4) 환경부 고시(1999-173호)

먹는 물 관리법에서 살균소독제로 인정 (1ppm이하 사용)

5) 식약청 입법고시(2007년6월 29일)

이산화 염소 제조 장치 및 전기분해로 제조되는 이산화 염소 수는 야채,과일등 식품의 살균 에 사용할 수 있다

마. 이산화염소의 살균력

대상생물	시간(초)	농도(ppm)	사멸율(%)
대장균	41	0.25	99
폐렴간균	300	0.01	99.9
포도상구균	300	0.12	99.9
시가이질균	300	0.01	99.9
장티프스균	300	0.03	99.9
고초균	300	1.00	99.9

Journal of Food Protection. Vol. 43. June.1980

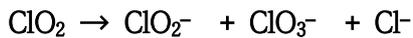
바. 이산화염소와 염소의 특성비교

특성	이산화염소	염소
사용상태	완충용액	액화가스
살균력(대장균99%이상 살균기준)	pH8.5, 0.25ppm, 41초 이내	pH8.5, 0.25ppm, 60초 이내
냄새발생농도	17ppm	0.35ppm
THMs 생성농도	없음	10시간 반응시 0.25mol/l
음용수 살균시(후처리)사용농도	0.1에서 0.2ppm	0.2에서 0.4ppm
산화력(이론치)	염소의 2.5배	1

사. 이산화염소의 장점

●1900년대 초 벨기에 온천에서 처음 사용된 이래, 1950년대에는 상수도에 본격적으로 사용되면서 대략 700-900개 정수장에서 적용되고 있다.

●이산화염소는 명칭에 염소가 포함되지만 산소에 의한 산화로 살균소독하고, 이산화염소 분자내 염소는 작동하지 않는다. 빛에 의해 빠르게 분해되며, 고농도 외에는 수용액에서는 안정하고, 시간이 경과함에 아염소산, 염소산, 염화물(소금)으로 분해된다.



●이산화염소는 강력한 산화력, 소독부산물 미생성, 탁월한 악취제거능으로 각광을 받고 있지만, 상하수도 등 현장에서 직접 제조하여 사용해야 하는 단점이 있어, 그 사용에 제한이 있어왔다.

또한 그 제조법 또한 용이하지 않아, 고순도 고수율 생산 기술 개발이 꾸준히 이루어지고 있다.

●그 결과 최근에는 팔목할 만한 수준의 이산화염소 발생기와 상온에서 2년간 농도 유지되는 이산화염소가 상용화되어 각 분야에 적용되기 시작하였다.

●이산화염소는 크게 살균과 탈취 분야, 그리고 녹조, 적조 등 유해성 조류 제거에 적용되고 있다.

◆탈취 시험결과

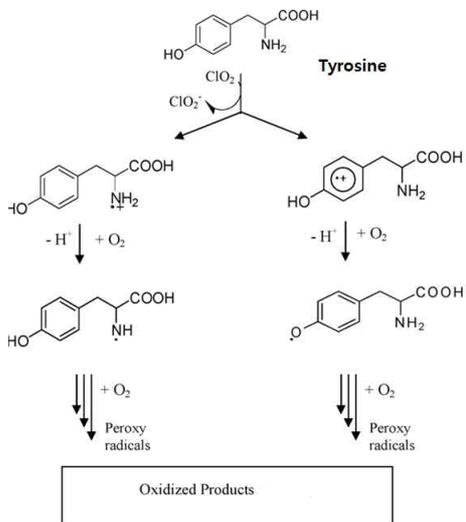
시험항목	시간(min)	BLANK (ppm)	시료농도 (ppm)	탈취율 (%)	시험방법
황화수소 탈취력	초기	50	50	0	KS I 2218:2008
	30	50	3	94	
	60	49	2	96	
	90	48	1	98	
	120	47	1	98	
메틸머캅탄 탈취력	초기	50	50	0	
	30	50	3	94	
	60	48	2	96	
	90	48	1	96	
	120	47	1	98	

◆이산화염소의 조류 제거 효능

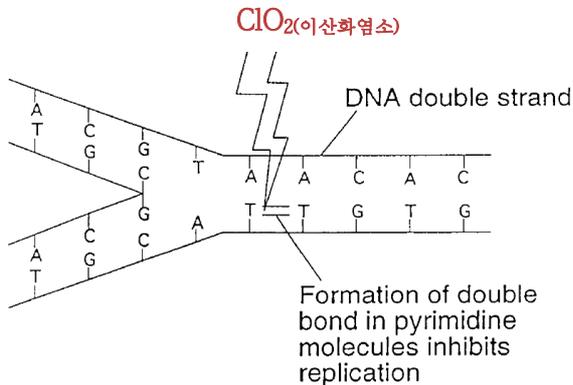
노출시간	ClO ₂ 1ppm	ClO ₂ 0.5ppm	ClO ₂ 0.25ppm	ClO ₂ 0.1ppm
2분	> 97%	95 - 97%	93 - 95%	90 - 91%
10분	> 97%	95 - 97%	93 - 95%	90 - 91%
30분	> 97%	95 - 97%	93 - 95%	88 - 91%



●이산화염소는 세균 세포내의 아미노산 즉 시스테인, 트립토판, 티로신 등을 무력화하며, 바이러스의 경우는 캡시드 단백질을 변형시킨다.



소아마비 바이러스에서는 RNA 및 미생물 DNA를 손상시킨다. 미생물의 지방산과도 반응한다.



연구결과에 따르면 단백질 생합성을 저해하거나 세균의 외부막의 단백질과 지질과 반응하여 투과성을 불필요하게 증가시켜 세포활동을 비정상화 한다.

●이산화염소는 pH에 영양없이 살균 소독력을 나타내며, 다른 소독제와 같이 온도상승에 따라 소독력이 증가한다.

●이산화염소는 소독 부산물로서 아염소산, 염소산, 염화물(소금)을 생성하나, 처리 농도가 매우 낮으므로(수 ppm) 그 소독부산물의 농도도 매우 낮다.

●결론적으로 이산화염소는 살균소독력이 매우 우수하여 염소나 클로라민과 달리 Giardia나 Cryptosporidium과 같은 원생동물도 제어하고, 강력한 탈취력, 페놀, 철, 망간 제거든 녹조, 적조 제거와 소독부산물 미생성 및 pH 무영향 등의 장점을 가지며, 반면에 발생기 제조가 용이하지 않고 숙련된 기술이 요구되며, 안정화 되지 않은 경우 현장에서 제조해야 하는 단점이 있다.

●첨부 사진에서와 같이 대장균 살균처리에서 염소는 세포막을 손상시키지 못하고, 내부 구조만 일부 변형시키며, 오존은 세포막만 손상시키고, 자외선은 세포막과 내부 구조 모두 미약하게 작용하는 반면, 이산화염소는 세포막과 내부구조 모두에 막대한 손상을 일으켜 대장균을 사멸에 이르게 한다.

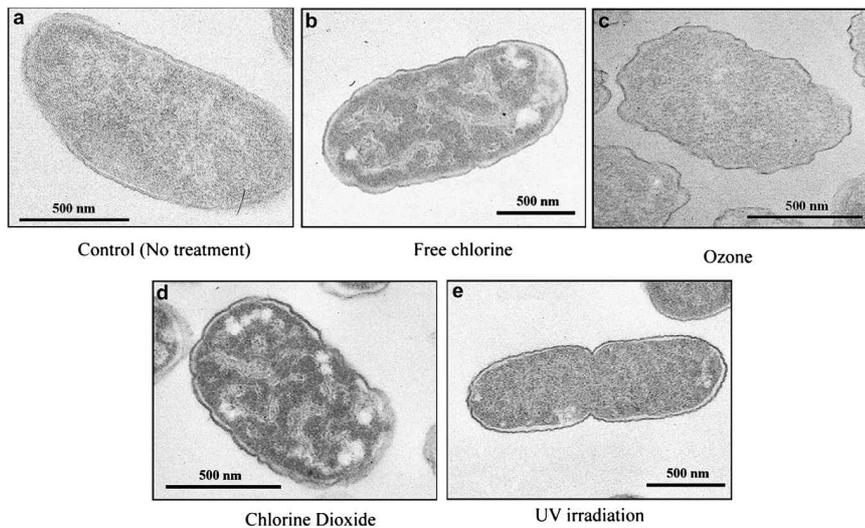


그림 설명 : 대장균을 소독제 처리한 사진

- a. Control : 세포막, 내부 구조 보존
- b. 염소 : 세포막은 보존, 내부 구조 부분 손상
- c. 오존: : 세포막 손상 , 내부 구조 보존
- d. 이산화 염소: 내부 구조 완전 손상, 오른쪽 세포벽 완전 손상
- e. 자외선 : 세포벽, 내부구조 약한 손상 내지 보존

제 3절 연구 개발의 범위

이산화염소를 활용한 토종별 낭충 봉아 부패병 예방, 치료용 경구 조성물 및 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 개발과 현장 적용, 상용화

- 다양한 바이러스 대해 강력한 살균 효과(99.9 %이상 제거)를 지니고 있고, 무엇보다도 인체에 무해하며, 소독부산물을 생성하지 않는 이산화염소(ClO_2)를 활용한 낭충 봉아 부패병 예방 및 소독제의 개발 및 성능 검증
- 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 치료용 경구 조성물 개발
- 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 소독용 소형 저가(low-cost) 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 개발
- 이산화 염소 경구 조성물과 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 치료 효능 시험(실험실적)
- 이산화 염소 경구 조성물과 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 치료 현장 적용 평가
- 이산화 염소 경구 조성물과 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 치료용 상용화

1.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 기술 개발 현황

1. 국내 기술 개발 현황

◆ 국내 진단 기술 현황

- 서양종 꿀벌에서 Reverse Transcription PCR 법을 이용한 꿀벌 질병에 대한 조사 수행(윤 등, 2009)
- 낭충봉아부패병 신속 진단을 위한 Ultra-rapid real-time PCR 진단법이 개발되어 있음 (Yoo 등, 2012a)
- 낭충봉아부패병 신속 진단을 위한 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법이 개발되어 있음 (Yoo 등, 2012b)
- 낭충봉아부패병 신속 야외 진단을 위한 High performance PCR 법 개발 중 (농림축산검역본부, 2013-)
- 면역크로마토그래피법을 이용한 낭충봉아부패병 야외신속진단법개발 및 적용에 관한 연구(농림축산검역본부, 2014-)

국내에서 낭충봉아부패병을 진단하기 위한 다양한 진단방법들이 개발되어 있으며 이는 실험실적 진단방법 뿐만 아니라 야외에서 진단 가능한 진단법들 역시 포함되어 있다.

국내 낭충봉아부패병 진단 기술은 최신 방법 및 고도의 전문적인 인력을 요구하는 것으로 세계적 기술 개발 현황에서 선두적인 위치를 차지하고 있다.

◆ 국내 방제 기술 현황

- 서양종 꿀벌의 :꿀벌 바이러스의 생태적 방제 및 면역증강제 개발 “과제 수행 (국립농업과학원. 2009-)
- 아직까지 낭충봉아부패병에 대한 공식적인 방제법 개발 연구는 수행된 바 없음
- “토종벌 낭충봉아부패병 방제에 관한 연구” (, 2010-2011)
- “국내 낭충봉아부패병 바이러스의 예방 및 치료 방법 개발” (농림축산검역본부 2012-)에서는 한국형 낭충봉아부패병 바이러스에 대한 siRNA를 제작하여, siRNA에 의한 바이러스 발현 억제 효능을 확인하고, 현장에 적용시키고자 하였다. 현재까지 낭충봉아부패병의 structural protein VP1 gene을 이용한 dsVP1 (596bp) 부분과 Structural polyprotein open reading frame을 이용한 dsSBV1 (711bp)를 일차 유전자 후보로 선발하여 siRNA 합성을 합성하여 사용한

결과 siRNA의 SBV 발현 억제 능력 확인한 상태이다.

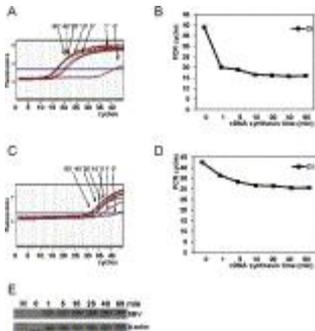
가. 농업 과학기술원 농업 생물부 : RT-PCR을 이용한 SBV검출 방법 정립

최근 SBV의 완전한 genome sequence가 밝혀지면서 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)을 이용해 빠르고 정확한 바이러스 검출이 가능해 졌다.

농업 과학기술원에서는 우리나라에서 최초로 RT-PCR을 이용해 SBV를 검출하였고, 그 방법을 정립 시켰다.

SBV를 검출하기 위해 전국의 27개 양봉장으로부터 일벌을 수집하였다. 또한 GenBank database를 이용해 SBVspecific primer를 제작 하였으며, 이를 바탕으로 RT-PCR을 실시하였다.

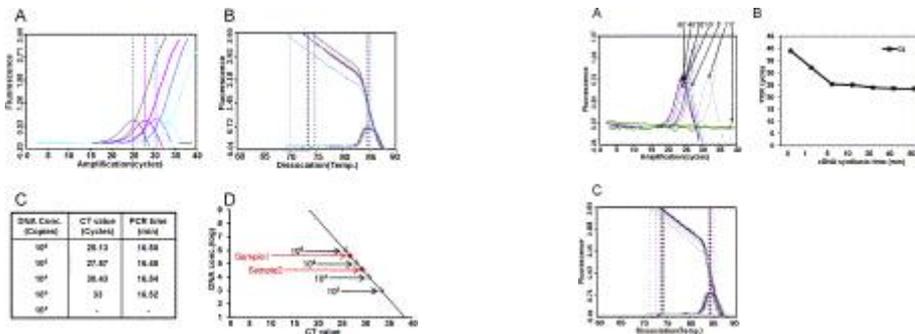
이를 통해 우리나라 양봉장에서 SBV의 존재를 확인할 수 있었고, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 통해 GenBank에 등록되어 있는 SBV와의 homology를 확인 하였다.

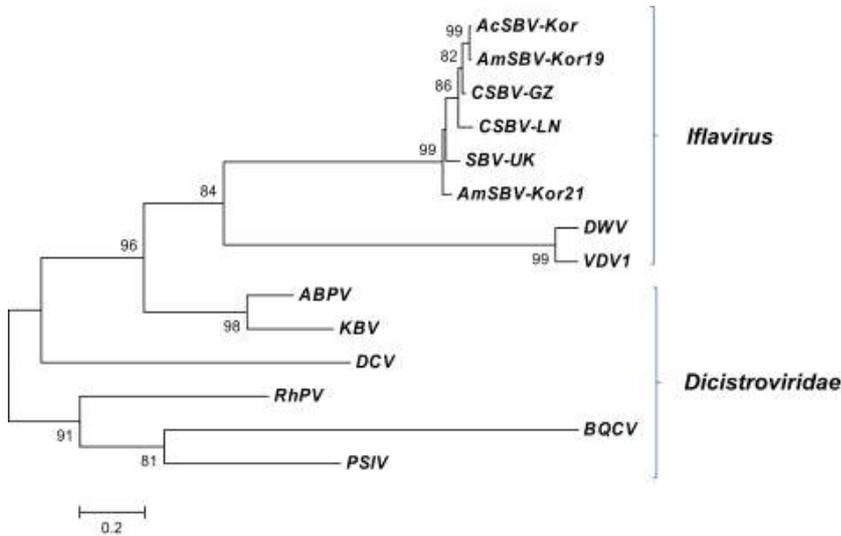


Real-time PCR detection of SBV in cDNA synthesized with different incubation times

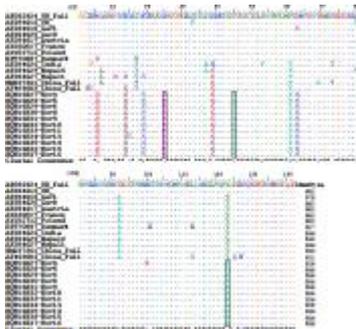
나. 경기대학교 : Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 ultra-rapid real-time PCR법 개발

A. mellifera 와 *A. cerana*에서 각각 검색된 SBV의 염기 서열 이를 바탕으로 한 쌍의 forward/reverse primer를 이용하여 SBV와 KSBV를 구별 검출 할 수 있는 진단법이 개발되었다.

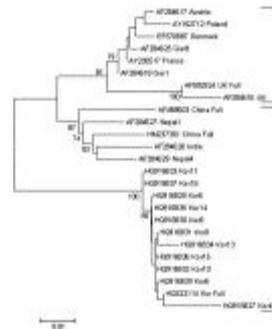




마. : 감염된 토종벌에서 분리된 한국형 낭충봉아부패병 바이러스의 유전적, 계통발생학적 분석



Multiple alignment of the deduced 143 amino acid sequence of Korean isolates



Phylogenetic tree of SBV isolates based on the 429 bp structural protein coding sequence amplified by the primer pair SB1-2

마. 충청남도 농업기술원 : 재래벌통을 양봉벌통으로 교체 화분과 면역증강제를 혼합한 당액을 투여하는 방법

충청남도 농업기술원에 따르면, 토종벌 안전사육 기술 개발은 재래벌통을 양봉벌통으로 교체하고 이른 봄 꽃이 피기 전 화분과 면역증강제를 혼합한 당액을 투여하는 등의 방식으로 진행됐다.

이후 시험 사양 관리 중인 토종벌에서 낭충봉아부패병이 발생하지 않고, 분봉과 생육이 활발하게 진행되고 있는 점이 확인됐다.

사. 농진청 : 플라보노이드 성분 면역 증강제

농진청은 유채꽃과 도토리꽃·밤꽃에서 알칼로이드와 함께 항균 효과를 지닌 플라보노이드 성분을 추출, 낭충봉아부패병 바이러스에 감염된 토종벌을 대상으로 실험했다.

그 결과 10일간 면역증강제를 먹은 꿀벌은 설탕물만 먹은 꿀벌에 비해 바이러스가 20% 수준으로 떨어지는 등 항바이러스 효과가 입증됐다.

특히 면역증강제에는 꿀벌 유충의 성장에 도움을 주는 단백질과 비타민도 함유돼 있어 낭충봉아부패병은 물론이고 다른 질병에 대한 면역력도 높여준다고 농진청은 밝혔다.

농진청은 꿀벌 면역증강제의 특허 출원을 완료한 가운데 양봉농가 보급을 위해 산업체에 기술 이전을 추진 중이다.

