

어류양식장 방역을 위한 시판 소독제의
효과적인 처리법

Study on establishment of effective methods of
disinfectants using on prevention of epidemics in
aquaculture system

2004. 8

여 수 대 학 교

농림수산식품자료실



0014459

해 양 수 산 부

0

310732

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “어류양식장 방역을 위한 시판 소독제의 효과적인 처리법“ 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 13 일

주관연구기관명 : 여수대학교

총괄연구책임자 : 오 명 주

연 구 원 : 정 성 주

연 구 원 : 강 소 영

연 구 원 : 김 영 진

연 구 보 조 원 :

김 진 숙, 정 일 용

김 춘 섭, 김 위 식

김 기 홍, 박 정 훈

박 민 규, 강 지 영

고 진 용, 우 미 현

요 약 문

I. 제 목

어류양식장 방역을 위한 시판 소독제의 효과적인 처리법

II. 연구개발의 목적

시판 되어지고 있는 소독제 중에서 어류양식과정에서 실제 사용되고 있는 10종을 대상으로 어류병원체에 대한 효과적인 살균 조건의 검토 및 어류양식장 및 출입자의 효과적인 소독법을 검토하여 최종 목표인 어류양식장 방역을 위한 효과적인 소독법을 제안하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

국내 양식장에서 수질정화, 양식시설 및 기구 소독, 어류 질병예방 및 치료를 위해 현재 시판되고 있는 소독제들 중 가장 빈번히 이용되는 소독제 제품을 중심으로 과산화제인 과산화수소 제제 (H사 제품), 할로젠제인 차아염소산염 제제 (S1사 제품), 안정화 이산화염소 제제 (S2사 제품), 포비돈 요오드 제제 (S2사 제품), 알데하이드계인 포름알데하이드 제제 (D사 제품), 글루타르 알데하이드 제제 (S2사 제품), 양이온성 세정제인 4급 암모늄 혼합제제 (S3사 제품) 및 4급 암모늄

단일제재 (S3사 제품), 페놀계인 오르소 디클로로벤젠 제재 (S3사 제품) 및 황산 구리 제재 (DS사 제품)를 본 연구의 대상 소독제로 선정하여 어류 양식장 병원체 소독제로서의 사용기준 및 방역법으로서 적용 방법을 목적으로한 본 연구의 검토 대상 소독제로 적용하였다.

본 연구는 두개의 세부과제로 나누어 실시하였으며 그 내용은 다음과 같다;

1. 어류병원체에 대한 효과적 살균조건 검토

어류 양식장에서 적용할 수 있는 시판소독제의 효과적인 살균법을 검토하는 것을 세부과제의 목표로 삼아,

- 1) 어류병원체 소독농도 및 시간의 결정에 관한 연구,
- 2) 수중병원체 소독효과 판정법을 도출하는 연구,
- 3) 수질 조건별 소독제의 효과를 확인하는 연구,
- 4) 소독제의 어류주화세포 독성을 확인하는 연구,
- 5) 넙치, 조피볼락, 돔류에 대한 어류독성 연구를 수행하였다.

2. 어류양식장 및 출입자의 효과적인 소독법

어류 양식장에서 직접 소독제를 적용하여 방역 작업을 하는데 있어 필요로 되는 어육장내 소독제 처리방법 및 처리기준을 검토 제시하는 것을 목표로 설정하여,

- 1) 양식장 수중의 병원체 조건에 따른 소독제의 처리효과 확인

- 2) 어류병원체의 수평 감염에 의한 확산을 차단할 목적으로 한 수조 및 사육용 도구의 소독효과 검토 연구,
- 3) 소독제의 사용기간 및 보존안정성을 확인 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

- 1) 주요한 해산어류 병원세균 및 병원바이러스 계 7종을 대상으로 10종의 시판되어지는 소독제에 대한 소독제 처리에 따른 효과를 농도별 처리 시간별로 조건을 설정하여 실험하여 그 각각의 소독제에 대한 각각의 병원체의 유효한 살균 농도 및 처리시간을 얻어내었다.
- 2) 소독제의 소독효과를 판정위한 판정법을 3가지의 방법을 적용하여 검토하고 효과적 판정법을 도출하였다.
- 3) 대표적인 어류 주화세포인 CHSE-214세포주를 대상으로 10종의 소독제의 어류주화세포에 대한 독성을 조사하여, 시판 소독제 독성농도를 구하였고, 그들의 유효성분에 대응하는 독성농도를 산정하여 제시하였다.
- 4) 주요 양식대상종인 넙치, 조피볼락, 감성돔을 대상으로 10종의 소독제에 대한 어류독성을 조사하여 24시간 반수치사농도를 구하였고, 안전하게 사용할 수 있는 유효성분 농도를 제시하였다.
- 5) 어류양식장 사육수중의 유기물 조건을 확인하고 유기물의 함유 조건별 소독제 효과를 비교 검토하여 가장 효과적이며 가능성이 높은 소독제를 선발하였다.

6) 어류병원체에 대한 소독효과 및 어류독성 실험 결과를 바탕으로 선정된 유용 소독제의 사용조건 및 보존조건에 따른 보존성 및 사용 안정성을 유효성분 함량 정량 분석법으로 검토하였다.