아. (사)한국산양삼재배자협회 : 산양삼의 사포닌 추출물

낭충봉아부패병에 걸린 벌통에 산양삼의 사포닌 추출물을 먹이로 활용 산양삼에서 추출한 사포닌과 물, 설탕을 적절히 배합해 장마철 먹이가 없을 때 벌통 내에 설치하는 먹이통(소지)에 투입 이후 더이상 죽어나가는 애벌레가 없었다

자. 기타 예방 및 치료 기술:

(주)B & J -은나노 소재를 활용한 낭충봉아부패병 예방 치료

2. 국외 기술 개발 현황

◆ 국외 진단 기술 현황

-낭충봉아부패병 바이러스 RNA 검출을 위한 Reverse Transcription PCR 법 (Benjeddou 등, 2002) 및 Real-time PCR법(Chen 등, 2005)이 개발되어 이용되고 있으나, 스크리닝 실험에 있어 비용이 많이 드는 단점이 있음

-그 외 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)법 등이 개발되어 있음 (Mingxiao 등, 2011)

◆ 국외 방제 기술 현황

-전 세계적으로 치료제 및 예방약이 개발되지 않은 실정임

-특별한 치료제는 없고 각 나라별로 대중요법이나 민간요법에 따른 치료

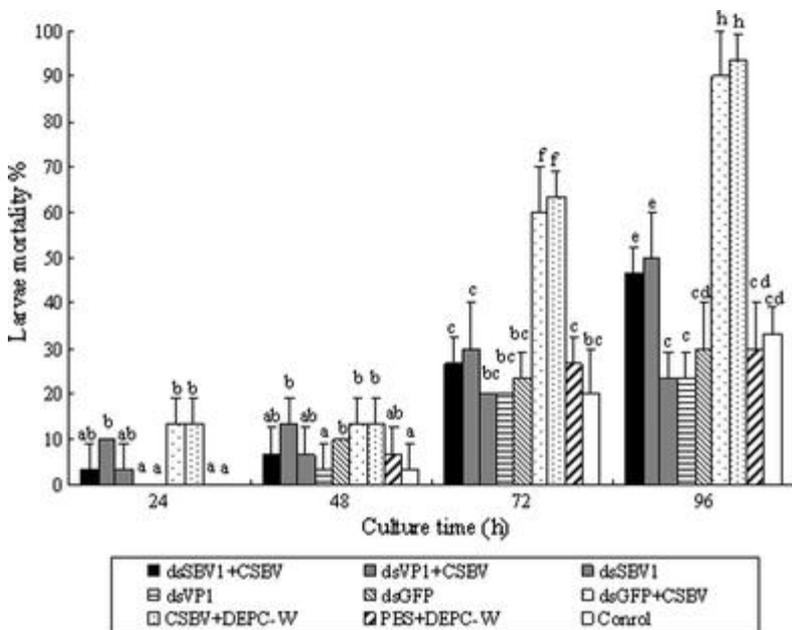
-중국에서는 복합한방치료제(비봉강)를 사용하여 치료 및 dsRNA를 이용한 유전자치료 실험 수행

-일본, 호주 및 영국에서는 질병을 극복하기 위해 기존의 여왕벌을 젊고 활기찬 개체로 교체하는 한편 약해진 벌집은 질병 없는 젊고 건강한 벌집과 결합해 강군으로 유지

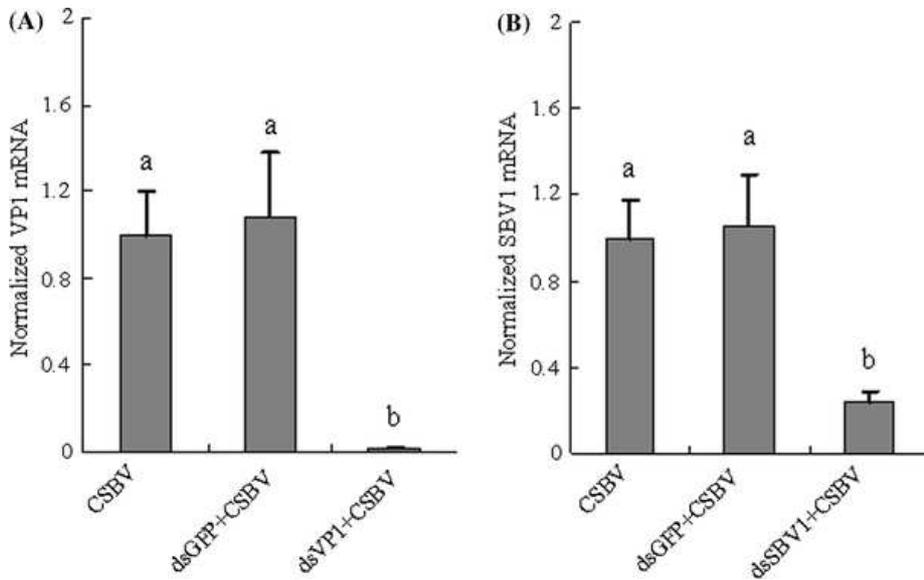
-인도에서는 감염봉군 분리 및 이동금지를 통한 예방

◆ 낭충봉아부패병 예방 연구

낭충봉아부패병 예방에 관한 연구는 중국 광저우 중국과학원 Liu 박사 연구팀이 RNA interference 방법으로 연구되었다. Curr Microbiol (2010) 61:422--428 이 연구에서는 second instar larvae of *A. cerana* with specific sequences of CSBV double-stranded RNA (dsRNA)를 feeding 하는 방법으로 낭충봉아부패병 바이러스를 예방하였고, 이를 real-time PCR 로 확인하였다.



The mortalities of *A. cerana* larvae under different treatments. dsSBV1 + CSBV, larvae fed with dsSBV1 and CSBV; dsVP1 + CSBV, larvae fed with dsVP1 and CSBV; dsGFP + CSBV, larvae fed with dsGFP and CSBV; dsSBV1, larvae fed with dsSBV1 only; dsVP1, larvae fed with dsVP1 only; dsGFP, larvae fed with dsGFP only; CSBV + DEPC-W, larvae fed with CSBV and DEPC-W; PBS + DEPC-W, larvae fed with PBS and DEPC-W; Control, larvae fed with DEPC-W. Mortality was significantly reduced in the larvae treated with dsSBV1 + CSBV and dsVP1 + CSBV compared to those treated with CSBV only or with CSBV + dsGFP. The data are averages for three replicates. The error bars indicate standard deviations. Post hoc t-tests were performed for each day. For each day bars labeled with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

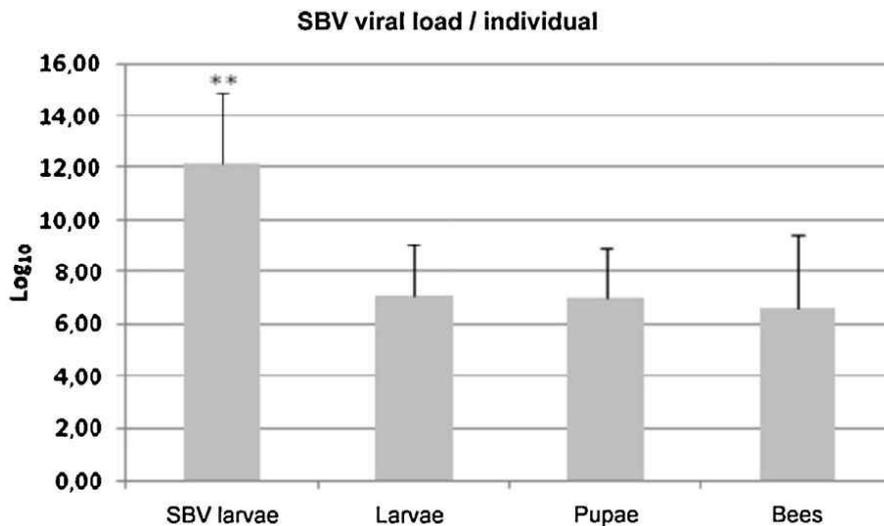


Normalized VP1 (a) and SBV1 (b) mRNA level (as determined by real-time PCR) from the bee larvae treated with dsGFP + CSBV or dsRNAs + CSBV at 72 h (for the symbols, refer Fig. 1). Bars with different letters indicated significant statistical difference ($P < 0.05$)

기타, 유전자 정보 등의 기술 개발동향은 아래와 같다.

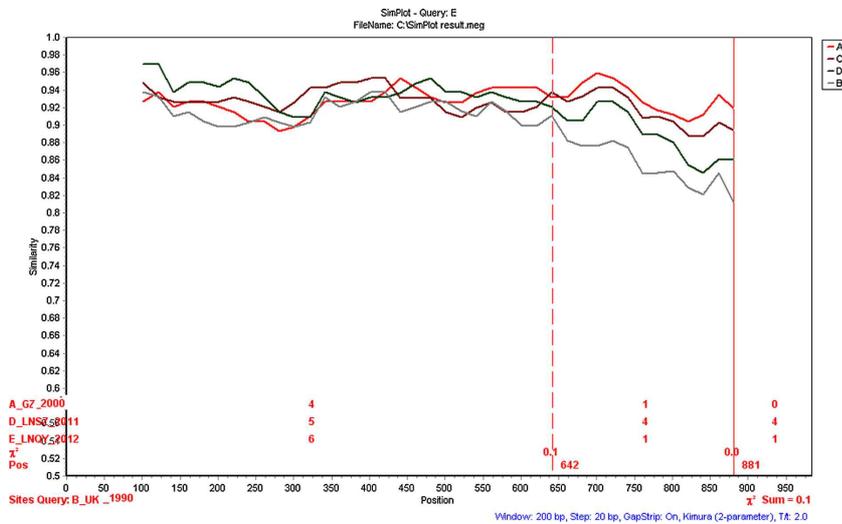
가. Anses, Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, France

Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan(®) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies.



나. 랴오닝 의과대학, 중국

Genetic characterization of VP1 gene of seven Sacbrood virus isolated from three provinces in northern China during the years 2008-2012



Similarity plot of the SBV-VP1 nucleotide sequences

다. 농업 과학원, 중국

An Integrated Proteomics Reveals Pathological Mechanism of Honeybee (*Apis cerena*) Sacbrood Disease

라. 라오닝 의과대학, 중국

TaqMan minor groove binder (MGB) probe-based, fluorescence real-time quantitative PCR을 이용한 중국형 낭충봉아부패병 바이러스 검출법 개발

마. 베트남과학기술원, 베트남

Complete Genome Sequence of Sacbrood Virus Strain SBM2, Isolated from the Honeybee *Apis cerena* in Vietnam

바. 펜실베이니아 주립대학, 미국

브라질 토종벌 (*Apis mellifera*)에서의 방충봉아부패병 바이러스 colony 최초 검출
Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite.

사. 충칭동물과학원, 중국

Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay

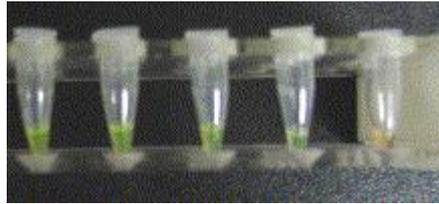
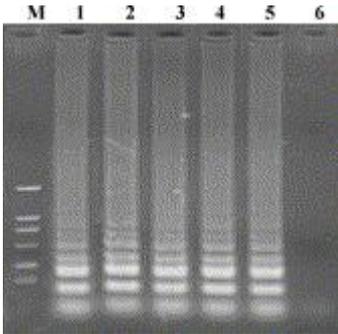
아. 나고야 대학, 일본

Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan

자. 라오닝 의과대학, 중국

Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus.

Molecular and Biological Characterization of Chinese Sacbrood Virus LN Isolate.



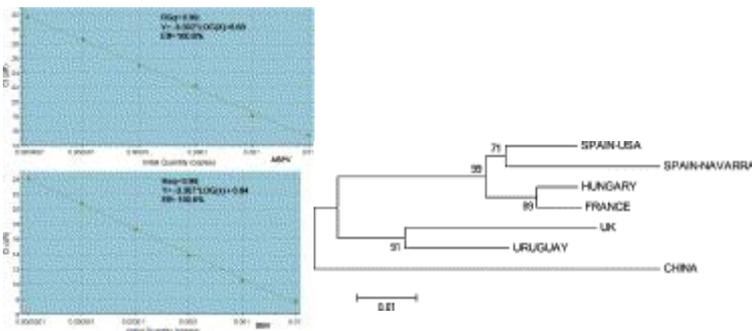
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products determined by the SYBR Green I color change

차. 광저우 과학원, 중국

Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference

카. Departamento de Sanidad Animal Facultad de Veterinaria, Spain

One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses



Standard curve for ABPV and SBV real-time RT-PCR Phylogenetic analysis of SBV sequences from nucleotides 7750 to 8150

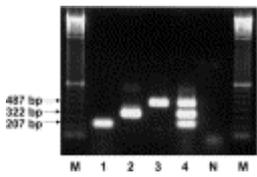
타. 중산대학교, 중국

중국형 방충봉아부패병 바이러스의 3차원 구조 분석

파. 비엔나 수위과대학, 오스트리아

Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, Black

queen cell virus and Sacbrood virus.



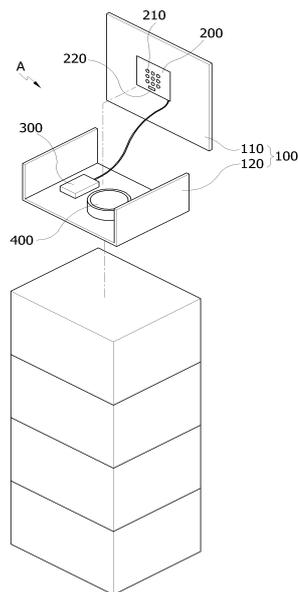
Detection of the three honeybee viruses ABPV

3. 국내 특허 현황

가. :낭충봉아부패병을 포함한 꿀벌의 전염성 질병의 및 치료를 위한 이산화염소 기체 소독장치

낭충봉아부패병을 포함한 꿀벌의 전염성 질병의 예방 및 치료를 위한 이산화염소 기체 소독장치는, 양봉용 벌통에 설치되는 이산화염소 기체 소독장치에 있어서, 상기 거치대 내 측면에 설치되며 자외선 LED가 설치된 상기 인쇄회로기판에 전원을 인가하는 및 상기 자외선 LED와 대면하는 부위의 거치대에 설치되며 안정화이산화염소가 수납된 약제수납부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

이에 따라, 안정화이산화염소에 자외선을 조사하여 발생된 공기보다 비중이 무거운 이산화염소기체를 벌통에 주입하여 꿀벌(bee)의 유충 및 성충에서 발생하는 감염성 전염병의 대표적 사례인 꿀벌의 바이러스성 전염성 질병인 낭충봉아부패병(sacbrood)을 예방 또는 치료하는 효과가 있다.



나. 방춘식 : 한봉의 낭충봉아부패병 예방 및 치유 효소 추출액 제조방법

오가피, 민들레, 인삼을 포함하는 친환경 소재의 성분들로 구성된 추출액과 사탕수수를 가공하여 이 사탕수수에 포함된 원당을 제조하고 추출액의 온도를 50~55℃의 온도로 일정하게 유지시킨 후, 교반기에 투입하고, 이와 동시에 원당 고형물을 60Kg 투입하여 4~6시간 동안 교반하는 교반 제조된 효소 추출액을 건조 및 냉각하고 외부 이물질이나 세균 등이 침투하는 것을 방지하기 위해 진공 포장에 이루어지는 것을 특징으로 하는 한봉의 낭충봉아부패병 예방 및 치유 효소 추출액 제조방법

다. (주)비센 : 꿀벌의 낭충봉아부패병 치료제

꿀벌의 낭충봉아부패병 치료제에 대한 것으로서, 벌 몸 내부에 티몰과 안정화 이산화 염소수를 포함하는 꿀벌의 낭충봉아부패병 치료제를 특징으로 한다. 낭충봉아 부패병 치료제는, 티몰 0.1-10 중량%, 장뇌 0.1-10 중량%, 티트리오일 0.1-10중량%, 파이넨 0.1-10 중량%, 이산화염소수(Chlorine dioxide) 0.1-5중량%, 초산(Acetic acid) 0.1-5중량% 및 홍삼 엑기스 0.1-5 중량% 및 정제수 50-80 중량%를 포함한다.

낭충봉아부패병에 대한 치료제 봉군에 투입시 22% 이상의 생존율을 확인할 수 있으며, 낭충봉아부패 병 바이러스의 감염전에도 예방 차원에서 처리할 경우에 벌의 면역력 증가로 벌의 폐사를 막고, 봉군의 세력이 회복 될 수 있는 수단이 될 수 있다.

라. 농림축산검역본부 : 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 감염 진단용 조성물 및 이를 이용한 진단 방법

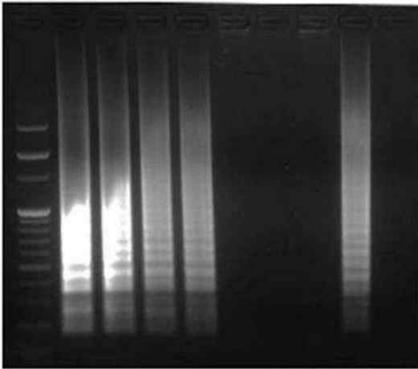
한국형 낭충봉아부패병 바이러스 감염 진단을 위한 프라이머 셋트 및 이를 이용한 한국형 낭충봉아부패병 바이러스의 감염 진단 방법.

한국형 낭충봉아부패병 바이러스 진단용 프라이머 셋트는 다양한 낭충봉아부패병 바이러스 감염 시료에서 한국형 낭충봉아부패병 바이러스를 특이적으로 검출하는 효과가 우수하므로, 한국형 낭충봉아부패병 바이러스의 신속한 검출 및 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

마. 농촌진흥청

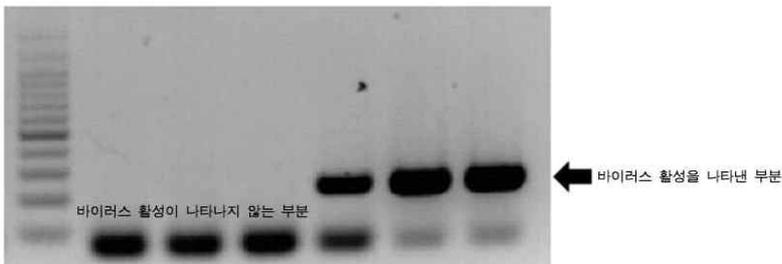
꿀벌의 면역증강용 조성물은 낭충봉아부패병을 일으키는 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 갖는 알칼로이드를 유효성분으로 포함하는 것이 특징이다. 바이러스에 의한 질병 방제로 인한 꿀벌의 폐사를 방지하며, 특히 항바이러스 활성뿐만 아니라 항균활성도 갖게 됨으로써 꿀벌의 생리적 환경을 개선하여 꿀벌의 수명 연장 및 면역을 증강시켜 꿀벌 스스로가이겨낼 수 있도록 하는 꿀벌의 면역증강용 조성물

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Lane 1-4: 한국형 낭충봉아부패병에 감염된 토종벌 시료
 Lane 5-7: 다른 낭충봉아부패병에 감염된 꿀벌 시료
 Lane 8: 양성 대조군
 Lane 9: 음성 대조군

면역증강제 처리 후 면역증강제 처리 전



4. 해외 특허 현황

가. : [PCT] METHOD FOR TREATING AND PREVENTING SACBROOD VIRUS INFECTION

충봉아부패병 바이러스 감염을 처리하고 방지하기 위한 방법과 관련된다,그리고 보다 상세하게는,다음 단계를 포함하는 낭충봉아부패병 바이러스 감염을 처리하고 방지하기 위한 방법에 : 저온에 그리고 진공 하에 야생 인삼 추출을 획득하기 위한 1:1-2의 무게비로 야생 인삼과 물을 혼합하는 것,그리고 이를 집중하는 것 ; 야생 인삼을 믹싱시키는 것이 액체성 야생 인삼을 제조하기 위한 물로 집중하고 당질 함량을 갖는다 최소한 45 브릭스 ; 그리고 가지거나, 수축하지 못했 으는 꿀벌에 액체성 야생 인삼을 희석하고 제공한다 본 발명에 따른 낭충봉아부패병 virus.,낭충봉아부패병 바이러스 감염은 apis cerena 또는 개량종에서 효과 적으로 처리되거나 방지된다.

나. [중국] Method for preparing preparation for treating and preventing

Chinese sacbrood

정상 온도로 생석회의 4에서 6 킬로그램을 첨가하고, 포타슘 사이트레이트의 60 그램을 추가하고,과망간산 칼륨 40에서 60 그램, 차가운 아세트산 400에서 600 그램, 젖산 400에서 600 그램, 옥살산의 100 그램,메탄올 200 그램, 파라포름 알데히드 400에서 600 그램과 글루타르알데히드의 100에서 150 그램, 본 방법에 의해 준비된 조제가 중국의 낭충봉아부패병으로 감염시키는 중국의 꿀벌을 높은 양생 효과를 낳는다,그리고 큐어 비율은 98 퍼센트가 될 수 있다

다. [중국] Medicament for treating Chinese bee sacbrood and its preparing method

중국의 꿀벌 낭충봉아부패병과 과정을 치료하기 위한 치료 약제와 관련된다, 여기에서 원료의 성분은 드리우는 개나리속 1 부분의 캡슐을 포함한다, 황금 뿌리 0.9-1.1은 분리된다,인동꽃 0.9-1.1은 분리된다, 그리고 레디스 isatidis 0.9-1.1 parts. 연마제 조합 과정이 물에 그릴링하는 액체 약품을 포함시킨다, 꿀벌 허니를 농축시키고 차징시킨다

라. [중국] Pure traditional Chinese medicine composition for treating sacbrood virus of bees and preparation method thereof

꿀벌의 낭충봉아부패병 바이러스를 처리하기 위한 순수한 한의학 조성물과 관련되고 순수한 한의학 조성물이 믹싱되고 추출된 다음 성분을 포함한다 : cyrtomium 뿌리줄기의 25-45 부분,인동꽃의 25-35 부분,감초 루트의 15-35 부분,slenderstyle 오가피 바크의 15-35 부분,수염을 기른 스큐테랄리아의 25-35 부분,연교와 15-35의 15-35 부분이 거대 마디풀 rhizome.의 분리되고 순수한 한의학 조성물이 성분이 합당한 유용한 효과를 가진다,제조는 단순하다,한의학 조성물은 잔여물 없이 순수하다, 약물 저항 또는 유독한 및 부작용 ; 그리고 순수한 한의학 조성물은 증상과 질병의 원인 모두를 처리한다,치료적 효과는 매우 명백하다,그리고 순수한 한의학 조성물은 꿀벌의 낭충봉아부패병 바이러스의 처리에 효과적이기 위해 임상적으로 입증한다

마. [중국] PCR (Polymerase Chain Reaction) and fluorescent PCR rapid detection method of bee sacbrood diseases

꿀벌 낭충봉아부패병 질병의 형광성의 폴리메라아제 연쇄 반응 신속 검출법,생물학의 분야에 속하고 폴리메라아제 연쇄 반응 발견 방법을 수립하고 빠른 것을 제공하는 것을 목표삼는 것

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구 결과	관련 국내 기술	관련 해외 기술	연구 결과의 신颖성	연구 결과의 진명성
이산화염소 효능 검증을 위한 스크 리닝시스템 확립	농업과학기술원: RT-PCR을 이용 한 SBV검출 방법 정립	Anses, Sophia-Antipolis Laboratory, Bee Diseases Unit, France: Real-time two-step PCR TaqMan(®) assay		감염 바이러스 및 시료에 인공 감염된 바이러 스의 감염 여부 및 정량적 분석 을 위한 PCR 및 real-time PCR 진단법 확 립
실험실내 인공 배 양 애벌레 및 성충 에서의 경구용 이 산화염소 효능 평 가	(주)비센: 티몰,장뇌 티트리오일 , 파이넨 , 초산, 홍삼 엑기스에 이산화염소수가 아니고, 아염소산나트륨 용액 첨가	없음	세계 최초 순수한 이산화염소 경구용 제제 효능 평가 (실험실적)	실험실내 인공 배양법을 이용 한 애벌레 및 성충에서의 생 존을 증가확인
야외 시료에서의 경구용 이산화염소 효능 평가	없음	없음	세계 최초 순수한 이산화염소 경구용 제제 효능 평가 (야외시료)	바이러스 인공 감염 및 이산화 염소 처리의 야 외 적용과 야외 시료에서 생존 을 증가 확인
예방 및 소독용 소형 저가 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasi ng) 겸용 소독기 개발	농림수산검역검 사본부 :예방 및 치료를 위한 이산화염소 기체 소독장치-UV 조사기 사용(고가)	없음	최초의 신속,서방형 저가 소독 Kit(1년이상 보관 유통 가능)	저가: Kit당 만원이하 액제,분말 분리: 1년이상 보관 유통 가능
이산화 염소 경구 조성물과 신속, 서방형 겸용 소독기의 현장 적용 평가 및 상용화	없음	없음	최초의 상용화 제품	현장 평가 결과 상용화 가능: 시제품 제조 완료

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 치료용 경구용 조성물 개발

국내 토종별에 만연된 아시아형 낭충봉아부패병(Korea Sacbrood Disease)에 대한 이산화염소의 예방 및 치료 효과 확인을 목적으로 실험을 수행하였다.

먼저 대조군과 이산화염소를 처리한 실험군의 생존률을 비교하여 이산화염소의 성봉과 유충에 대한 안전성을 평가하였다.

그리고 이산화염소를 50% 설탕액으로 희석하고 0일, 3일, 5일, 7일 후에 적정함으로써 보관기간에 따른 이산화염소의 농도 변화를 확인하였다.

또한 실험실 내 인공감염된 성봉과 유충에 이산화염소를 처리하였을 때 성봉과 유충의 생존률과 유전자 증폭 정량 실험으로 아시아형 낭충봉아부패병의 예방 및 치료 효능을 보이는지를 평가하였다.

최종적으로 야외 봉군에 대한 이산화염소의 낭충봉아부패병 바이러스 억제 효과를 평가하여 이산화염소가 현장에서 치료제로써 적용이 가능한지를 확인해보았다.

1. 이산화염소의 안전성 평가

소비 내의 3일령 꿀벌 유충을 세포배양용 플레이트로 이충하고 37°C, 90%의 습도 조건에서 인공 개량사양액(D-glucose 6%, D-fructose 6%, yeast extract 1%, Grace medium 33%, Royal jelly 50%)을 사양하며 실험실 내 인공배양 기술을 확립하였다. 이 인공배양법을 이용하여 이산화염소 스크리닝 실험을 실시하였다.

성봉과 유충 모두 대조군과 이산화염소 100ppm 투여군, 이산화염소 200ppm 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다. 이산화염소의 성봉에 대한 안전성 평가를 위하여 각 군당 10마리의 성봉을 꿀벌 채집용 케이스에서 사육하였으며 대조군은 50% 설탕물, 이산화염소 투여군은 이산화염소를 희석한 50% 설탕물을 스펀지에 흡수시켜 사양하였다.

이산화염소의 유충에 대한 안전성 평가를 위하여 각 군당 24마리의 유충을 세포배양용 24well plate에 이충하였으며 대조군은 개량 사양액, 이산화염소 투여군은 이산화염소를 희석한 개량사양액을 매일 100 μ l씩 주어 사양하였다.

성봉과 유충 모두 35°C, 80%의 습도 조건에서 배양하였다. 매일 실체현미경으로 생존유무를 관찰하며 8일간 배양한 결과 이산화염소 100ppm이 희석된 사양액을 투여한 성봉과 유충 모두 대조군과 유의한 생존률을 보였으며 이산화염소

200ppm이 희석된 사양액을 투여한 성봉과 유충은 낮은 생존률을 보였다.

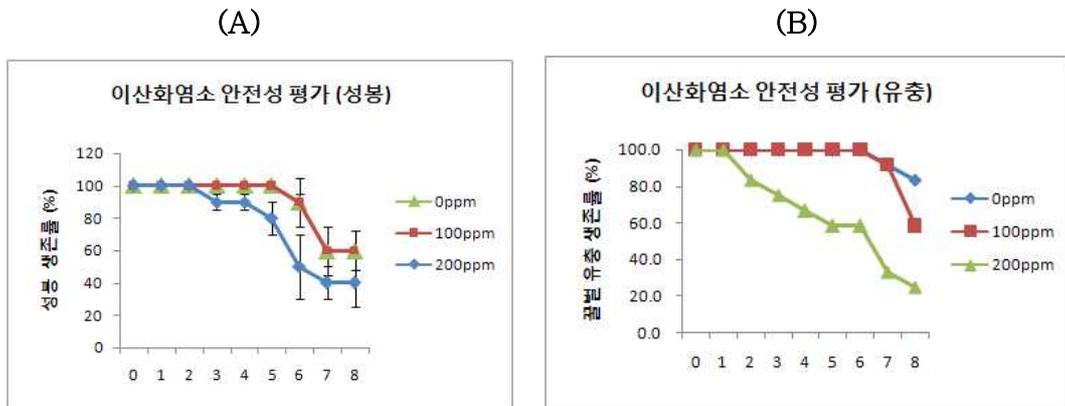


Figure 1. 성봉과 유충에 대한 이산화염소 안전성평가, 이산화염소 처리에 따른 성봉(A)과 유충(B)의 생존률 확인

2. 이산화염소의 안정성평가 (이산화염소 적정실험)

보관기간에 따른 이산화염소의 농도 변화를 확인하기 위해 이산화염소 희석액을 보관기간 별로 적정하는 실험을 수행하였다.

50% 설탕물과 3차 증류수에 2000ppm의 이산화염소를 100ppm, 50ppm, 10ppm으로 각각 희석하였다.

그리고 이산화염소 희석액을 적정하기 위하여 Tall beaker(200ml)에 3차 증류수 100ml, 적정할 용액 4ml을 넣은 후 요오드화칼륨(Potassium iodide, KI) 2g과 Acetic acid 5ml을 넣는다.

그리고 암실에서 10분간 방치한 후에 지시약 0.1N 치오황산나트륨(sodium thiosulfate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)을 이용하여 적정하였다(Metrohm). 당량점이 구해진 후 적정 계산식(지시약량(ml)*1/적정용액량(ml)*0.001349 *100(%))을 이용하여 이산화염소 농도(%)를 측정하였다.

이산화염소를 희석한 당일(0일), 희석하고 3일 후, 5일 후, 7일 후에 적정하였으며 사양액과 3차 증류수에 희석한 이산화염소 둘 다 희석한 날짜 이후로 농도가 점점 낮아지는 양상을 보였다.

이 결과의 원인은 이산화염소 오리지날 유통 제품인 2,000 ppm 수용액은 1년 6개월 동안 농도가 유지되나, 이를 개봉하여 희석을 하는 경우, 이산화 염소 수용액의 안정화 formulation이 변하는 데 기인 한다.

향후, 본 경구용 제품을 상용화하여, 토종별 농가에 보급 할 경우, 농도를 2,000 ppm 이 아닌, 100 ppm으로 조정하여 제품화 하면, 농도 변화를 방지 할 수 있다.

그러나 이산화염소의 고유 특성상, open space 에 방치 할 경우 , 필연적으로 농

도의 경시 변화가 수반된다.

그리고, 설탕에는 수많은 하이드록실 (hydroxyl , -OH) 기가 붙어 있어, 이산화
 염소와 반응하므로, 증류수로 희석할 때 보다, 농도가 더 감소하게 된다.

그러므로, 농가에 보급할 경우 되도록 낮은 농도(100 ppm) 제품으로 유통 공급
 하고, 설탕물에 희석 한 후에는 7 일 이내에 새로운 이산화 염소 수용액으로 교
 체 해주도록 제품에 표시 할 예정이다.

Table 1. 적정 결과표(%)

희석에 사용한 용액	이산화염소	적정 결과 (%)			
		0일	3일	5일	7일
사양액	100ppm	98%	100%	72%	27%
	50ppm	50%	41%	33%	25%
	10ppm	-	-	-	-
3차 증류수	100ppm	106%	96%	89%	54%
	50ppm	62%	52%	46%	17%
	10ppm	16%	15%	-	-

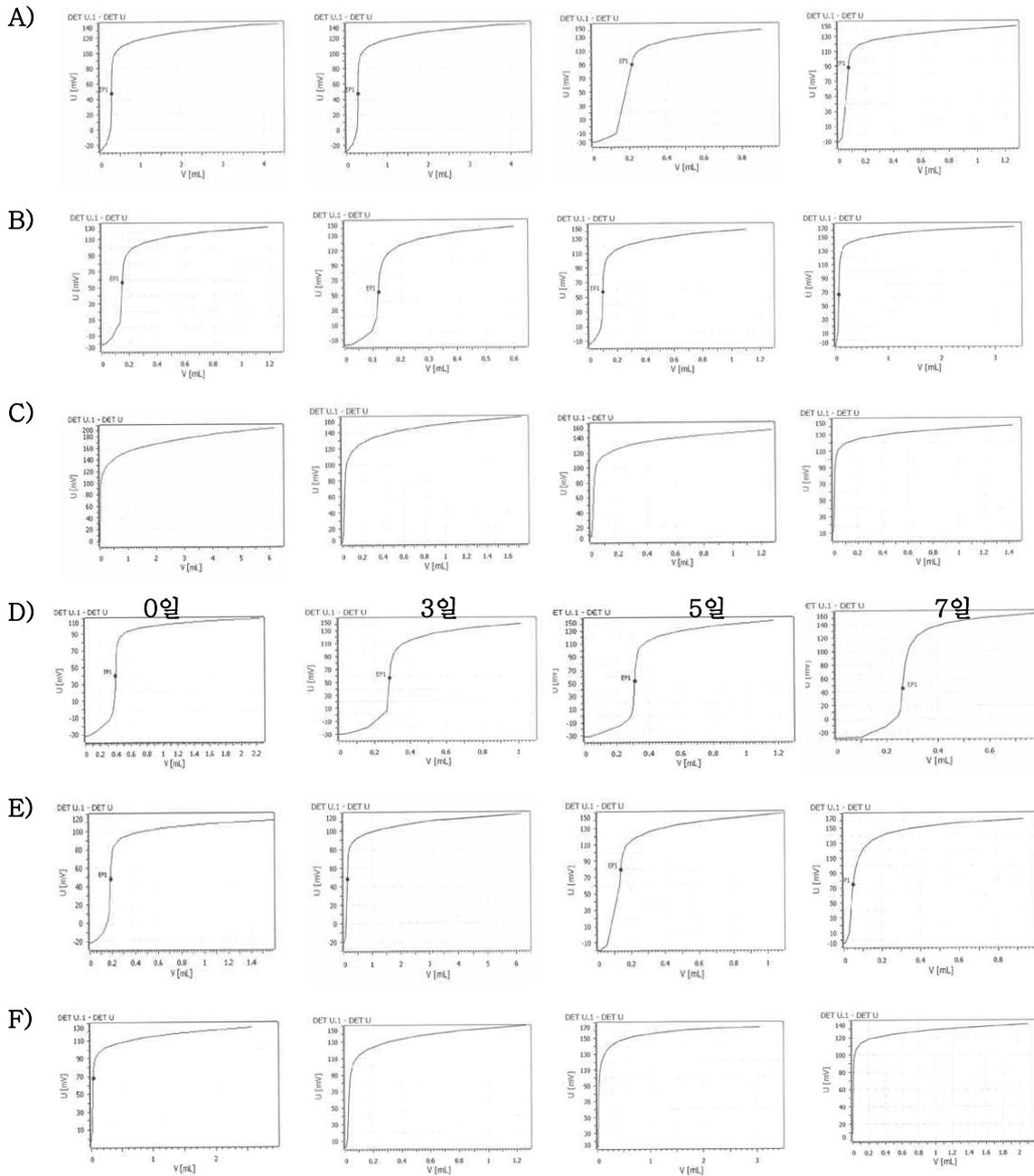


Figure 2. 이산화염소 안정성 평가, 농도 별 이산화염소를 희석한 사양액 적정결과 A),B),C), 농도별 이산화염소를 희석한 3차증류수 적정결과 D),E),F). A) 100ppm 이산화염소+50% 설탕물, B) 50ppm이산화염소+50%설탕물, C) 10ppm이산화염소+50%설탕물, D) 100ppm 이산화염소+3차 증류수, E) 50ppm이산화염소+3차 증류수, F) 10ppm이산화염소+3차증류수

3. 실험실 내 이산화염소의 바이러스 억제 효능 평가 실험

실험실 내에서 이산화염소가 SBV 인공감염 시킨 성봉과 유충의 감염 억제 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다.

가. SBV suspension 제조

낭충봉아부패병 원인 바이러스인 SBV(Sacbrood virus) suspension을 개량 사양액에 1:1로 희석하여 성봉과 유충에게 20 μ l를 사양함으로써 낭충봉아부패병 감염을 유도하였다.

SBV suspension은 Conventional PCR 및 Transmission electron microscopy 촬영을 통해 낭충봉아부패병에 감염이 확인된 유충 시료를 PBS에 분쇄하고, 0.45 μ m 및 0.20 μ m syringe filter를 사용해서 filtering시켜 준비하였다.



Figure 3. SBV 양성으로 판명된 꿀벌 유충 시료로부터 낭충봉아부패병 바이러스의 분리, sucrose gradient (10~50%)를 수행하여 40%층에서 바이러스 층 확인.

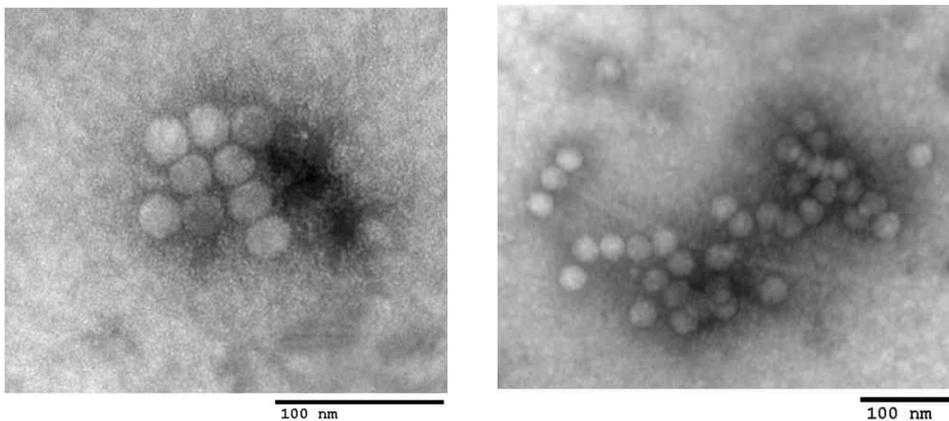


Figure 4. SBV 양성으로 판명된 꿀벌 유충 시료 내 Korean Sacbrood virus

(KSBV)의 Transmission electron microscopy 촬영사진, picornavirus와 형태적 유사성을 지닌 27.8 ± 0.4 nm 크기의 바이러스 입자들을 확인

나. 애벌레 인공감염 확인

인공감염 꿀벌 유충 내 바이러스 분리를 위하여 인공감염 애벌레를 GTNE Buffer(200mM glycine, 50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5)에 분쇄하여 0.45um 및 0.20um syringe filter를 사용해서 filtering 시켜 시료를 준비하였다.