7) 양식장내 어류 병원체의 이동 경로로 제공되어질 수 있는 사육용 도구를 대상으로 병원체 제어율을 확인함으로써 소독제를 적용한 양식장 방역 효과를 판정 및 검토하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 1) 어류 양식장에서 사용되어질 수 있는 소독제의 사용기준으로 활용한다.
- 2) 양식 어민에게 소독약제 사용에 대한 올바른 방법을 교육하는 교재로 활용한다.
- 3) 어류질병의 방역 대책 수립에 사용한다.
- 4) 양식어류의 안전성 이미지 홍보에 활용한다.
- 5) 본 연구의 결과는 앞으로 예상되어지는 양식생산물의 품질관리에 기초적인 병원체 관리방법 및 양식장 위생관리방법의 자료로서 매우 유용하게 활용되어질 수 있다.

SUMMARY

I. Title

" Study on establishment of effective methods of disinfectants using on prevention of epidemics in aquaculture system"

II. Objectives

The present project was performed to establish and suggest efficient disinfection methods through the investigation of usage conditions for ten species of commercial disinfectants for aquaculture.

III. Contents and Scope

We selected ten species, or hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, stabilized chlorine (IV) oxide, iodophor, formaldehyde, glutaraldehyde, quaternary ammonium compounds (two species), orthodichlorobenzene and copper sulfate among commercial disinfectants used frequently in aquaculture farm as subjects for the present project and investigated both their efficacies on a variety of fish pathogens and application methods for prevention of epidemics.

1. The conditions for effective disinfection of fish pathogens
 - 1) The determination of concentration and exposure time of disinfectants
 - 2) Decision methods of disinfection on fish pathogens
 - 3) The effects of disinfectants according to water quality
 - 4) The toxicity of disinfectants for fish-derived cell lines
 - 5) The ichthyotoxicity of disinfectants for flounder, black rock fish and sea breams

2. The effective methods of disinfection for both aquaculture farms and user
 - 1) Decision methods of disinfection on fish pathogens in water
 - 2) The determination of disinfectant effects on both tank and utensils for prevention of horizontal transmission.
 - 3) The evaluation for both a term of validity and stability for storage of disinfectants

IV. Results

1. Ten species of commercial disinfectants were investigated for their disinfectant effects both vs. concentration and, vs. exposure time using seven species of major fish pathogenic bacteria and viruses of marine aquaculture. Based on the results, effective both concentration and exposure time of each disinfectant was determined.

2. The decision method of disinfectant effect was examined by three different methods and suggested.

3. The toxicity of all ten species of disinfectants was evaluated for a representative fish-derived cell-line, CHSE-214. Based on results, the toxic concentration of each disinfectant was determined.

4. The ichthyotoxicities of all ten species of disinfectants were evaluated for three kinds of fish, or flounder, black rock fish and black sea bream. Based on the results, each LD₅₀ with 24 hr exposure was determined and effective safety ranges of dose were suggested.

5. The conditions of organic matters in two kinds of water, or breeding water and filtered seawater were measured as both SS and COD. The effect of disinfectants in each kind of water was examined and ones with high efficacy were selected.

6. Based on the results of both efficacies and toxicities, the effective disinfectants were selected. Their storage stabilities were evaluated by quantification of effective ingredient of each disinfectant.

7. The prevention effects of selected disinfectants on the aquaculture farm were evaluated by measuring the disinfectant effects on utensils which may play roles as transmission-routes.

V. Plans of practical use

1. Standards of disinfectants usages in the aquaculture farm
2. Education materials for users in the aquaculture farm
3. The prevention of epidemics for fish diseases
4. The publicity of safety of cultured fishes as food
5. Uses as methods of hygienic controls of both pathogens and farm for quality control of aquaculture products

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	14
Section 1. Objectives	14
Section .2. Necessity	14
Chapter 2. Domestic and Foreign Status of technical development	17
Chapter 3. Contents and Results	19
Section 1. Methods	19
1. Pathogens for fish	19
2. Disinfectants	19
3. The determination of disinfectant efficiency	20
4. Effects of disinfectants according to water quality	21
5. The decision method of disinfectant efficiency for pathogens	21
6. The toxicity of disinfectants for fish cell lines	21
7. The ichthyotoxicity of disinfectants	22
a. Experimental fishes	22
b. Breeding	22
c. Water condition	22
d. Toxicity tests	23
8. Effects of disinfectants on utensils	24
9. The term of validity and stability for storage of disinfectants	24
Section 2. Results	26
1. The effects of disinfectants on fish pathogens	27
2. The effects of disinfectants in the conditions of organic matters of farm waters	57

3. The effects of disinfectants on fish viruses	64
4. The toxicity of disinfectants for fish-derived cell lines	83
5. The ichthyotoxicity of disinfectants	85
6. The term of validity and stability for storage of disinfectants	99
7. Disinfectants for utensils in the farms	107
Chapter 4. The conclusions and achievement of goals	116
Chapter 5. Plans of practical uses	125
Chapter 6. References	126