그리고 2s, 3s ON/OFF, 총 30s 동안 sonication 시킨 후, 10%~50% 범위에서 sw41ti rotor, 32500rpm, 15hr 조건으로 sucrose gradient를 수행하였다 (Beakman).

sucrose 40%에서 바이러스 층을 확인하였으며 40% 층에서 바이러스 층을 수거하여 TNE buffer로 5배 희석하였다.

그리고 sw41ti rotor, 32500rpm, 4hr 조건으로 가라앉은 바이러스를 증류수로 수거함으로써 sucrose를 제거하였다. 분리된 SBV를 Transmission electron microscopy (TEM) 촬영하여 picornavirus와 형태적 유사성을 지닌 27.8 ± 0.4 nm 크기의 바이러스 입자들을 확인하였으며 유충이 SBV에 감염되었음을 확인할 수 있었다.



Figure 5. 낭충봉아부패병에 인공 감염된 애벌레 시료로부터 낭충봉아부패병 바이러스의 분리, sucrose gradient (10~50%)를 수행하여 40%층에서 바이러스 층 확인

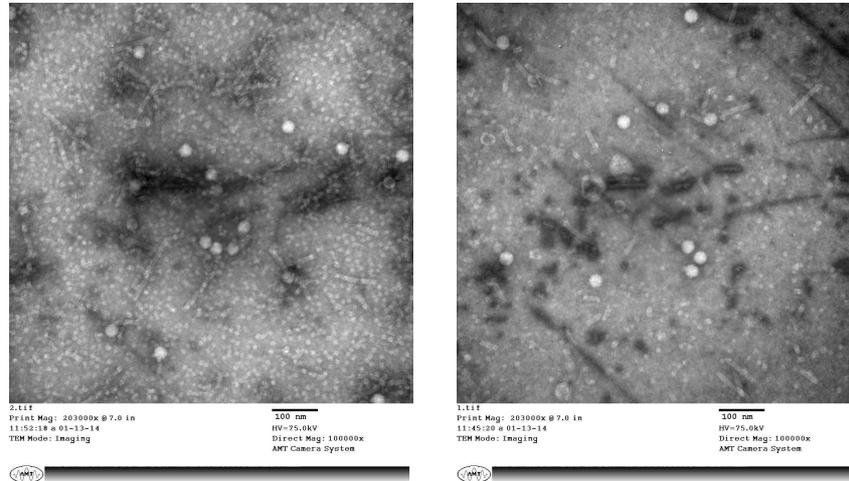


Figure 6. 인공감염 꿀벌 유충 내 Korean Sacbrood virus (KSBV)의 Transmission electron microscopy 촬영사진, picornavirus와 형태적 유사성을 지닌 27.8 ± 0.4 nm 크기의 바이러스 입자들을 확인

다. 꿀벌 낭충봉아부패병 치료제 효능평가를 위한 실험실내 애벌레 인공배양법 개발

본연구에서는 꿀벌 낭충봉아부패병 치료제 효능평가를 위한 실험실내 애벌레 인공배양법 개발되었다. 그동안 꿀벌 낭충봉아부패병 바이러스를 배양 할 수 있는 기술이 세계적으로 개발되지 않아 각종 치료후보물질에 대한 효과를 측정하는데 오랜 시간과 경비가 소요되어 낭충봉아부패병 치료 및 예방 약제 효능 스크리닝 시스템이 필요한 실정이다.

본연구에서 꿀벌 애벌레의 실험실 내 인공배양을 이용한 낭충봉아부패병 바이러스의 실험실내 인공배양을 성공함으로써 치료제 및 예방약 등에 대한 신속하고 객관적인 효과검증 방법을 개발하게 되었다.

이번 낭충봉아부패병에 대한 약제 효능평가(Screening System) 개발로 꿀벌 애벌레의 실험실 내 인공배양 기술 확립과 배양된 애벌레를 이용한 질병 원인바이러스 배양증식시험, 그리고 이 시스템을 이용한 낭충봉아부패병 치료후보물질의 성공적인 효능검증 확인을 기대할 수 있게 되었다.

그동안 꿀벌 낭충봉아부패병 바이러스를 배양 할 수 있는 기술이 세계적으로 개발되지 않아 각종 치료후보물질에 대한 효과를 측정하는데 오랜 시간과 경비가 소요되어 낭충봉아부패병 치료 및 예방 약제 효능 스크리닝 시스템이 필요한 실정이다.

본연구에서 꿀벌 애벌레의 실험실내 인공배양을 이용한 낭충봉아부패병 바이러스의 실험실내 인공배양을 세계 최초로 성공함으로써 치료제 및 예방약 등에 대한 신속하고 객관적인 효과검증 방법을 개발하게 되었다.

따라서 꿀벌 애벌레의 실험실내 인공배양법을 개발하여 낭충봉아부패병 바이러스의 실험실내 인공배양법을 개발하고, 치료제 및 예방약 등에 대한 신속하고 객관적인 효과검증이 가능하게 되었다.

(1). 실험실내 꿀벌 애벌레 배양

소비내의 꿀벌 애벌레를 세포배양용 24 well plate로 옮긴 후 37°C, 90% 습도 조건에서 배양하였다. 개량 인공사양액(D-glucose 6%, D-fructose 6%, yeast extract 1%, Grace medium 33%, Royal jelly 50%)을 매일 꿀벌 애벌레에게 100 μ l 씩 주어 사양하였다.

(2). 꿀벌 애벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 분리

현재 국내 토종벌에서 발생 중인 낭충봉아부패병 바이러스에 감염된 애벌레를 PBS(Phosphate buffered saline)를 첨가하여 막자사발로 균질화 하였다.

균질액을 0.45 μ m, 0.2 μ m의 실린지 필터를 이용하여 필터한 후 바이러스를 농축시키기 위해 Centrifugal filter units을 사용하여 32500 rpm에서 15시간 원심 분리 후 농축된 바이러스를 수거하였다.

(3). 꿀벌 애벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 증식

분리·농축한 낭충봉아부패병 바이러스를 배양중인 꿀벌 애벌레에 감염시킨 후 3일간 배양하였다.

(4). 꿀벌 애벌레에 낭충봉아부패병 바이러스 증식 확인

Real Time PCR법을 이용하여 바이러스의 농도(copies/ μ l)를 측정함으로써 바이러스의 증식을 경시적으로 확인하였고, 낭충봉아부패병 바이러스 비접종군과 비교 시 바이러스 접종 군에서 낭충봉아부패병 바이러스의 유의성 있는 증식을 확인하였다.

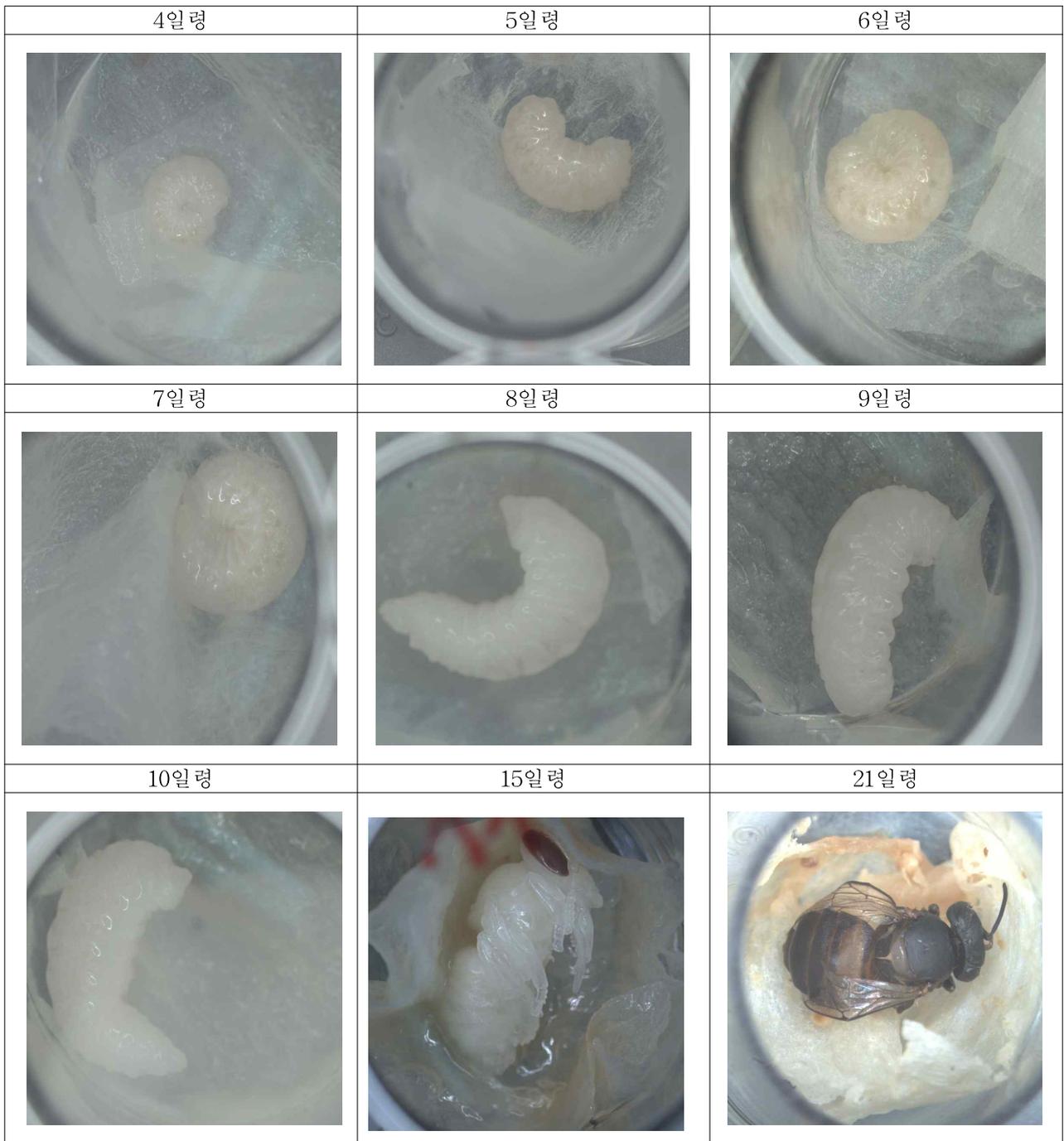


Figure 7. 애벌레 실험실내 인공배양 일령별 상태

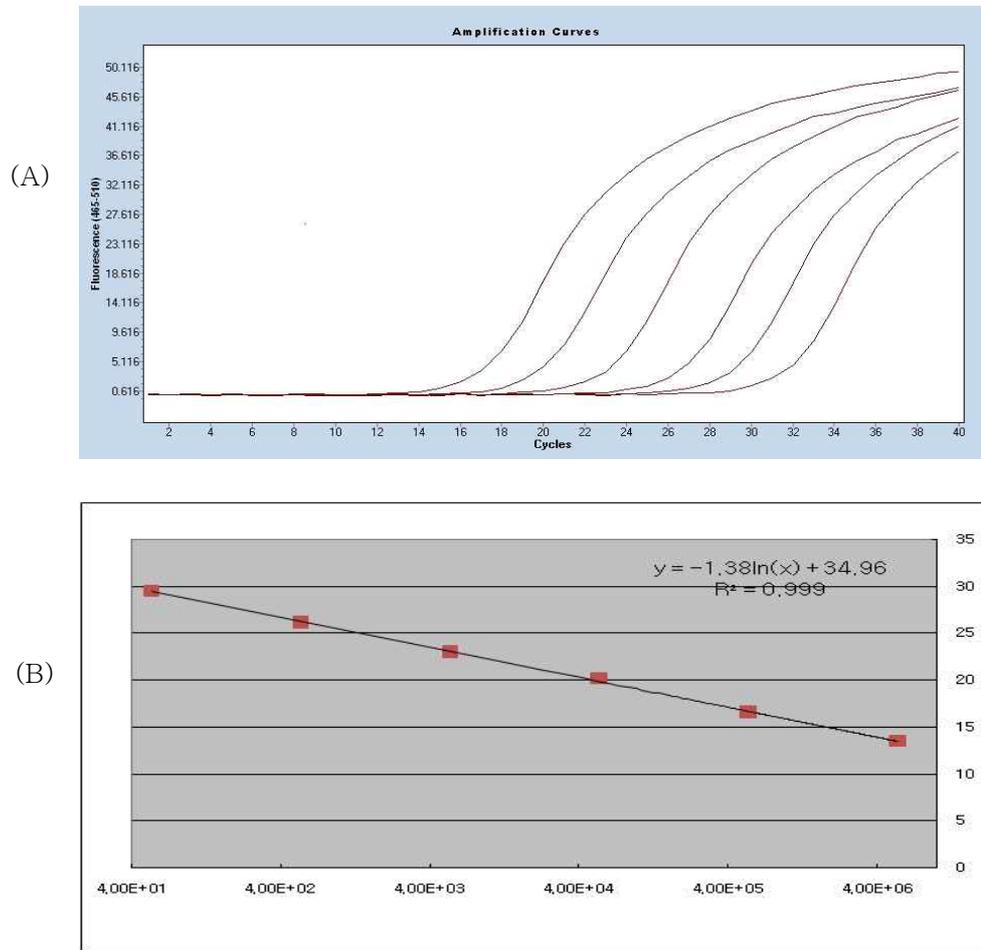


Figure 8.

바이러스 증식확인을 위한 Real Time PCR법 확립

라. 이산화염소 효능평가 실험

이산화염소의 성봉에 대한 낭충봉아부패병 예방 및 치료 효능을 평가하기 위하여 각 군당 10마리의 성봉을 꿀벌 채집용 케이스에서 사육하였으며 사양 및 시약 투여는 스펀지에 흡수시킴으로써 진행되었다.

비감염군은 50% 설탕물 사양하였고 SBV 인공감염 전에 감염+전처리군에게 이산화염소 100ppm을 희석한 설탕물을 사양하였다. 그리고 비감염군을 제외한 모든 군에 SBV suspension(+사양액)을 먹여 인공감염 시킨 후 감염+후처리군에게 이산화염소 100ppm을 희석한 설탕물을 사양하였다.

이산화염소의 유충에 대한 낭충봉아부패병 예방 및 치료 효능을 평가하기 위하여 세포배양용 24well plate에 이충한 꿀벌 유충을 개량사양액을 먹이며 1일 동안 순화시킨 후 사양액 및 시약은 직접투여하였다.

비감염군, 감염군, 감염 + 전처리군, 감염 + 후처리군으로 나누어 실험하였다. SBV 인공감염 하루 전에 SBV감염+전처리군에 마리당 이산화염소 100ppm 농도의 50%설탕물 50 μ l를 투여하였다. 그리고 비감염군을 제외한 모든 그룹에 SBV suspension(+사양액) 20 μ l를 두 번 투여함으로써 낭충봉아부패병 감염을 유도하였다.

감염 하루 후 SBV감염+후처리군에 마리당 이산화염소 100ppm 농도의 50%설탕물 50 μ l를 투여하였다. 실험은 감염 후 7일 동안 진행하였으며 매일 성봉과 유충의 생존률을 확인하였다.



Figure 9. SBV감염 애벌레에 대한 이산화염소 효능평가 실험

Table 2. 이산화염소 효능평가실험, 성봉 생존률

	성봉 생존률 (%)					
	-1 day	0 day	1 day	3 day	5 day	7 day
비감염군	94.4	94.4	83.3	83.3	83.3	83.3
SBV 감염군	100.0	88.9	55.6	50.0	50.0	44.4
SBV 감염 +이산화염소 전처리	100.0	100.0	94.4	77.8	66.7	55.6
SBV 감염 +이산화염소 후처리	100.0	100.0	88.9	66.7	61.1	55.6

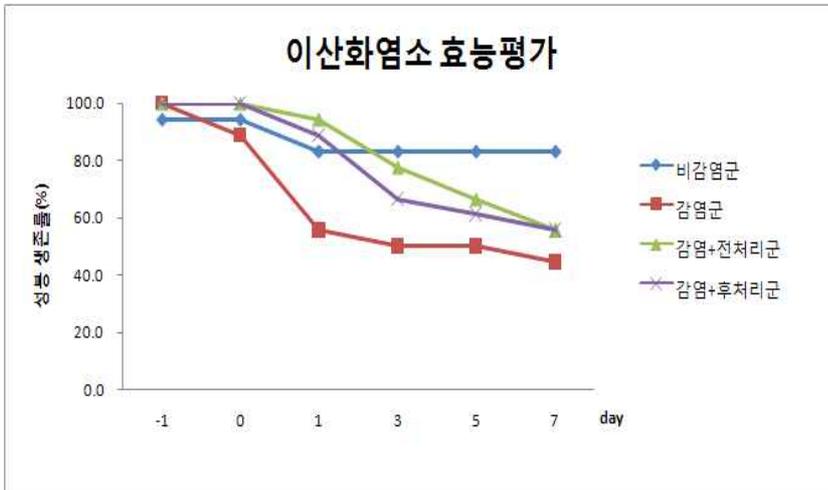


Figure 10. 이산화염소 효능평가실험, 성봉 생존률 그래프

Table 3. 이산화염소 효능평가실험, 애벌레 생존률 표

	꿀벌 유충 생존률 (%)					
	-1 day	0 day	1 day	3 day	5 day	7 day
비감염군	100.0	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4
SBV 감염군	100.0	88.9	88.9	44.4	44.4	27.8
SBV 감염 +이산화염소 전처리	100.0	100.0	88.9	72.2	66.7	66.7
SBV 감염 +이산화염소 후처리	100.0	100.0	94.4	83.3	77.8	77.8

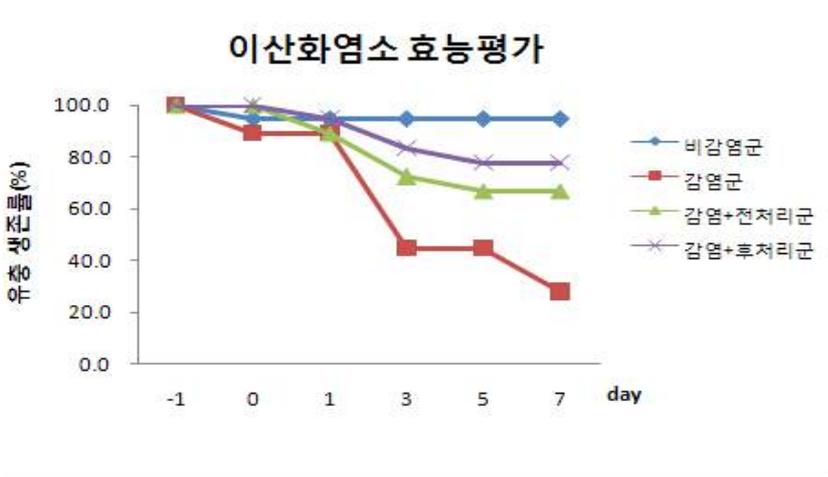


Figure 11. 이산화염소 효능평가, 유충 생존률 그래프

마. 실험 성봉 및 애벌레 내 KSBV 유전자 발현량 확인

7일 간 이산화염소 효능평가실험을 진행한 후 실험 성봉과 애벌레를 그룹 별로 sampling하여 PBS에 유제하였다.

Viral gene-spine™ Viral DNA/RNA extraction kit(Intron)를 이용하여 유제액 150µl에서 Total RNA를 추출한 후 Superscript III First strand(Invitrogen)로

cDNA를 합성하였다. 그리고 Hot taq PCR Kit(Enzynomics)를 이용해 PCR를 수행하고 전기영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

PCR 실험을 위해 사용한 Primer는 KSBV F
5'-CATCTTCTTTAGCACCAGTATCCA-3', KSBV R
5'-CATCTTCTTTAGCACCAGTA

TCCA-3'이며 Predenaturation step 95°C 10min(1cycle), 95°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec(40cycle), Final extension step 72°C 10min (1cycle) 조건으로 PCR을 수행하였다.

그 결과 감염군에 비해 감염+전처리군, 감염+후처리군이 낮은 KSBV의 유전자 발현을 보였다. 그리고 발현한 유전자의 양을 정량분석하기 위하여 One step SYBR® Primer Script™ RT-PCR Kit II(TAKARA BIO)를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다.

Real-time PCR 조건은 42°C 50min(1cycle), 95°C 10min(1cycle), 95°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec (40cycle), melting curve analysis step 65°C ~95°C 이다.

이산화염소 효능평가 실험하였던 성봉과 유충에서 감염+전처리군, 감염+후처리군의 KSBV 유전자양이 감염군에 비해 낮은 유전자 발현을 보였다.

이 결과를 통해 이산화염소가 성봉과 유충의 KSBV 감염 예방 및 치료 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

Table 4. 유전자증폭에 사용한 낭충봉아부패병 바이러스 유전자 Primer set

Virus	Primer name	Primer sequence (5'→3')	PCR Product (bp)
KSBV	KSBV-F	GACCAAGAAGGGAATCAG	123
	KSBV-R	CATCTTCTTTAGCACCAGTATCCA	
CSBV	CSBV-F	GGATGAAAGGAAATTACCAG	426
	CSBV-R	CCACTAGGTGATCCACACT	

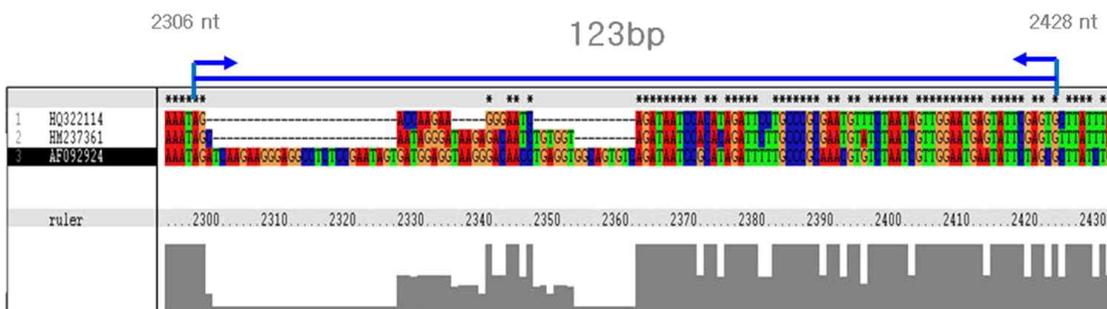


Figure 12 . The location of detection primers on KSBV genome.

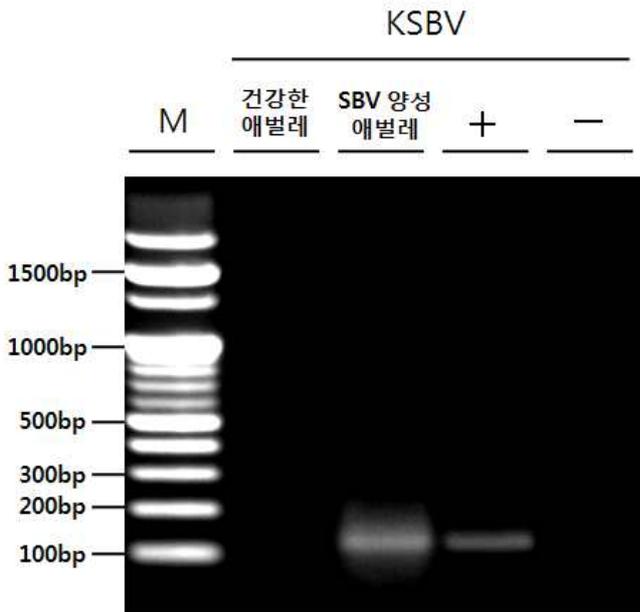


Figure 13. KSBV 양성 애벌레 유전자증폭 후 DNA 전기영동 결과

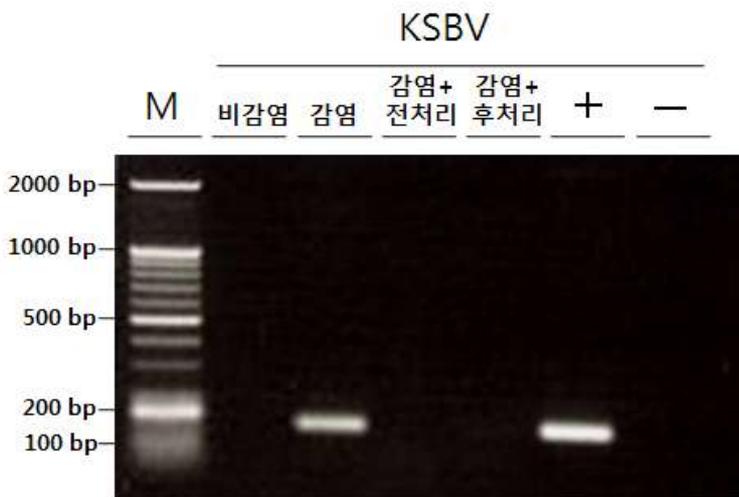


Figure 14. 이산화염소 효능평가 실험 애벌레 유전자증폭 후 DNA 전기영동 결과

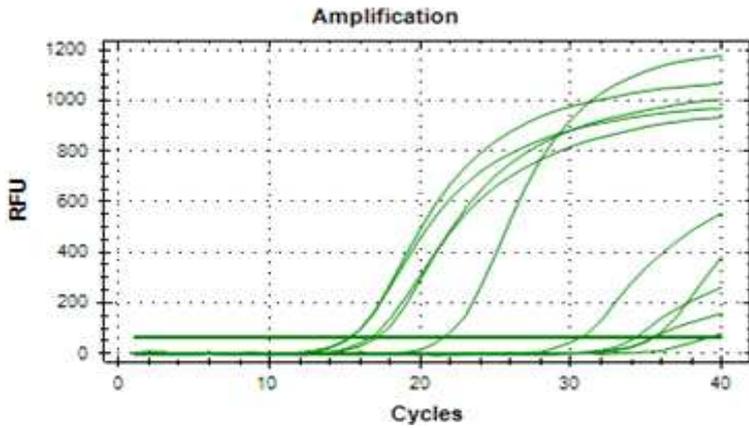


Figure 15. SBV 감염 성봉에 대한 이산화염소 효능평가 첫 번째 실험, Real-time PCR 유전자 증폭곡선

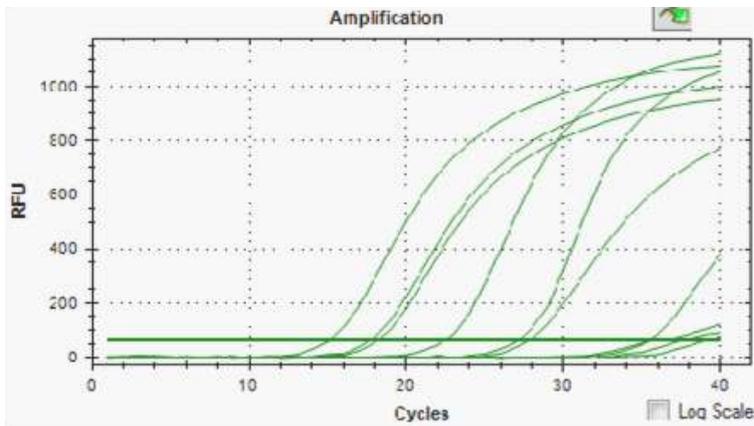


Figure 16. SBV 감염 성봉에 대한 이산화염소 효능평가 두 번째 실험, Real-time PCR 유전자 증폭곡선

Table 5. SBV감염 성봉에 대한 첫 번째 이산화염소효능평가 실험 Real-time PCR 결과

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
b-actin	비감염-성봉1	*				15.09	0.00000
b-actin	감염-성봉1					18.15	0.00000
b-actin	감염+전처리-성봉1					17.67	0.00000
b-actin	감염+후처리-성봉1					27.79	0.00000
ksbv	비감염-성봉1	*	1.00000	0.00000	0.00000	37.57	0.00000
ksbv	감염-성봉1		307218.57549	0.00000	0.00000	22.40	0.00000
ksbv	감염+전처리-성봉1		8294.41849	0.00000	0.00000	27.12	0.00000
ksbv	감염+후처리-성봉1		22469.22249	0.00000	0.00000	35.81	0.00000

Table 6. SBV감염 성봉에 대한 이산화염소효능평가 두 번째 실험
Real-time PCR 결과

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
b-actin	비감염-성봉2	*				15.28	0.00000
b-actin	감염-성봉2					17.01	0.00000
b-actin	감염+전처리-성봉2					15.18	0.00000
b-actin	감염+후처리-성봉2					16.58	0.00000
ksbv	비감염-성봉2	*	1.00000	0.00000	0.00000	35.36	0.00000
ksbv	감염-성봉2		50946.07854	0.00000	0.00000	21.45	0.00000
ksbv	감염+전처리-성봉2		2.10108	0.00000	0.00000	34.19	0.00000
ksbv	감염+후처리-성봉2		70.04274	0.00000	0.00000	30.53	0.00000

Table 7. SBV감염 성봉에 대한 이산화염소효능평가 실험 Real-time PCR 결과
평균값

	1st	2nd	Average	STDEV
비감염군	1,00000	1,00000	1,00000	0,00000
감염군	307218,5755	50946,07854	179082,327	181212,0204
감염+전처리군	8294,41849	2.10108	4148,259785	5863,553872
감염+후처리군	22469,22249	70,04274	11269,63262	15838,61189

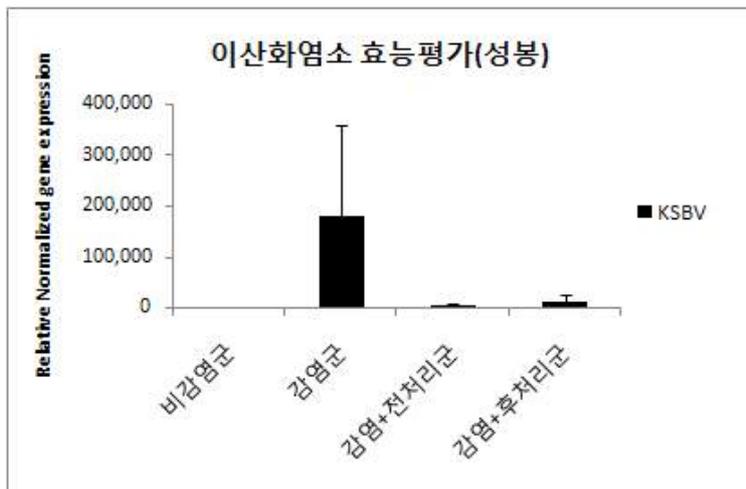


Figure 17. SBV 감염 성봉에 대한 이산화염소 효능평가실험,
Normalized gene expression 그래프

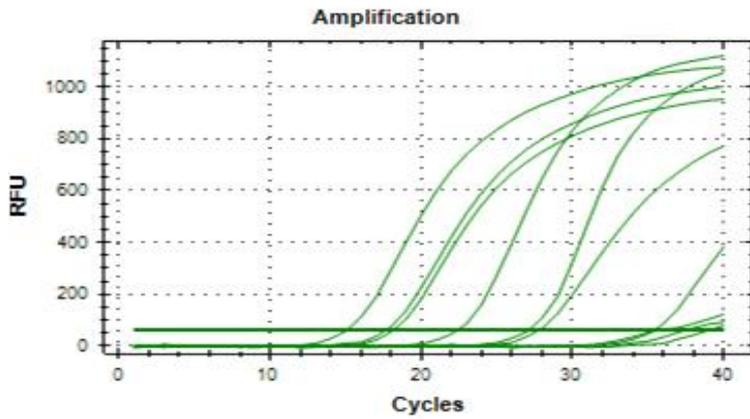


Figure 18. SBV 감염 유충에 대한 이산화염소 효능평가 첫 번째 실험, Real-time PCR 유전자 증폭곡선

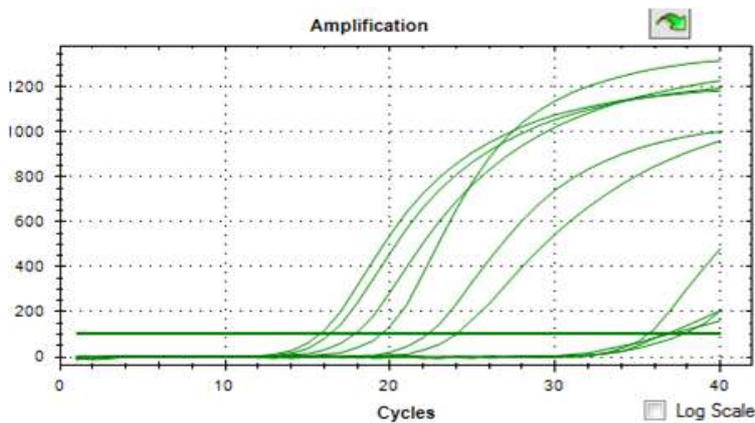


Figure 19. SBV 감염 유충에 대한 이산화염소 효능평가 두 번째 실험, Real-time PCR 유전자 증폭곡선

Table 8. SBV감염 유충에 대한 첫 번째 이산화염소효능평가 실험 Real-time PCR 결과

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
b-actin	비감염-유충1	*				16,34	0,00000
b-actin	감염-유충1					15,73	0,00000
b-actin	감염+전처리-유충1					17,85	0,00000
b-actin	감염+후처리-유충1					24,02	0,00000
ksbv	비감염-유충1	*	1,00000	0,00000	0,00000	36,96	0,00000
ksbv	감염-유충1		122833,33328	0,00000	0,00000	19,45	0,00000
ksbv	감염+전처리-유충1		75648,18533	0,00000	0,00000	22,27	0,00000
ksbv	감염+후처리-유충1		120,77039	0,00000	0,00000	37,73	0,00000

Table 9. SBV감염 유충에 대한 두 번째 이산화염소효능평가 실험
Real-time PCR 결과

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
b-actin	비감염-유충2	*					
b-actin	감염-유충2						
b-actin	감염+전처리-유충2						
b-actin	감염+후처리-유충2						
ksbv	비감염-유충2	*	1,00000	0,00000	0,00000	38,88	0,00000
ksbv	감염-유충2		542700,49467	0,00000	0,00000	18,71	0,00000
ksbv	감염+전처리-유충2		332505,65476	0,00000	0,00000	18,88	0,00000
ksbv	감염+후처리-유충2		156234,08686	0,00000	0,00000	20,46	0,00000

Tabel 10. SBV감염 유충에 대한 이산화염소효능평가 실험 Real-time
PCR 결과 평균값

	1st	2nd	Average	STDEV
비감염군	1,00000	1,00000	1,00000	0
감염군	122833,33328	542700,4947	332766,91398	296890,917
감염+전처리군	75648,18533	332505,6548	204076,92004	181625,6584
감염+후처리군	120,77039	156234,0869	78177,42863	110388,7847

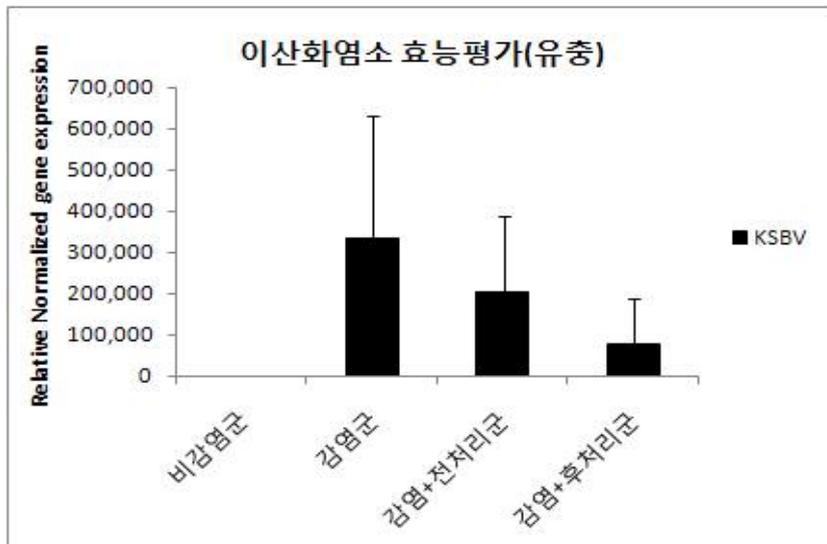


Figure 20. SBV 감염 유충에 대한 이산화염소 효능평가실험,
Normalized gene expression 그래프

4. 야외 봉군에 대한 이산화염소의 낭충봉아부패병 바이러스 억제 효능 평가 실험

야외 낭충봉아부패병감염 봉군에 대한 이산화염소의 효능을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다.

봉군은 각각 감염군 비처치군(I noT), 감염군 처치군(IT), 비감염군(noI noT), 비감염군 처치군(noI T)으로 나누어 실험하였다.

낭충봉아부패병 감염을 유도하기 위하여 낭충봉아부패병 양성을 띤 꿀벌 유충을 유제하고 50% 설탕물에 SBV가 $1 \times 10^{7-8}$ copies/ml 되도록 낭충봉아부패병 양성 애벌레 유제액을 희석하여 각 봉군에 동량으로 스프레이 접종하였다.

치료약제로써 이산화염소제제는 사양액(50%설탕물) 20L에 혼합하여 사양하였다.

그 후 2주 동안 낙하 벌의 수를 기록하였으며 실험 결과, 이산화염소제제를 치료한 군(감염군 처치군, IT)의 낙하 벌 수가 감염군 비처치군(I noT)에 비해 낮으며 55.6%의 치료효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이 결과를 통해 이산화염소가 KSBV 감염 억제효과를 일으킨 것으로 보여진다.