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	14
제1절 연구개발 목표	14
제2절 연구개발 필요성	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제1절 연구수행 방법	19
1. 어류병원체	19
2. 소독제	19
3. 소독 효과실험	20
4. 수질 조건별 소독제의 효과	21
5. 수중병원체의 소독효과 판정법	21
6. 소독제의 어류주화세포 독성	21
7. 어류에 대한 소독제의 독성	22
가. 실험어	22
나. 실험어 사육	22
다. 실험수	22
라. 독성실험	23
8. 양어장내 사육용 도구의 소독효과	24
9. 소독제의 사용기간 및 보존안정성	24
제2절 연구수행 내용 및 결과	26
1. 시판용 소독제의 어류 병원체에 대한 살균 효과	27
2. 어류 양식장 사용수 유기물 조건에 따른 소독제의 살균 효과	57
3. 바이러스에 대한 소독제의 불활화 실험	64

4. 어류주화세포에 대한 소독제의 독성실험	83
5. 어류에 대한 소독제의 독성실험	85
6. 소독제의 사용기간 및 보존안정성	99
7. 양어장내 사용 소독제로서의 적용성 검토	107
제 4 장 결과종합 및 목표달성도	116
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	125
제 6 장 참고문헌	126

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목표

양식어류에 발생하는 감염성 질병의 병원체를 대상으로 시중에 시판되어지고 있는 소독제의 살균기준을 검토하고, 효과를 분석하여 양식장 조건에 맞는 효과적인 소독법을 설정하고, 양식장의 사육용 기구 및 양식장 출입자의 방역용 소독법을 검토하여 효과적인 방역법을 제안하는데 목표를 둔다.

제2절 연구개발 필요성

어류양식산업의 발달과 연안의 오염으로 한층 증가되고 있는 양식생물의 질병 문제는 우리나라 양식산업이 직면한 주요 현안문제 중 하나이다. 이러한 질병은 양식생물의 누적 폐사로 인한 직접적인 경제적 피해와 더불어 수산용 약제의 사용 증가와 관리 인력 비용 증가 등 제반 양식비용을 증가시켜 양식생산성을 저하시킴으로서 심각한 경제적 피해를 유발하고 있다. 또한 이러한 질병의 사회적 문제화로 인하여 대 국민 소비심리가 위축되어 소비량의 저하를 유발하기도 한다.

양식생물의 질병에 관한 문제는 비단 우리나라뿐만 아니라 세계 여러 나라에서 주요한 관심사가 되고 있다. 일본의 경우, 1990년도 중반 양식 진주조개가 대량 폐사되어 초미의 관심이 집중되었으며, 넙치 빈혈증 등의 새로운 질병과 수입 종묘로부터 기인된 참돔 이리도바이러스병 및 보리새우 급성바이러스혈증(PAV) 등

의 바이러스병은 양식경영과 연안어업에 심각한 영향을 미치고 있다. 또한, 새우의 최대 생산국인 중국에서는 1993년 양식새우가 대량 폐사되어 큰 피해가 발생한 바 있으며, 최근 황해에서 발생하고 있는 비단가리비의 대량 폐사 역시 바이러스가 원인인 것으로 추정되고 있다. 이와 같이, 1990년대 이후로 급격히 증가하고 있는 바이러스성 질병으로 인한 양식어류의 피해는 국내·외적으로 가장 큰 문제로 대두되고 있다 (Oh, 1999).

수산양식업에 있어 전 세계적으로 문제가 되고 있는 수산양식생물 질병의 국내 발생 현황을 살펴보면, 1990년대 전반의 발병률이 5% 미만에 불과하던 것이 1990년대 후반부터는 15% 내외로 증가하고 있으며, 고수온기에 주로 발생하던 질병들이 연중 발생하는 추세에 있다. 그리고, 이리도바이러스병과 같은 난치성 악성 전염병의 발생 증가에 의한 양식어류의 피해가 증대되고 있으며, 약제 오·남용에 의한 내성균의 출현 증가로 치료 효과가 저하되고 있는 실정이다. 특히, 최근에 들어서는 국외로부터의 양식용 종묘의 수입량 증가로 인하여 신종 외래 전염병의 유입 위험성이 증대되고 있으며, 감염 종묘의 이동에 의한 질병의 확산이 우려되고 있다. 또한, 어병이 종묘생산기관과 양식장뿐만 아니라 자원 조성을 위하여 인공적으로 생산된 종묘를 천연 해역에 방류함에 따라 천연 해역에서도 질병이 만연하여 심각한 사태를 부르고 있다. 이에 따른 국내·외 연구 동향은, 과거 질병에 대한 단순 치료 목적의 연구에서 예방차원의 연구로 연구의 방향이 전환되고 있으며, 면역학적 및 분자생물학적 기술을 활용한 진단기술에 관한 연구가 강화되고 있고, 특히 국가 간 수산생물 교역량 증가에 따른 질병 확산에 대한 자국의 수산자원 보호 대책에 관한 연구가 중점적으로 수행되고 있다. 특히, 지금까지 대부분을 치료약제에 의존하여 왔으나, 내성균의 증가, 공중 위생상의 문제, 항균제의 잔류에 의한 식품 안정성 위험, 약제로써는 치료가 어려운 바이러스성 질병의 만연에 의하여 백신의 이용 및 사육장에서의 사전 소독을 이용한 예방 및 병원체의 전파차단에 주력을 둔 방역대책으로 전환하려 한다는 것이다.