Table 6. 야외 벌통에서 이산화염소의 바이러스 감염 억제능 평가 실험(낙하 벌 수)

Group*	Number of Frames**	Mean Number of Dead bees/days1												Mean Live L. at day14	treat. Rate(%)
		-1	0-4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
I noT	2X3	0	0	0.6	1.2	7.8	9.0	21.0	17.2	6.3	10.2	6.3	2.1	23.2	22.1
IT	2X3	0	0	0	0.3	4.2	5.1	14.7	18.2	2.1	3.3	3.3	1.8	62.9	55.6
noI noT	2X3	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	81.3	99.6
noI T	2X3	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0.3	0	0	77.4	99.2

※ I noT: 감염군 비처치군, IT: 감염군 처치군, noI noT: 비감염군, noI T: 비감염군 처치군

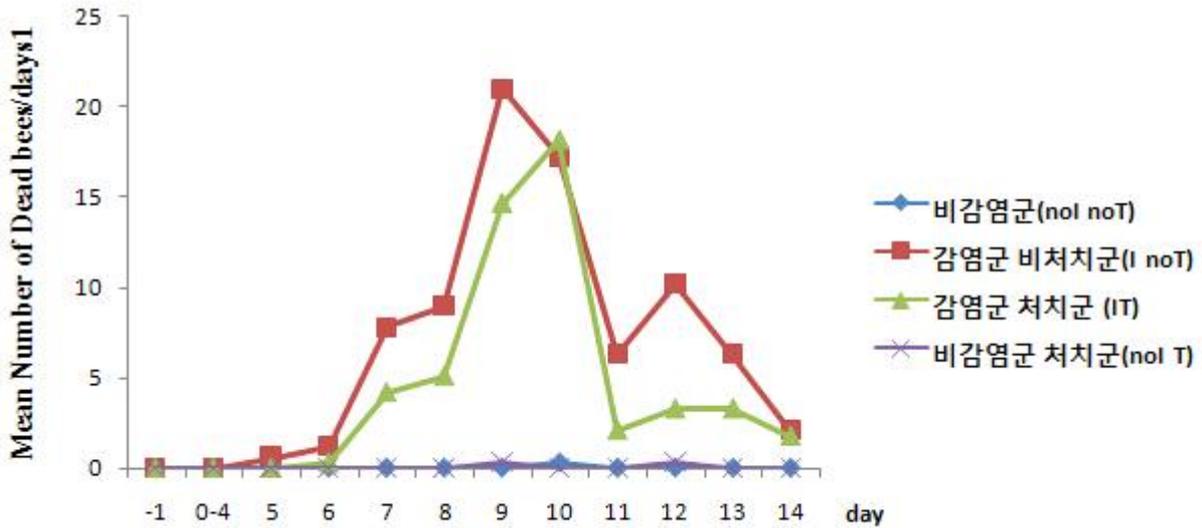


Figure 21. 야외 벌통에서 이산화염소의 바이러스 감염 억제능 평가 실험, 낙하 벌 수 평균 그래프

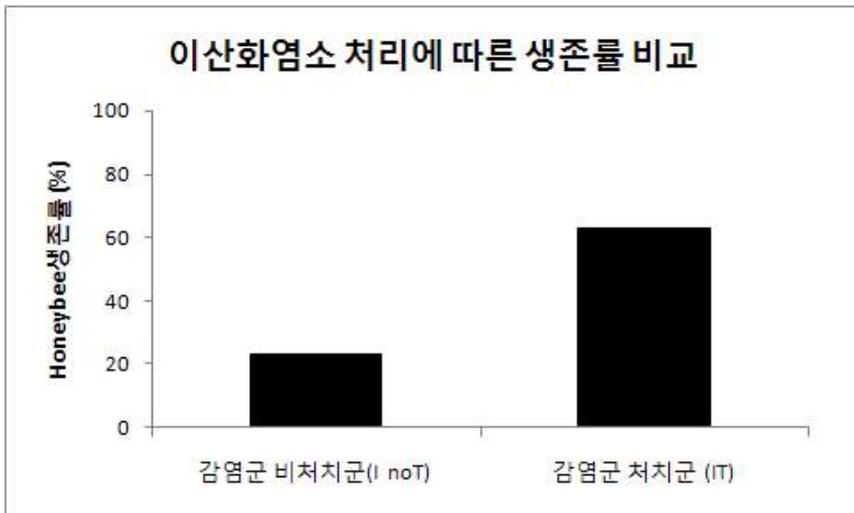


Figure 22. 이산화염소 처리 유무에 따른 생존률 비교 그래프



Figure 23. 스프레이 방법을 이용한 낭충봉아부패병의 집중

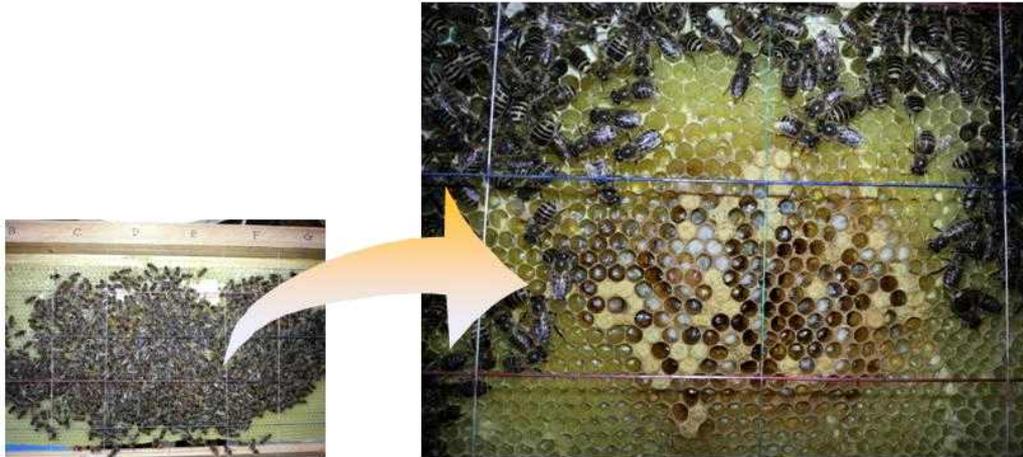


Figure 24. 개체수 확인 및 내검을 위한 소비 구획 분석

제 2 절 토종벌 낭충 봉아 부패병 예방 및 소독용 소형 저가(low-cost) 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 개발

1. 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 제조- Dual Type

가. Dual Type 소독기 구조 및 원리

아래 Fig. 25 의 도식에서 볼 수 있듯이 Dual Type 소독기는 도식의 오른쪽 B 구획에서 이산화염소를 신속하게 방출하여 1차적으로 벌통의 내부(하단부)를 소독하고, 도식의 왼쪽 A 구획에서는 이산화염소를 실리카겔(silica gel) 과 활성탄(activated charcoal, granula) 에 흡착시켜 서서히 방출(slow-releasing) 시킴으로써 장기적으로 출입하는 벌 및 벌통 내부를 바이러스로부터 차단하는 원리로 설계되었다.

이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 dimension 은 아래와 같으며 재질은 아크릴로 제작되었다.

가로 12 cm 깊이 5 cm 높이 12cm (모두 내부 길이)

이산화염소 발생은 아래의 여러 가지 방법이 가능하나, 본 연구에서는 아염소산 나트륨(sodium chlorite), sodium dichloroisocyanate, 구연산(citric acid) 반응 방식, 즉 3-component 방식을 채택하였다.

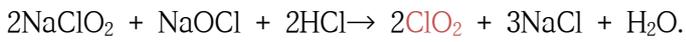
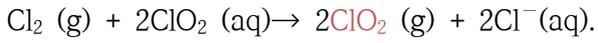


기타 이산화염소 생산 process

대량 생산 process



중소량 생산 process



전기 분해 방식 (electrochemical)

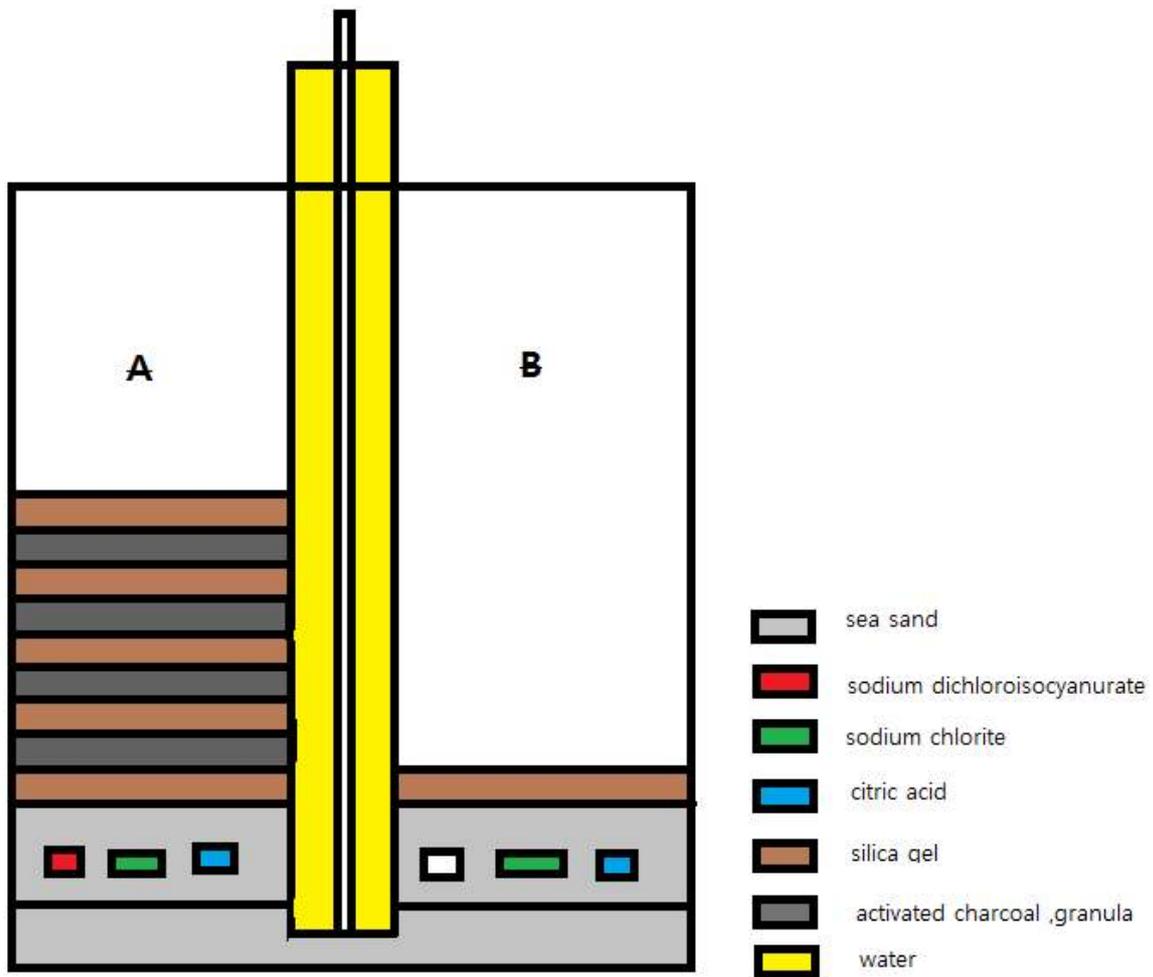


Fig. 25. 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 구조

상기 여러 방식 중에서 중소형으로 원료가 모두 고체이고, 상온에서 안정하고 반응이 신속하고, 수율이 가장 우수한 것으로 3-component를 채택하였다.

상기 Dual Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 B 구획에는 최하단에 1.5 cm 높이로 sea sand를 채워넣고 그 위에 이산화염소 발생 원료 물질 3종을 서로 접촉하지 않게 놓는다.

그후 다시 3 cm 높이로 sea sand를 채워넣는다.

상기 Dual Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 A 구획에도 최하단에 1.5 cm 높이로 sea sand를 채워넣고 그 위에 이산화염소 발생 원료 물질 3종을 서로 접촉하지 않게 놓는다.

그후 다시 3 cm 높이로 sea sand를 채워넣는다.

A 구획에는 서방형 (slow-releasing)방출을 위하여 이산화염소 흡착력이 우수한 실리카겔(silica gel) 20 g 과 활성탄(activated charcoal, granula) 15 g을 층층이 번갈아 쌓는다.

여기서 실리카겔은 이산화염소가 흡착되면 노란색을 띄므로, 이산화염소의 방출을 관찰할 수 있는 장점이 있다.

소독기 kit의 가운데에 설비된 물 공급 원통에 물을 채우고 가운데 막대를 위로 빼내면 물이 A,B 구획으로 공급되어 1차적으로 모래를 적신후, 이산화염소 발생용 3종 원료를 용해한다.

용해되면 바로 이산화염소가 발생되고, B 구획에서는 흡착제가 없으므로 바로 방출되고, A구획에서는 흡착제에 흡착되면서 서서히 방출된다.

신속 방출 이산화염소는 별통 내부 하단을 살바이러스 소독하고, 서서히 방출되는 이산화염소는 출입하는 별을 살 바이러스 한다.

이와같은 kit를 활용하면, 별을 각종 바이러스, 세균으로부터 안전하게 보호 할 수 있다.

나. 이산화염소 발생, 방출량 측정

상기 소독기 kit에서, 이산화염소 발생용 원료 3종의 양에 따른 방출량을 측정하기 위해 가로, 깊이, 높이 공히 65 cm 크기의 chamber 안에 소독기 kit를 넣고 원료양에 따른 방출 농도를 측정하였다.

측정기: 미국 RAE 사 제품 모델명 PGM 1187

(1) 신속 발생 (B 구획) 농도 측정

소독기 kit에 물을 투입한 후 1차적으로 신속 발생 이산화염소 방출량을

chamber에서 측정하였다(물 투입 후 시간 간격 별로)



이산화염소의 살 바이러스 농도의 표준으로는 Ogata .N. 등의 논문을 참조하여, 별에 해가 없는 점을 감안하여 0.03 ppm 내외 값을 기준으로 하였다.

J Gen Virol. 2008 Jan;89(Pt 1):60-7.

Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection.

Ogata N, Shibata T



원료	분자량(M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/1000	0.66
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/1000	0.67
citric acid	210.14	2	1/1000	0.42

Table 7. 원료 3종의 투입량 (1/1000 배수)

배수	5분	10분	15분	20분	30분	45분	1시간
1/1,000	0.6	1.0	1.0	0.8	0.5	0.1	0.05
1/2,000	0.5	1.0	1.0	0.8	0.4	0.1	0.1
1/3,000	0.3	0.9	0.9	0.6	0.2	0.1	0.0
1/4,000	0.3	0.8	0.9	0.5	0.1	0.1	0.0
1/5,000	0.2	0.5	0.5	0.3	0.1	0.06	0.0
1/6,000	0.2	0.4	0.4	0.2	0.1	0.04	0.0
1/7,000	0.2	0.2	0.2	0.1	0.05	0.02	0.0
1/8,000	0.1	0.2	0.2	0.1	0.03	0.01	0.0
1/9,000	0.1	0.1	0.1	0.06	0.02	0.01	0.0
1/10,000	0.1	0.1	0.1	0.04	0.02	0.01	0.0

Table 8. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm

원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 신속 발생 목적만 고려 시에는, 즉 신속한 별통 소독에는 1/1,000 에서 1/3,000배수가 적절한 것으로 사료된다.

그러나, 안전성 등을 고려하면 배수가 늘어난다.

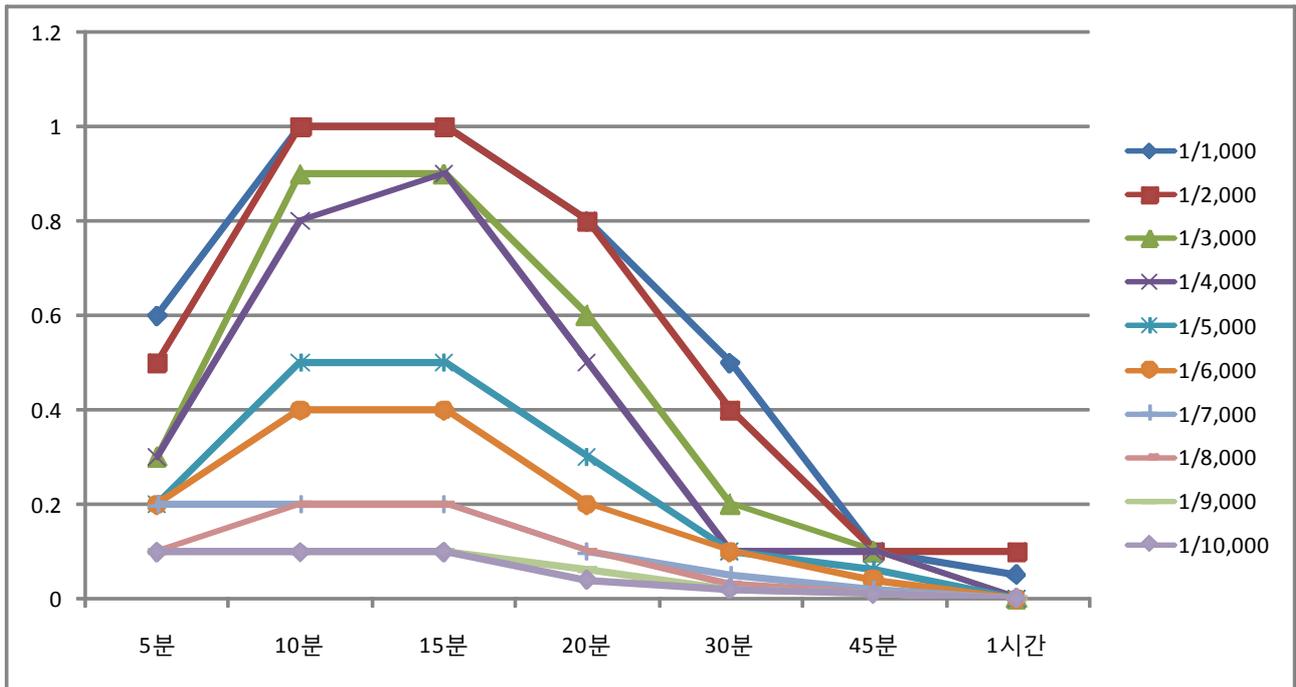
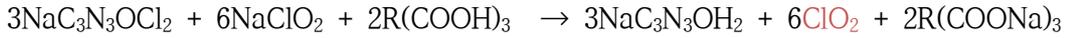


FIG.26. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm (신속형 B 구획)

(2) 서방 발생 (A 구획) 농도 측정

소독기 kit에 물을 투입한 후 2차적으로 서방형 발생 이산화염소 방출양을 chamber에서 측정하였다(물 투입 후 날짜 간격 별로)

이산화염소의 살 바이러스 농도의 표준으로는 Ogata .N. 등의 논문을 참조하여, 벌에 해가 없는 점을 감안하여 0.03 ppm 내외를 기준으로 하였다.