최근 이러한 상황에서 어류질병의 대책수립을 위한 방법으로 다양한 백신의 개발 연구 및 신물질을 이용한 예방효과 연구 등이 활발히 진행되어지고 있으나, 그 비용 및 연구개발에 요구되어지는 기간이 매우 길어서 당장의 현장 방역에는 그리 효과적인 방법으로 제시되어지지 못하고 있다. 심지어 다양한 어류병원체의 전파와 확산의 속도 및 영역이 매우 넓어지고 있는 상황에서 우선적인 양식장 단위의 자가 방위를 위한 소독 및 방역 수립이 무엇보다도 요구되어지고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

양식어류 유래 병원바이러스의 세포계외에서의 생존성에 관한 연구로서 IPNV 및 IHNV를 대상으로 PBS, BSS, MEM 중에서의 생존성에 대하여 Amend (1970), Mackelvie 와 Desauteles (1975), Gosting 와 Gould (1981)등이 보고한 바 있으나, 어류의 서식환경 수중에서의 감염가의 변화에 대한 보고는 많지 않고 Toranzo 와 Hetrick (1982)이 하천수 및 기수, 해수중의 poliovirus type 1의 생존성을 IPNV, IHNV와 비교한 것 및 IPNV의 해수중의 생존성을 검토한 것 (Toranzo et al., 1983) 등이 있다. 한편, poliovirus를 비롯한 인체 유래의 enterovirus의 하천수나 해수 중에서의 생존성을 연구한 바에 의하면, 이러한 바이러스의 감염성에 영향을 미치는 인자로서는 염분 및 수온 (Lo et al., 1976), 화학물질 (Salo and Cliver, 1978), 미세입자 및 오니 (Labelle et al., 1980), 미생물 (Fujioka et al., 1980)등이 있는 것으로 보고되어져 있으며, 그 중에서도 바이러스의 생존률은 고압멸균 혹은 여과 멸균해수중에 비하여 무처리 해수 중에서 낮은 점으로부터 해수중의 미생물의 관여가 중요시 되어졌다. Magunuson 등 (1967)은 항바이러스 작용을 가진 세균으로서 *Vibrio marinus*를 분리보고 하였고, Kamei 등 (1987)은 기수 및 해수역에서 채수한 실험수내에서 IHNV에 항바이러스성 효과를 가지는 물질을 분비하는 세균을 검색하였다. 渡辺와 吉水 (2001)는 작업자의 손, 장화의 소독을 비롯하여 육상시설에서는 사육기구류 및 사육수조의 소독이 중요성에서 고안하여 오존처리수를 이용한 양식장내 사용기구류의 소독을 조사한 바 있으나, 소독제를 사용한 결과는 없다. 소독에는 시판의 소독약 중에서 잔류에 의한 어류에의 독성이 적은 것을 골라 적절히 사용하도록 유념하는 것이 중요하며, 또한 반복사용이 가능한지, 저온에서의 효력 유무 등도 고려해야한다 (木村, 吉水, 1991). Yoshimizu and Kasai (2002)는 해수의 오존처리에 따른 옥시단트 또는 차아염소산을 소독제로 사용하는 것은 일석이조의 효과가 있고, 특히 옥시단트에 의한 난소독은 요오드제에 의한 소독보다도 효과적이라고 제안하였다. Itoh et al. (1996)은 자외선의 해수중 살균시에는 수중의 대형입자를 제거할 필요가 있

다고 하였다. 국내의 경우 어류 기생충의 치료를 위한 치료제 및 독성연구의 실험에는 일부있으나 어류양식장의 소독과 관련된 연구 결과는 매우 희박하다. 오 등 (1999)의 오존처리법에 의한 어류 병원세균의 살균효과의 보고가 있다. 그 외 기생충 세균을 대상으로 한 단편적인 살균 효과를 조사한 논문은 다수 있으나, 어류양식장에서 사용되어질 수 있는 살균법으로서 종합적으로 검토한 연구 결과는 없어서 실제 양식장에서 소독제 사용하고자 할 때에는 일반적으로 수의 또는 인체 소독기준으로 만들어진 기준에 준하여 적당히 처방하여 사용되어지는 경우가 거의 대부분이다.

따라서 어류 양식장에서 사용할 수 있는 적합한 소독제의 사용 방법의 검토가 필요하다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 연구수행 방법

본 연구의 수행과정을 통하여 사용되어진 연구 재료 및 방법을 개략적으로 정리하면 아래와 같다.

1. 어류병원체

소독제의 효과를 판정하기 위한 대상어류병원체로서 Marine birnavirus (MABV), Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), Hiram rhabdovirus (HIRRV) 등의 바이러스를 대상으로 하였고, 세균으로는 해산어의 주요 병원체로 알려져 있는 *Vibrio sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Edwardsiella tarda*를 대상으로 유효성을 평가하였다.

2. 소독제

연구의 대상으로 선택한 소독제는 10종으로 페놀계, 할로젠계, 제4급 암모늄계, 알데하이드계, 염소계, 등의 계열에 속하는 시판 및 현장 주요사용 대표종류를 택하였고, 상거래제품인 점을 감안하여 그 상표명은 본 보고서에서 제시하지 않고 그 각각의 제품명칭으로서는 과산화수소수 제제, 차아염소산염 제제, 안정화 이산화염소 제제, 포비돈 요드 제제, 포름 알데히드 제제, 글루타르 알데히드 제제, 4급 암모늄염 혼합 제제, 4급 암모늄염 단일 제제, 오르소 디클로르 벤젠 제

제 및 황산동으로 구분하여 10종의 명칭을 사용하기로 하였다 (표1).

3. 소독 효과실험

각각의 병원체를 상법에 따라 대량배양용 배지(세균) 및 배양액(바이러스)에 대량 배양시켜 준비하거나, 또는 감염어로부터 대량 수집하여 부유액으로 준비하고, 각각의 병원체별로 각각의 소독제 유효농도에 따른 병원체의 살균효과를 조사하였다.

표 1. 실험에 사용한 시판소독제

	구분	주성분	시판형태
산화제	과산화제	과산화수소	과산화수소 제재
	할로겐제	염소제	차염소산염 제재
		안정화 이산화염소	안정화이산화염소 제재
		요오드제 요오드포름	포비돈요드 제재
환원제	알데하이드제	포름알데하이드	포름알데하이드 제재
		글루타르알데하이드	구루타알데하이드 제재
세정제	양이온성세정제	4급 암모늄염	4급암모늄염 혼합제재
		4급 암모늄염	4급암모늄염 단일제재
	페놀계	오르소디클로로벤젠	오르소디클로로벤젠제재
			황산동(시약)

4. 수질 조건별 소독제의 효과

1) 각각의 유효 농도조건을 기준으로 처리시간에 따른 효과를 검토하여, 가장 효과적인 농도와 처리시간을 얻었다. 2) 각각의 소독제의 유효농도를 대상으로 양어장 사육수기준 및 사육용원수를 기준으로 설정하고, 수중 유기물양을 설정한 후, 각각의 수질조건에서의 10종의 소독제에 대한 4종의 어류병원세균의 소독효과를 실험하여 그들 결과를 검토하였다.

5. 수중병원체의 소독효과 판정법

실험수중에 미리 세균수를 조정한 어류병원세균 4종을 살포하고, 병원체가 살포된 오염수를 대상으로 유효한 것으로 검정되어진 소독제 5종을 각각 처리하여 실제 수중의 병원세균의 제어율을 콜로니계수법으로 생존 세균수를 산출하여 그 효과를 판정하였다. 바이러스의 경우 MABV를 대상으로 세균과 마찬가지로 사전에 바이러스 감염가를 확인하고, 일정의 바이러스 배양액을 실험수내에 살포한 후, 동일종의 소독제를 대상으로 소독처리를 행한 후, 반응 시간이 경과한 오염수를 막분리농축법을 이용하여 농축 및 정제하여 처리수내에 생존하는 수중바이러스를 모으고, 이를 CHSE-214 주화세포에 배양하여 TCID₅₀법 등을 이용하여 불활화율을 산정하였다.

6. 소독제의 어류주화세포 독성

어류바이러스를 배양하기위하여 가장 널리 사용되어지는 대표적인 어류주화세포의 일종인 CHSE-214 cell을 대상으로 상법에 따라 25F 및 75F 세포배양용 플라스크에 각 5 및 20ml 씩의 세포부유액을 접종하여 플라스크 저층에 단층을 형

성하게 하여 20℃로서 배양하여 사용하고, 배양액은 일반적인 세포배양용액인 MEM에 5%의 FBS를 첨가한 MEM-5를 기본으로 하여, 소독약의 종류별 세포독성을 세포독성 판정법으로 상용되어지고 있는 MTT법으로 행하여 판정하였다.

7. 어류에 대한 소독제의 독성실험

가. 실험어

본 연구에서는 최근 해산양식어로서 국내에서 대표적으로 사육되어지고 있는 넙치, 조피볼락 및 돔류인 감성돔을 대상으로 어독성실험을 행하였다. 실험에 사용한 어류는 급성독성실험 기준에 제시되어져 있는 크기 범위의 것을 선택하여 사용하였는데, 넙치는 체중 4.06 - 6.3 g, 체장 6 - 7 cm, 조피볼락은 체중 7.76 - 9.14 g, 체장 7 - 8 cm, 감성돔은 체중 7.40 - 9.08 g, 체중 8.5 - 9.3 cm의 크기였다.

나. 실험어 사육

모든 실험어는 여수 인근의 양식장에서 사육하고 있는 건강한 어체를 선발하였다. 각각의 어류는 구입하여 실험실로 이동한 후 최소 10일 이상 실험수조내에서 순치시킨 이후에 실험에 사용하였다. 먹이의 공급은 시험개시 24시간이전에 중단하였다. 각각의 실험구별 실험용 수조는 사용수량 100 liter 들이의 수조를 사용하였다. 사용 수조는 실험전에 깨끗이 세척하여 일광 건조시킨 후, 사용 사육수로 재차 세척하고 기준량의 실험수 (사육용수 + 소독제)를 채워서 실험에 사용하였다. 실험 기간중의 수온은 18.5 - 20.5 ℃를 유지하였다.