원료	분자량(M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/1000	0.66
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/1000	0.67
citric acid	210.14	2	1/1000	0.42

Table 9. 원료 3종의 투입량 (1/1000 배수)

배수	1일	2일	5일	10일	20일	30일	60일
1/1,000	0.7	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	0.1
1/2,000	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.2	0.1
1/3,000	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.1
1/4,000	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.2	0.1
1/5,000	0.5	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1
1/6,000	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0
1/7,000	0.3	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0
1/8,000	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
1/9,000	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
1/10,000	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0

Table 10. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm) 측정 최대 limit : 1.0 ppm

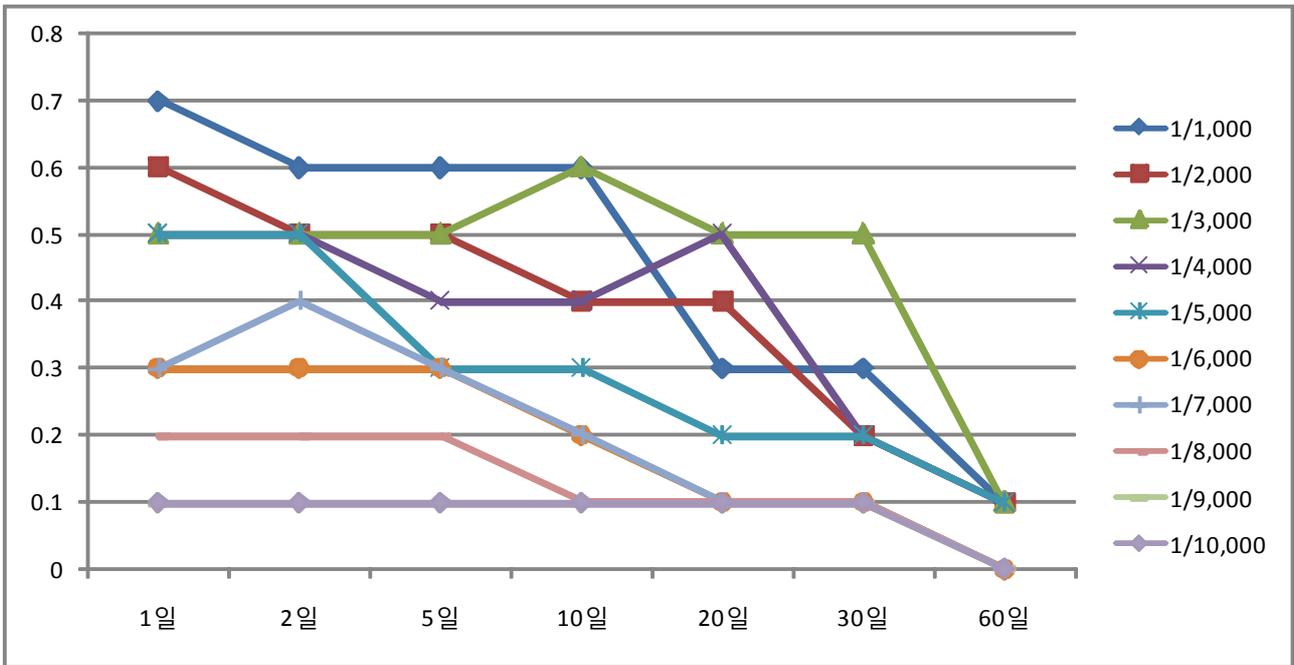


FIG.27. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm (서방형 A 구획)

신속 발생과 마찬가지로, 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 서방 발생 목적, 즉 장기적인 바이러스 차단 및 부패병 예방에는 1/6,000에서 1/8,000 배수가 적절한 것으로 사료된다.

2. 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기 제조- Single Type

가. Single Type 소독기의 모양(shape) 및 구조

아래 FIG.26 의 도식에서 볼 수 있듯이 **Single Type** 소독기는 Dual Type 소독기가 이중 구조로 오른쪽 B 구획에서 이산화염소를 신속하게 방출하여 1차적으로 별통의 내부(하단부)를 소독하고, 도식의 왼쪽 A 구획에서는 이산화염소를 실리카겔(silica gel) 과 활성탄(activated charcoal, granula) 에 흡착시켜 서서히 방출(slow-releasing) 시킴으로서 장기적으로 출입하는 벌 및 벌통 내부를 바이러스로부터 차단하는 원리로 설계된 반면에 단일 구조로서 이산화염소를 방출하는 양을 조절할 수 있는 특수 캡을 활용한다.

즉, 이산화염소를 발생하는 원료가 포함된 겔(gel)형태의 물질을 플라스틱

병에서 사용 직전 제조하고, 방출 제어 기능이 있는 캡을 활용하여, 신속 방출시는 캡을 100% 열고, 서방 방출시는 캡을 돌려서 원하는 양의 방출을 제어한다 (75%,50%.25%.5% 등)



A-shape 소독기 Kit



B-shape 소독기 Kit



C-shape 소독기 Kit

Single-Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의

dimension 은 아래와 같으며 재질은 PP로 제작되었다.

A-shape	6.0	6.0	100
B-shape	4.5	7.5	100
C-shape	5.0	7.0	100

Table.11. Single-Type 소독기의 dimension

나. Single Type 소독기 이산화염소 발생 원리

이산화염소 발생은 아래의 여러 가지 방법이 가능하나, Single-Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기에서는 유통 및 보관을 고려하여 간결하고 원료의 양을 줄인 , 아염소산 나트륨(sodium chlorite) , 구연산(citric acid) 반응 방식, 즉 2-component 방식을 채택하였다.



여기서, 상기 Dual-Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기와 Single-Type 이산화 염소 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 중요한 차이는, 그 구조뿐 아니라, 이산화염소 발생 방식에 있다.

Dual-Type 소독기는 제품에 이산화염소 발생 원료를 모두 넣고, 소비자(토종별 농가 종사자)가 사용 직전에 물을 투여하여 발생시키는 방식을 채택하였다.

Single-Type 에서는 100ml 플라스틱 용기와 소량 (20 g 내외)의 분말이 들어있는. 라면 스프 형태의 첨가물이 별도로 들어 있다.

즉, 소비자(토종별 농가 종사자)가 사용 직전에 소량 분말 포장을 플라스틱 용기에 투여하여 용기내의 수용액을 겔(gel)화 시키는 방식이다.

이는, 상품화를 위한 유통, 보관을 고려한 것으로서, 미리 겔(gel)화 시킬 경우, 이산화염소가 용기내에서 발생하므로, 유통 보관에 어려움이 생길 수 있기 때문이다.

본 연구에서 개발된 Single-Type 소독기는 겔(gel)화와 동시에 이산화염소 발생용 두 원료, sodium chlorite 와 citric acid 가 비로소 만나서 반응하게 되므로 , 소비자가 겔(gel)화 하기 전에는 이산화염소가 발생되지 않는 장점이 있어 유통 보관이 2년 이상 가능 한 것이다.

나. 이산화염소 발생, 방출량 측정

상기 Single-Type 소독기 kit에서, 용기 shape 와 이산화염소 발생용 원료 2종의 양, 물과 고흡수성 수지의 양에 따른 방출량을 측정하기위해 가로, 깊이, 높이 공히 65 cm 크기의 chamber 안에 소독기 kit를 넣고

원료양에 따른 방출 농도를 측정하였다.

측정기: 미국 RAE 사 제품 모델명 PGM 1187

(1) 신속 발생 농도 측정

Single-Type 소독기 kit의 겔(gel)화 방식에 따라 이산화염소를 겔(gel) 상태에서 발생시킨 후, 방출 조절 캡을 100% open 한 후 발생 이산화염소 방출량을 상기 규격 chamber에서 측정하였다(겔(gel)화 후 시간 간격 별로).

고흡수성 수지로는 국내 TPY 사의 GE 800F와 GS 1000I 두가지를 사용하였다

이산화염소의 살 바이러스 농도의 표준으로는 Ogata .N. 등의 논문을 참조하여, 별에 해가 없는 점을 감안하여 0.03 ppm 내외 값을 기준으로 하였다.



유기산으로는 citric acid(구연산)과 oxalic acid (개미산)을 사용하였다.

adipic acid 는 물에 대한 용해도가 낮아 사용하지 않았다.



① Citric acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
citric acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 12. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	citric acid (g)	5분	10분	15분	20분	30분	겔(gel) 이산화염소 농도(ppm)
2.6	2.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	9,106
2.08	1.6	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	6,231
1.69	1.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	4,281
1.3	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	1,911
1.04	0.8	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	804

Table 13. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GE 800F의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)

◆결과:

원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 겔(gel)내 농도가 급격하게 감소하여, 이산화염소의 방출 량도 급격하게 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 신속 발생 목적에는 세번째칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다.

② Citric acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
citric acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GS1000I	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 14. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	citric acid (g)	5분	10분	15분	20분	30분	겔(gel) 이산화염소 농도(ppm)
2.6	2.0	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	8,236
2.08	1.6	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	5,900
1.69	1.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	3,984
1.3	1.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	1,936
1.04	0.8	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	902

Table 15. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GS1000I의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm) 측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다. 이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다. 결과를 고찰하면, 신속 발생 목적에는 세 번째 칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다. 단, 고흡수성 수지 GS1000I는 GE 800F에 비해 이산화염소 발생, 방출량이 조금 낮아졌다

③ Oxalic acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 방출량

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
oxalic acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 16. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	oxalic acid (g)	5분	10분	15분	20분	30분	겔(gel) 이산화염소 농도(ppm)
2.6	2.0	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	8,600
2.08	1.6	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	6,231
1.69	1.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0	3,922
1.3	1.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	1,978
1.04	0.8	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	952

Table 17. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GE 800F의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다. 이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다. 결과를 고찰하면, 신속 발생 목적에는 세번째칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다. 단, 유기산으로서 oxalic acid는 citric에 비해 이산화염소 발생, 방출량이 조금 낮아졌다

④ Oxalic acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
oxalic acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GS1000I	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 18. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	oxalic acid (g)	5분	10분	15분	20분	30분	겔(gel) 이산화염소 농도(ppm)
2.6	2.0	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	7,251
2.08	1.6	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	5,450
1.69	1.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	3,223
1.3	1.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	1,243
1.04	0.8	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	622

Table 19. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GS1000I의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다. 이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다. 결과를 고찰하면, 신속 발생 목적에는 세 번째 칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다. 단, 고흡수성 수지 GS1000I는 GE

800F에 비해 또한 유기산으로서 oxalic acid는 citric에 비해 이산화염소 발생, 방출량이 조금 낮아졌다

(2) 서방 발생 농도 측정

Single-Type 소독기 kit의 겔(gel)화 방식에 따라 이산화염소를 겔(gel) 상태에서 발생시킨 후, 방출 조절 캡을 25% open 한 후 발생 이산화염소 방출량을 상기 규격 chamber에서 측정하였다(겔(gel)화 후 시간 간격 별로).

고흡수성 수지로는 국내 TPY 사의 GE 800F와 GS 1000I 두가지를 사용하였다

이산화염소의 살 바이러스 농도의 표준으로는 Ogata .N. 등의 논문을 참조하여, 벌에 해가 없는 점을 감안하여 0.03 ppm을 기준으로 하였다.

$15\text{NaClO}_2 + 4\text{R}(\text{COOH})_3 \rightarrow 12\text{ClO}_2 + 4\text{R}(\text{COONa})_3 + 3\text{NaCl} + 6\text{H}_2\text{O}$
 유기산으로는 citric acid(구연산)과 oxalic acid (개미산)을 사용하였다.
 adipic acid 는 물에 대한 용해도가 낮아 사용하지 않았다.

① Citric acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
citric acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 20. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	citric acid (g)	1일	5일	10일	20일	30일	60일
2.6	2.0	0.4	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1
2.08	1.6	0.4	0.4	0.3	0.3	0.1	0.1
1.69	1.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
1.3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
1.04	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-

Table 21. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GE 800F의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)

◆결과:

원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 겔(gel)내 농도가 급격하게 감소하여, 이산화염소의 방출량도 급격하게 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 서방 발생 목적에는 세 번째 칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다.

② Citric acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
citric acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GS1000I	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 22. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	citric acid (g)	1일	5일	10일	20일	30일	60일
2.6	2.0	0.4	0.4	0.3	0.3	0.1	0.1
2.08	1.6	0.4	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
1.69	1.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
1.3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
1.04	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-

Table 23. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GS1000I의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm) 측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 서방 발생 목적에는 세 번째 칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 citric acid 1.3 g이 적절한 것으로 사료된다. 단, 고흡수성 수지 GS1000I는 GE 800F에 비해 이산화염소 발생, 방출 량이 조금 낮아졌다

③ Oxalic acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
oxalic acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 24. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	oxalic acid (g)	1일	5일	10일	20일	30일	60일
2.6	2.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
2.08	1.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
1.69	1.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
1.3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
1.04	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-

Table 25. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GE 800F의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)
측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 서방 발생 목적에는 세 번째 칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 oxalic acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다. 단, 유기산으로서 oxalic acid는 citric에 비해 이산화염소 발생, 방출량이 조금 낮아졌다

④ Oxalic acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 방출양

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.5/1000	2.6
oxalic acid	50		2.4/1000	2.0
고흡수성수지 GS1000I	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 26. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

sodium chlorite (g)	oxalic acid (g)	1일	5일	10일	20일	30일	60일
2.6	2.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
2.08	1.6	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
1.69	1.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
1.3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
1.04	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-

Table 27. 원료 2종 및 고흡수성 수지 GS1000I의 투입에 따른 이산화염소 chamber 내 방출농도(ppm)

측정 최대 limit : 1.0 ppm

◆결과:

여기서도 원료의 양이 감소함에 따라, 이산화염소의 방출량도 감소한다.

이는, 원료의 양이 줄면, 이들이 만나서 반응을 일으켜, 이산화염소를 발생시키는 접촉 확률의 감소에 기인한다.

결과를 고찰하면, 서방 발생 목적에는 세번째칸의 sodium chlorite 1.69 g 과 oxalic acid 1.3 g 이 적절한 것으로 사료된다. 단, 고흡수성 수지 GS1000I는 GE 800F에 비해 또한 유기산으로서 oxalic acid는 citric에 비해 이산화염소 발생, 방출량이 조금 낮아졌다

제 3 절 토종별 낭충 봉아 부패병 예방 및 소독용 소형 저가(low-cost) 이산화 염소 신속, 서방형 (slow-releasing) 겸용 소독기의 토종별에 대한 안전성 및 예방 및 치료 효능 현장 적용 평가

1. 소형 저가(low-cost) 이산화 염소 신속, 서방형 (slow-releasing) 겸용 소독기의 토종별에 대한 안전성 평가

가. Dual Type 소독기의 토종별에 대한 안전성 평가

본 연구에서 개발된 소형 저가 소독기 Kit의 실제 토종별 성봉 및 애벌레, 번데기에 대한 안전성 평가를 실시하였다.

실험장소는 아래와 같다.

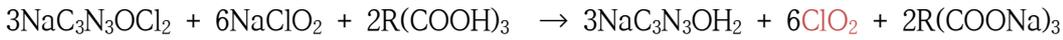
실험 토종별 농가:

전라남도 곡성군 죽곡면 하한리 639-1
대표자 김 해명

(1) Dual Type 소독기의 이산화염소 신속 발생의 토종별에 대한 안전성 평가

Kit 오른쪽 B 구획 이산화염소 신속 발생

반응식



실험 방법:

Dual Type 소독기 Kit를 별통 최하단 별 출입구 칸에 설치하고 물을 가하여 이산화염소를 신속 발생시킨다.

발생 후 5 분, 15분, 30분, 1시간 후에 소독기 Kit가 설치된 별통 맨 하단칸 내부의 이산화염소 농도를 측정한다.

아울러, 발생 후 12시간과 24 시간 후 성분과 애벌레, 번데기의 안전성(약해 유무)를 판정한다.

원료	분자량 (M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/1000	0.66
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/1000	0.67
citric acid	210.14	2	1/1000	0.42

Table 28. 원료 3종의 투입량 (1/1000 배수)

배수	이산화염소 신속 발생후 별통 하단 내부 농도				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
	5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
1/1,000	1.0	1.0	0.9	0.1	폐사	폐사	폐사	폐사
1/2,000	1.0	1.0	0.9	0.1	폐사	폐사	폐사	폐사
1/3,000	1.0	1.0	0.9	0.1	폐사	폐사	폐사	폐사
1/4,000	1.0	1.0	0.8	0.1	폐사	폐사	폐사	폐사
1/5,000	0.7	0.7	0.7	0.1	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/6,000	0.4	0.4	0.4	0.1	안전	안전	안전	일부 폐사
1/7,000	0.4	0.4	0.3	0.1	안전	안전	안전	안전
1/8,000	0.4	0.4	0.3	0.0	안전	안전	안전	안전
1/9,000	0.4	0.2	0.2	0.1	안전	안전	안전	안전
1/10,000	0.3	0.3	0.1	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 29. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 이산화염소 벌통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가 측정 최대 limit : 1.0 ppm

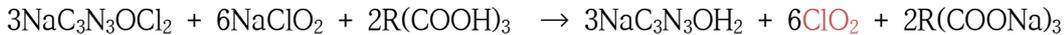
안전성 평가 결과 Dual Type 소독기 Kit 에서는 1/7,000에서 1/8,000 배수의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

상기 chamber 실험과 비교할 때, 벌통 하단 벌 출입구 칸은 상대적으로 매우 작은 공간이므로, 배수의 하향 조정이 필요하다. 다만, 이산화염소는 밀도가 높아 아래로 확산되고, 위로는 확산이 매우 느리므로, 벌이나 애벌레 등이 거주 활동하는 공간이 위쪽 칸에 있으므로, 안전성에서 큰 피해가 없는 것으로 나타났다.

(2) Dual Type 소독기의 이산화염소 서방 발생의 토종벌에 대한 안전성 평가

Kit 왼쪽 A 구획 이산화염소 신속 발생

반응식



실험 방법:

Dual Type 소독기 Kit를 벌통 최하단 벌 출입구 칸에 설치하고 물을 가하여 이산화염소를 서방 발생시킨다.

발생 후 1일, 10일, 20일, 30일 후 성봉과 애벌레, 번데기의 안전성(약해 유무)를 판정한다.

원료	분자량 (M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/1000	0.66
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/1000	0.67
citric acid	210.14	2	1/1000	0.42

Table 30. 원료 3종의 투입량 (1/1000 배수)



배수	1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
1/1,000	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/2,000	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/3,000	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/4,000	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/5,000	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사	일부 폐사
1/6,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전
1/7,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전
1/8,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전
1/9,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전
1/10,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 31. 원료 3종의 배수별 투입에 따른 안전성 평가
측정 최대 limit : 1.0 ppm

안전성 평가 결과 Dual Type 서방형 소독기 Kit 에서는 1/6,000에서 1/8,000 배수의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

상기 chamber 실험과 비교할 때, 별통 하단 별 출입구 칸은 상대적으로 매우 작

은 공간이므로, 배수의 하향 조정이 필요하다. 다만, 이산화염소는 밀도가 높아 아래로 확산되고, 위로는 확산이 매우 느리므로, 벌이나 애벌레 등이 거주 활동하는 공간이 위쪽 칸에 있으므로, 안전성에서 큰 피해가 없는 것으로 나타났다.

나. Single Type 소독기의 토종벌에 대한 안전성 평가

(1) Single Type 소독기의 이산화염소 신속 발생의 토종벌에 대한 안전성 평가

Single Type 소독기 신속 발생

반응식



실험 방법:

Single Type 소독기 Kit를 벌통 최하단 벌 출입구 칸에 설치하고 겔(gel)화 과정을 수행하여 이산화염소를 신속 발생시킨다.