다. 실험수

실험수는 여수 소재 전남도립수산과학관에서 수족관용 사육수로 사용하는 고압미세여과해수를 물차로 수송하여 본 연구실에 설치된 사육실의 해수탱크에 저장하고, 오존발생장치를 가동하여 잔류오존농도 TRO 0.5 ppm의 농도로 1시간 처리하여 해수 중에 있을 수도 있는 병원체를 살균한 후, 24시간이상 폭기 시키고 사용전 활성탄 (차콜) 여과기를 통과시켜 수중의 잔류오존이 없음을 확인하고 사육 및 실험수로 사용하였다.

라. 독성실험

어류독성 시험은 Hall and Golding (1998)의 "Acute toxicity test protocol" 및 "환경생물독성시험의 기준과 방법 (2003)"에 준하여 행하였다. 시험용액의 조제는 각각의 소독제 제품을 원액으로 하여 독성 실험용 사육수에 농도(ppm)별로 미리 잘 교반하여 현탁시켜 사용하였다. 각 어종에 대한 예비실험 처리조건으로 각 구당 10미씩의 어류를 대상으로 24시간 관찰하여 본시험 농도에 적합한 농도범위를 결정하였다. 본실험은 예비실험에서 얻어진 결과를 검토하여 어종마다 농도범위를 설정하여 실험하였다. 대조군은 약제를 무처리한 담수 및 해수에 각각의 어종을 수용하여 음성대조실험군으로 하였다. 사육용 실험수조내에 각각의 소독제를 처리후 각 실험구당 10미씩의 실험용어류를 수용하고 수시로 외관, 먹이섭식, 유영이상, 관찰하고 24째의 폐사율을 확인하였다. 폐사 판정은 아가미 개폐운동이 정지된 실험어 중에서 유리봉으로 자극하여 반응이 없는 개체를 기준으로 하였다. 실험기간동안 사육수조의 수온, 용존산소농도, pH 등을 정기적으로 측정하였다. 음성 대조군 및 시험군에 대하여 시험시작 및 부검시에 체중을 측정하여 비교하였다. 각각의 실험은 3반복으로 행하고 해당처리시간에 따른 반수치사농도(LC₅₀)를 probit 분석을 통하여 얻었다.

이를 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 넙치, 조피볼락, 감성돔의 안전 사용농도를 검토하였다.

8. 양어장내 사육용 도구의 소독효과

양식장내 사용중 어류 병원체의 이동경로로 제공되어질 수 있는 뜰채, 물긏, 수조덮개, 호-스, 먹이생물 관찰용 비이커, 물통, 장화를 대상으로 표면적 25cm^2 부분의 포피 부분을 멸균된 screper로 채취하여 10배 단계 희석법으로 희석하여 각각의 희석농도별 시험액을 배지 상에 100ul 씩 접종하여 각각의 배양조상에 나타나는 병원체의 수를 카운팅하여 소독처리 이전 및 이후의 균수의 변동을 체크하여 그 결과를 검토하였다.

9. 소독제의 사용기간 및 보존안정성

소독제의 사용 및 보존조건에 따른 유효성분분석을 통하여 보존성 및 안정성을 다음과 같은 정량법을 행하여 판정하였다.

1) 차아염소산나트륨 용액 중의 유효염소 정량: 정량은 식품첨가물공전에 공시된 방법에 의거, 다음과 같이 수행하였다. 차아염소산나트륨 용액 3g을 취하여 물 50ml을 가하고 요오드화칼륨 2g 및 4배 희석한 빙초산 10ml을 가하여 바로 마개를 막아 암소에 15분간 방치한 후, 유리된 요오드를 0.1 M 치오황산나트륨 용액으로 적정하였다. 별도로 공시험 (중류수로)을 하여 보정하였다. 적정에 소비된 0.1 M 치오황산나트륨 용액의 양으로부터 염소의 양을 계산하였다.

2) 과산화수소 정량: 정량은 식품첨가물공전에 공시된 방법에 의거, 다음과 같이 수행하였다. 과산화수소 300mg에 물을 가하여 100ml로 희석한 다음 완전히 혼합하였다. 이 용액 20.0ml에 2N 황산용액 25ml를 가한 다음 0.1N 과망간산칼륨 용액으로 적정하였다. 적정에 소비된 0.1 M 과망간산칼륨용액의 양으로부터 과산화수소의 양을 식품첨가물공전에 제시된 방법을 사용하여 계산하였다.

3) Glutaraldehyde 정량: 정량은 지방족 알데히드에 비교적 높은 선택성을 갖는 것으로 알려진 Hauser 등(*Anal. Chem.* 33 (1961) 93-96; *Anal. Chem.* 36 (1964) 679-681)의 *N*-methylbenzothiazolon (MBTH) method를 도입한 microplate를 이용한 분광학적 정량법 (Zurek & Karst, *Analytica Chimica Acta* 351 (1997) 247-257)을 따랐다. 간단히 기술하면, 0.1 % (w/v) MBTH 수용액과 glutaraldehyde 시료 동량을 섞어 25분간 방치 후, 1 % (w/v) $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 수용액을 가하여 잘 섞은 후 30분간 더 방치하였다. 이때 생성되는 blue-colored tetraaza-pentamethicyanine의 630nm에서의 흡광도를 측정하였다. Sigma의 50 % glutaraldehyde solution (Grade I)을 이용하여 그린 표준곡선으로부터 시료 중의 glutaraldehyde의 농도를 구하였다.

제2절 연구수행 내용 및 결과

국내 양식장에서 수질정화, 양식시설 및 기구 소독, 어류 질병예방 및 치료를 위해 현재 시판되고 있는 소독제들 중 가장 빈번히 이용되는 소독제 제품을 중심으로 과산화제인 과산화수소 제제 (H사 제품), 할로젠제인 차아염소산염 제제 (S1사 제품), 안정화 이산화염소 제제 (S2사 제품), 포비돈 요오드 제제 (S2사 제품), 알데하이드계인 포름알데하이드 제제 (D사 제품), 글루타르 알데하이드 제제 (S2사 제품), 양이온성 세정제인 4급 암모늄 혼합제제 (S3사 제품) 및 4급 암모늄 단일제제 (S3사 제품), 페놀계인 오르소 디클로로벤젠 제제 (S3사 제품) 및 황산구리 제제 (DS사 제품)를 본 연구의 대상 소독제로 선정하여 어류 양식장 병원체 소독제로서의 사용기준 및 방역법으로서 적용 방법을 목적으로한 본 연구의 검토 대상 소독제로 적용하였으며, 그 각각의 소독제의 약칭 및 유효성, 작용기전을 간단히 정리하면 (표2)와 같다.

표 2. 실험용 시판 소독제의 약칭, 유효성 및 작용기전

소독제 약칭	유효 성분	작용기전
과산화수소 제제	hydrogen peroxide 35%	Ribosom과 반응 세포성분의 산화
차아염소산염 제제	Sodium hypochlorite solution available chlorine 11.5%	효소단백질, 핵산 단백질 -sh기를 산화, 파괴
안정화이산화염소제제	ClO ₂ 5%	
포비돈 요오드 제제	Povidon iodine 100g/L	핵산합성방해 단백질합성저해, 세포막 손상
포름 알데하이드 제제	Formaldehyde 35%	
구루타르 알데하이드 제제	Glutaraldehyde 100g/L	
4급암모늄염 혼합제제A	Octyldecyl dimethyl ammonium(2.250%), Dioctyl dimethyl ammonium chloride(1.125%), Didecyl dimethyl ammonium chloride(1.125%), Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride(3.000%)	세포막손상, 효소단백질변성
4급암모늄염 단일제제B	Didecyl dimethyl ammonium chloride 10W/V% Polyoxyethylene octylphenyl ether 2W/V%	각종세포성분과 반응, 세포막손상
오르소 디클로로벤젠 제제	O-dichlorobenzene 750g/kg Methanol 40g/kg, Cresol 50g/kg	
황산동	copper sulfate 99%	

1. 시판용 소독제의 어류 병원체에 대한 살균 효과

가. 소독제처리에 따른 효과검정을 위한 처리소독제 농도 및 처리시간별 세균의 성장도 비교 조사

전남 여수시 인근 넙치 양식장의 병어에서 분리하여 연구실에 보관중인 *Vibrio sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*를 1 % NaOCl이 첨가된 BHIB (brain heart infusion broth, Difco)에 각각 접종한 후 26.5℃에서 20시간 배양하여 순수분리 한후 세균 배양액과 멸균 glycerol을 8:2 혼합하여 200 μ l씩 tube에 나누어 분주하고 -80℃에 보관하였다. 일부소독제가 유기물에 의해 효과가 반감되는 특성이 있으므로 BHIB를 제거하기위해 세균 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 버리고 멸균된 생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)에 부유시켜 1차 세척한 후에 같은 방법으로 원심분리하여 상층액을 제거하고 멸균 생리식염수에 재 부유시켜 2차 세척한 후에 마지막으로 한 번 더 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 모아진 균체를 멸균 생리식염수에 최종세균수를 10^7 cells /ml로 조정하여 부유시켜 실험에서 사용하였다.

소독제와 반응후 세균의 성장을 알아보기 위한 실험으로 각각의 시판 소독제를 원액으로 하여 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm의 농도가 되게 PBS를 이용하여 희석한 다음 *Vibrio sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* 각각의 균 현탁액을 소독제와 1:1 정량비로 3분, 20분, 60분간 반응시킨 후, 반응을 멈추기 위하여 1% NaCl이 첨가된 BHIB (brain heart infusion broth, Difco)배지를 96 well plate상에서 소독처리 균액과 1:1로 반응시키고, 처리 96 well micro plate를 ELISA reader (SPETRA MAX 340, USA)에 넣고 23 ℃에서 18시간동안 1시간 간격으로 620 nm 파장의 조건으로 흡광도 (OD)를 측정하여 세균의 증식 패턴을 관찰하였다.

본 실험은 소독제의 처리조건을 설정하기위한 목적으로 10종류의 소독제를 대

상으로 각각 반응후 처리농도가 100, 500, 1000 ppm의 농도가 되도록 설정하여 4종의 세균에 적용하여 검토하였는데, 전체적으로 소독제 처리농도는 시판소독제를 원액으로 하였을 때, 1000 ppm의 처리조건에서는 3분, 20분 및 60분의 소독처리시간 실험구 모두에서 세균의 성장을 저해하는 효과가 확인되었으나, 500 ppm의 소독제 처리시험구의 경우에는 60분의 처리 시간구를 제외하고는 20분 및 3분 처리조건에서의 살균효과의 판정이 어려운 조건으로 검토되어졌다. 아울러, 그 이하의 소독제 농도조건인 100 ppm의 처리구에서는 3분, 20분 및 60분 처리시간의 경과에도 불구하고 그 처리에 따른 효과를 판정하기 어려운 결과가 도출되었다.