이때 신속한 이산화염소의 신속한 발생을 위하여, 방출 조절 캡을 100% open 한다

발생 후 5 분, 15분, 30분, 1시간 후에 소독기 Kit가 설치된 벌통 맨 하단칸 내부의 이산화염소 농도를 측정한다.

아울러, 발생 후 12시간과 24 시간 후 성봉과 애벌레, 번데기의 안전성 (약해 유무)를 판정한다.

이산화염소 발생 원료 투입량은 상기 chamber 실험 결과를 토대로 바람직한 sodium chlorite 1.69 g, 유기산(citric acid 혹은 oxalic acid) 1.3 g 으로 확정하여 실험하였다.

① Citric acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
citric acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 32. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량



이산화염소 신속 발생후 벌통 하단 내부 농도(ppm)				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
0.4	0.4	0.4	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 33. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 벌통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입양의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

상기 chamber 실험과 비교할 때, 벌통 하단 벌 출입구 칸은 상대적으로 매우 작은 공간이므로, 배수의 하향 조정이 필요하다. 다만, 이산화염소는 밀도가 높아 아래로 확산되고, 위로는 확산이 매우 느리므로, 벌이나 애벌레 등이 거주 활동하는 공간이 위쪽 칸에 있으므로, 안전성에서 큰 피해가 없는 것으로 나타났다.

② Citric acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
citric acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GS 1000I	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 34. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

이산화염소 신속 발생후 벌통 하단 내부 농도(ppm)				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
0.4	0.3	0.3	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 35. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 벌통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입량의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

③ Oxalic acid & 고흡수성수지 GE800F 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
oxalic acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GE800F	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 36. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

이산화염소 신속 발생후 벌통 하단 내부 농도(ppm)				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
0.3	0.2	0.2	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 37. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 벌통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입양의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

④ Oxalic acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
oxalic acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GS 1000I	50			3.5
방출 조절 캡 100% open				

Table 38. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

이산화염소 신속 발생후 별통 하단 내부 농도(ppm)				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
0.2	0.2	0.2	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 39. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 별통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입양의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

(2) Single Type 소독기의 이산화염소 서방 발생의 토종벌에 대한 안전성 평가

Single Type 소독기 서방 발생

반응식



실험 방법:

Single Type 소독기 Kit를 별통 최하단 벌 출입구 칸에 설치하고 겔(gel)화 과정을 수행하여 이산화염소를 서방 발생시킨다.

이때 신속한 이산화염소의 서방 발생을 위하여, 방출 조절 캡을 25% open 한다
 발생 후 1일,10일,20일,30일후 성분과 애벌레, 번데기의 안전성
 (약해 유무)를 판정한다.

이산화염소 발생 원료 투입량은 상기 chamber 실험 결과를 토대로 바람직한
 sodium chlorite 1.69 g, 유기산(citric acid 혹은 oxalic acid) 1.3 g 으로 확정하여
 실험하였다.

① Citric acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
citric acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 40. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 41. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입량의 원료 물질 투입
 이 바람직 한 것으로 나타났다.

상기 chamber 실험과 비교할 때, 별통 하단 별 출입구 칸은 상대적으로 매우 작
 은 공간이므로, 배수의 하향 조정이 필요하다. 다만, 이산화염소는 밀도가 높아
 아래로 확산되고, 위로는 확산이 매우 느리므로, 벌이나 애벌레 등이 거주 활동
 하는 공간이 위쪽 칸에 있으므로, 안전성에서 큰 피해가 없는 것으로 나타났다.

② Citric acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
citric acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GS 1000I	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 42. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 43. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입량의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

③ Oxalic acid & 고흡수성수지 GE800F 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
oxalic acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GE800F	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 44. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 45. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입량의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

④ Oxalic acid & 고흡수성수지 GS1000I 사용 안전성 평가

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
oxalic acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GS 1000I	50			3.5
방출 조절 캡 25% open				

Table 46. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 47. 원료 3종의 투입에 따른 이산화염소 안전성 평가

안전성 평가 결과 Single Type 소독기 Kit 에서는 상기 투입량의 원료 물질 투입이 바람직 한 것으로 나타났다.

2. 소형 저가(low-cost) 이산화 염소 신속, 서방형 (slow-releasing) 겸용 소독기의 토종벌에 대한 예방 치료 효능 현장 적용 평가

본 연구에서 개발된 소형 저가 소독기 Kit의 실제 토종벌 성봉 및 애벌레, 번데기에 대한 예방 치료 효능 현장 평가를 실시하였다.

실험장소는 아래와 같다.

실험 토종벌 농가:

전라남도 곡성군 죽곡면 하한리 낭충봉아부패병 감염 농가 인근 지역

가. Dual Type 소독기의 이산화염소 신속, 서방 발생의 실제 토종벌 성봉 및 애벌레, 번데기에 대한 예방 치료 효능 현장 평가

(1) 토종벌 농가 주변 환경 소독

본 연구에서 개발된 이산화염소 신속, 서방 발생기 Kit 의 예방 치료 효능을 평가하기 위하여, 우선적으로 실험 장소 주변 환경을 살균 소독하였다

1 차 소독액: 뉴카리온사 제조 “이온화 칼슘” 수용액(5 %)을 실험 장소 주변 환경 전체에 10일 1회 분무 살포하였다.

2차 소독액: (주)케모피아사 제조 “CLOEE-AF“ 수용액(30 ppm)을 실험 장소 주변 환경 전체에 10일 1회 분무 살포하였다.

(2) 토종별 면역 강화제 경구 투여

토종별의 이산화염소에 대한 저항력 강화를 위하여, 소독기 설치전에 “펜타솔” 면역 강화제를 사료에 섞어서 경구 투여하였다.

(3) Dual Type 소독기 Kit 설치

토종별의 낭충봉아부패병 예방 실험을 위하여, 벌통 2 개를 선정하여 낭충봉아부패병 감염 농가 인근에 설치하였다.

설치 후, Dual Type 소독기 Kit 에 물을 가하여 이산화염소를 발생 시켰다.

① 신속 발생 수행

Dual Type 소독기 Kit 오른쪽 신속 발생 구획에 아래의 배수로 이산화염소 발생용 원료를 투입하였다.

이는 발생양에 따른 안전성 실험 결과를 토대로 확정한 것이다.

원료	분자량 (M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/7000	0.095
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/7000	0.096
citric acid	210.14	2	1/7000	0.060

Table 48. 신속 발생 구획 이산화염소 발생용 원료 투입양

배수	이산화염소 신속 발생후 벌통 하단 내부 농도				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
	5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
1/7,000	0.4	0.3	0.3	0.1	안전	안전	안전	안전

Table 49. 신속 발생 구획 이산화염소 발생 후 안전성 확인

②서방 발생 수행

Dual Type 소독기 Kit 왼쪽 서방 발생 구획에 아래의 배수로 이산화염소 발생용 원료를 투입하였다.

이는 발생양에 따른 안전성 실험 결과를 토대로 확정한 것이다.

원료	분자량 (M.W.)	몰수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	90.44	6	1/7000	0.095
sodium dichloroisocyanurate	219.95	3	1/7000	0.096
citric acid	210.14	2	1/7000	0.060

Table 50. 서방 발생 구획 이산화염소 발생용 원료 투입양

배수	1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
1/7,000	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 51. 서방 발생 구획 이산화염소 발생 후 안전성 확인

(4) 예방 치료 효능 현장 평가 결과

상기와 같이 본연 구에서 개발된 Dual Type의 신속 서방형 소독기 Kit를, 선정된 2개의 벌통에 설치하고, 이산화염소를 신속, 서방 발생시켰다.

그 결과, 선정된 2개의 벌통에 서식하는 토종벌들이 모두 안전하게 9월30일 까지 낭충 봉아 부패병에서 예방 효과를 나타내었다.

인근 토종벌 농가에 낭충봉아부패병 감염 사례가 있어, 본 연구에서 개발된 소독기를 설치하지 않은 경우 토종벌 모두가 폐사를 일으켰을 것으로 사료된다..

나. Single Type 소독기의 이산화염소 신속, 서방 발생의 실제 토종벌 성봉 및 애벌레, 번데기에 대한 예방 치료 효능 현장 평가

(1) 토종벌 농가 주변 환경 소독

본연구에서 개발된 이산화염소 신속, 서방 발생기 Kit 의 예방 치료 효능을 평가하기 위하여, 우선적으로 실험 장소 주변 환경을 살균 소독하였다



1차 소독액: 뉴카리온사 제조 “이온화 칼슘” 수용액(5 %)을 실험 장소 주변 환경 전체에 10일 1회 분무 살포하였다.

2차 소독액: (주)케모피아사 제조 “CLOEE-AF” 수용액(30 ppm)을 실험 장소 주변 환경 전체에 10일 1회 분무 살포하였다.

(2) Single Type 소독기 Kit 설치

토종벌의 낭충봉아부패병 예방을 위하여, 벌통 2 개를 선정하여 설치하였다. 설치 후, Single Type 소독기 Kit 의 겔(gel)화를 수행하여 이산화염소를 발생 시켰다.

겔화 후 방출 조절 캡을 100% open 하여 이산화염소를 신속 발생시켰다.

1 시간후 방출 조절용 캡을 25 % open 하여 서방 방출을 수행하였다

Citric acid & 고흡수성수지 GE 800F 사용 겔(gel)화 수행 (신속 , 서방 발생)

원료	물(겔화용)ml	배수	배수	투입량(g)
sodium chlorite(80%)	50		1.0/1000	1.69
citric acid	50		1.6/1000	1.3
고흡수성수지 GE 800F	50			3.5
방출 조절 캡 100%, 25 % open 공통				

Table 52. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입량

이산화염소 신속 발생후 벌통 하단 내부 농도(ppm)				12시간후 안전성 (성봉)	12시간후 안전성 (애벌레)	24시간후 안전성 (성봉)	24시간후 안전성 (애벌레)
5분	15분	30분	1시간	12시간	12시간	24시간	24시간
0.4	0.4	0.4	0.1	안전	안전	안전	안전

1일후 안전성 (성봉)	1일후 안전성 (애벌레)	10일후 안전성 (성봉)	10일후 안전성 (애벌레)	20일후 안전성 (성봉)	20일후 안전성 (애벌레)	30일후 안전성 (성봉)	30일후 안전성 (애벌레)
안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전	안전

Table 53. 원료 2종 및 고흡수성 수지의 투입 에 따른 이산화염소 벌통 내부 방출농도(ppm) 및 안전성 평가

(3) 예방 치료 효능 현장 평가 결과

상기와 같이 본연 구에서 개발된 Single Type의 신속 서방형 소독기 Kit를, 선정된 2개의 벌통에 설치하고, 이산화염소를 신속, 서방 발생시켰다. 그 결과, 선정된 2개의 벌통에 서식하는 토종벌들이 모두 안전하게 9월30일까지 낭충 봉아 부패병에서 예방 효과를 나타내었다.

인근 토종벌 농가에 낭충봉아부패병 감염 사례가 있어, 본연구에서 개발된 소독기를 설치하지 않은 경우 토종벌 모두가 폐사를 일으켰을 것으로 사료된다. 낭충 봉아 부패병이 계절성 질병인 관계로, 현장시험에 1년 정도기간은 조금 부족하였다

제 4 절 이산화 염소 경구 조성물과 저가(low-cost) 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기의 상용화 방안

1. 경구용 조성물

본 연구에서는 이산화염소 수용액 100 ppm 50% 설탕물에서 애벌레,번데기,성봉 모두 안전성이 확인되었다.

또한 이산화염소 수용액 100 ppm 50% 설탕물을 경구 투여시 이산화염소가 KSBV 감염 억제효과를 일으킨 것을 야외시험에서도 확인하였다.

CLOEE[®]-A

수의분야 | Veterinary Medicine



아래의 CLOEE[®]-A 제품은 동물의약외품으로 에서 품목허가를 득한 것으로서 소정의 절차를 거쳐, 양봉 분야의 소독제로서, 즉시 등록 판매 가능하다.

토종별 낭충봉아부패병 바이러스 예방 치료제로서 품목허가를 신청하고, 본연구 결과를 보완하여 빠른 시일내에 제품 등록을 추진 한다.

여기서,중요한 사실은 과거에 소위 “안정화 이산화염소” 라는 이름으로 토종별 낭충봉아부패병 예방제로 시중에 유통된적이 있으나, 이 “안정화 이산화염소” 라는 제품은 100% “Sodium chlorite, 아염소산나트륨“으로서, 본연구에서 개발된 소독기의 이산화염소 발생 원료의 하나이다.

참고: 안정화 이산화염소의 성분분석신희상(Ho Sang Shin),오윤숙(Oh Shin Yun Suk) 한국분석과학회, <분석과학> 12권5호 (1999), pp.403-407

<먹는 물 중에 이산화염소의 새로운 정량법으로 기존 요드 적정법을 변화시켜 개발하였다. 이 방법은 먼저 염소 등의 산화성 방해물질을 질소로 purging시킴으로서 제거하는 것으로 되어 있다. ClO₂⁻와 ClO₃⁻의 음이온 분석은 ion chromatography-열전도도 검출기를 이용하였으며 매우 좋은 분리능을 보였다. 위의 방법으로 국내에서 사용 중에 있는 안정화 이산화 염소를 분석하였을 때 이산화 염소의 함량이 0.01-0.09%로 매우 적은 양 함유되어 있었고 대부분이 ClO₃로 구성되어 있었다.>

즉, 이산화염소가 아니고, 원료로서 짝퉁 이산화염소인 것이다.

그러므로, 본 연구에서 개발된 경구용 예방 제제는 충분한 효과와 안전성이 입증된 제대로 된 이산화염소 경구용 제제로서, 충분한 제품 경쟁력을 가지고 있어,

상용화에 어려움이 전혀 없는 것으로 확신한다.

2. 저가(low-cost) 신속, 서방형(slow-releasing) 겸용 소독기

본 연구에서는 경구용 예방 제제와 더불어, 세계 최초로 이산화염소 소독기가 개발되었다.

상기 연구 결과에서 자세히 알 수 있듯이, 신속 발생 모듈로는 별통을 순간적으로 소독하고, 서방형 모듈로는 장기간으로 출입하는 토종별을 살균하여 바이러스를 예방하는 메카니즘이다.

실험 결과 안전성(무독성)이 입증되었고, 유효성도 확인된바 있다.

본제품은 1 차적으로 별통 소독기로서, 즉시 등록 판매 가능하다.

제품에 토종별 낭충봉아부패병 예방 효능을 명기하기 위해서는 부에서 소정의 절차를 거쳐 품목허가를 득하여야 한다.

과거에 자외선 조사기를 부착한 이산화염소 발생 소독기가, 미국에서 수입된 적은 있으나, 자외선 발생기가 고가이고, 별통의 크기에 비해 과대한 장비로서 시중에서 사라진 적이 있다.

본 소독기는 매우 저가이고, 특히 Single Type은 크기도 매우 작고(50ml -100ml), 젤(gel)화 하기 전에는 이산화염소가 발생되지 않는 메카니즘이 장점으로서, 2년간 유통 보관도 가능하다.

한가지 첨가할 점은 본 연구에서 개발된 소독기는 낭충봉아부패병 예방 뿐만 아니라, 다양한 분야에도 응용 될수 있는 장점을 가지고 있다는 사실이다.

예를 들면 , 실내, 화장실, 부엌 등의 탈취 살균, 냉장고등 위생 관리 더 나아가서, 돈사 등 축사 살균 탈취 등 다양한 분야에 즉시 적용 가능하다.

◆ 참고: 본제품의 상용화를 위해, 농림수산 식품 기술 기획 평가원에, 기술료 감면 신청서 (중소기업 ,10%) 와 실시기업의견서를 제출하였습니다.



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도

평가의 착안점 및 기준	연구 결과	달성도 (%)	관련분야 기술발전기여도
1. 이산화염소 경구용 조성물및 소독기의 낭충봉아부패병 애벌레 및 성봉에 대한 SBV 예방 및 치료 효능의 real-time PCR을 통한 정량적 분석	경구용: KSBV 예방 및 치료 효과 확인 소독기:예방 효과 확인	90	이산화염소 효능 검증을 위한 스크리닝 시스템 확립 기술
2. 이산화염소 경구용 조성물 및 소독기의 경제성 및 상온 안정성, 생체 안전성(무독성) 확인	경구용 및 소독기:경제성 및 상온 안정성, 생체 안전성(무독성) 확인	100	이산화염소 활용,화장실등 탈취제,냉장고 탈취,축산 시설 살균 탈취 즉시 활용 가능
3. 야외 적용을 위한 최적 처리 조건 확립 및 표준 매뉴얼 확립	경구용: 100 ppm,50% 설탕물 경구 투여 소독기: Dual Type 과 Single Type 공히 투입농도,시간 매뉴얼 도출	99%	야외 시료의 이산화염소 투입 매뉴얼 활용 분야 많음
4. 이산화염소 경구용 조성물 및 소형 서방형 소독기의 상품 사업성	경구용: 즉시 판매 소독기: 별통 소독기로서 즉시 판매 부패병 예방제로서 품목허가 신청	90	이산화염소 제제 및 소독기의 동물용 의약 외품 활용에 크게 기여, 조류독감, 구제역 등

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 본제품의 상용화를 위해, 농림수산 식품 기술 기획 평가원에, 필요 절차인 기술료 감면 신청서 (중소기업 ,10%) 와 실시기업의견서를 제출완료.
- 경구용 제제 : 소독제로서 즉시 판매 예정
 낭충봉아부패병 예방, 치료제로서 품목허가 신청
 상품명 CLOEE[®]-A



- 소독기: 소독제로서 즉시 판매 예정
 낭충봉아부패병 예방제로서 농림축산검역본부 품목허가 신청

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 관련 학술지 및 전문 잡지 홍보 및 광고
- 일간지등에 소개

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 경구용 1건
- 소독기 1건
- 특허 출원서 작성 중



- 4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획 : 추가 소독기 현장 평가 연구를 통해 경구용 및 소독기의 조류 독감 및 구제역 예방 제제 및 소독기 개발 계획

제 6 장 참고문헌

유미선, 유병수. 2009. 2009년 국내 꿀벌 질병의 발생빈도. 한국양봉학회지 24(4):273-278.

신호상(Ho Sang Shin),오윤숙(Oh Shin Yun Suk), 1999, 안정화 이산화염소의 성분분석, 한국분석과학회, <분석과학> 12권5호 pp.403-407

Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. 2002. Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. J Gen Virol.83(Pt 12) 3139-3146.

Chen, Y.P., Higgins, J.A., Feldlaufer, M.F., 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee(*Apis mellifera L.*). Appl. Environ. Microbiol. 71. 436-441.

Ogata N, Shibata T.,2008. Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection.J Gen Virol. Jan;89(Pt 1):60-7.

Mingxiao M, Ming L, Jian C, Song Y, Shude W, Pengfei L. 2011. Molecular and Biological Characterization of Chinese Sacbrood Virus LN Isolate. 2011:409386.

Yoo MS, Noh JH, Yoon BS, Reddy KE, Kweon CH, Jung SC, Kang SW. 2012b. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. J Virol Methods. 186(1-2):147-151.

Yoo MS, Thi KC, Van Nguyen P, Han SH, Kwon SH, Yoon BS. 2012a. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction.J Virol Methods. 179(1):195-200.