이들 결과 중에서 안정화 이산화염소 제재를 대상으로 한 결과물을 그림 1-4에 제시하였다. 이상의 실험 결과에서 본 연구의 수행에 있어 시판 소독제의 유효한 처리시간은 양식현장의 상황을 고려하였을 때 20분 및 60분의 처리 시간을 적용하여도 무방할 것으로 판단할 수 있었고, 이러한 처리 시간의 조건하에서 시판소독제를 원액으로 설정하고 실험하는 조건을 가정하였을 때, 유효한 처리농도를 도출하기 위한 실험 농도 조건은 100 ppm에서 1000 ppm이상의 범위를 설정할 필요가 있는 것으로 판단 할 수 있었다.

추가적으로 소독제 처리 후, 세균 성장도 변화를 통한 현장 소독제 효과 판정법은 결과의 오차 범위가 넓게 나타나는 이유로 적절한 판정법으로 적용하기는 어려운 것으로 판단되었다.

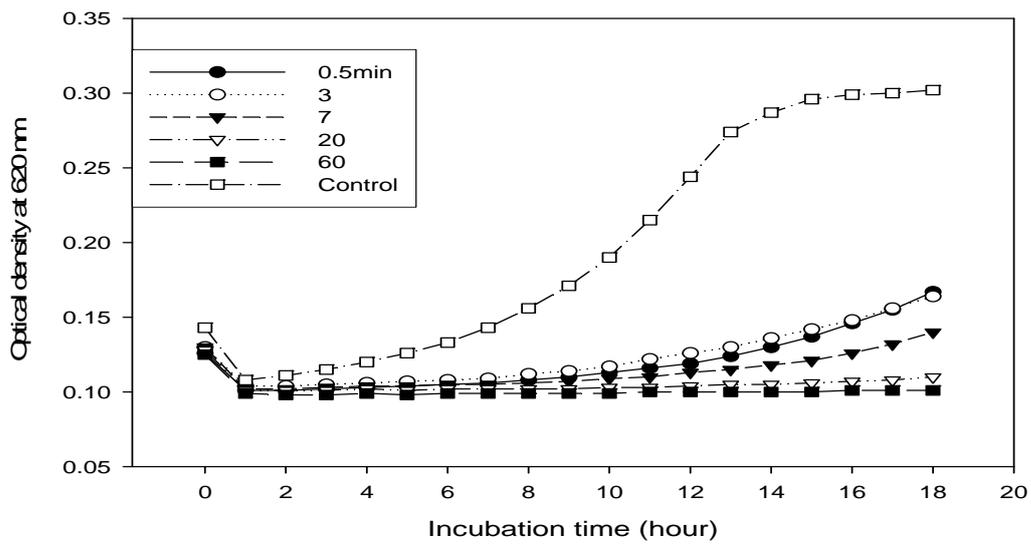
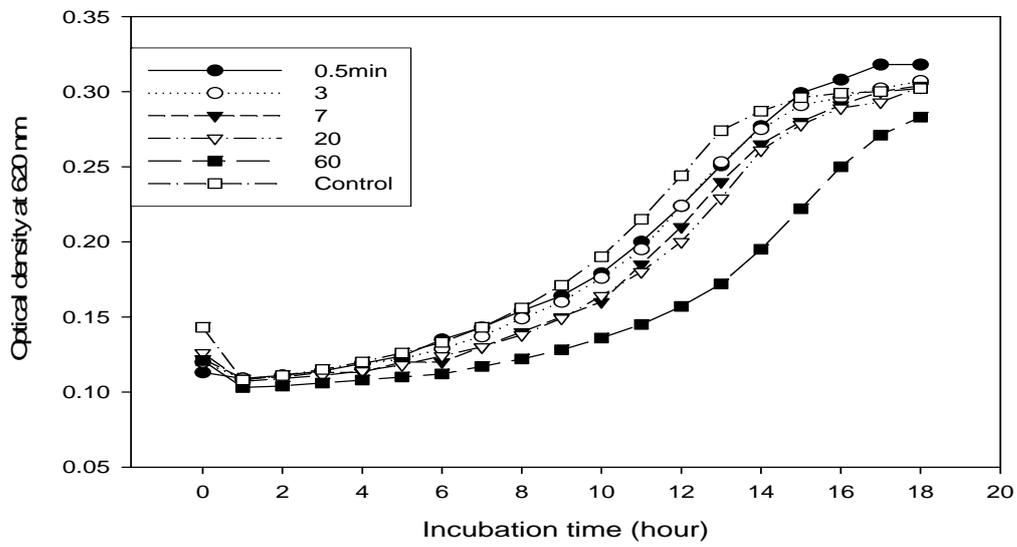


그림 1. 2. 100 ppm 및 1000 ppm 농도의 시판 안정화 이산화염소 제제에 노출된 *Streptococcus* sp.의 노출시간별 성장곡선

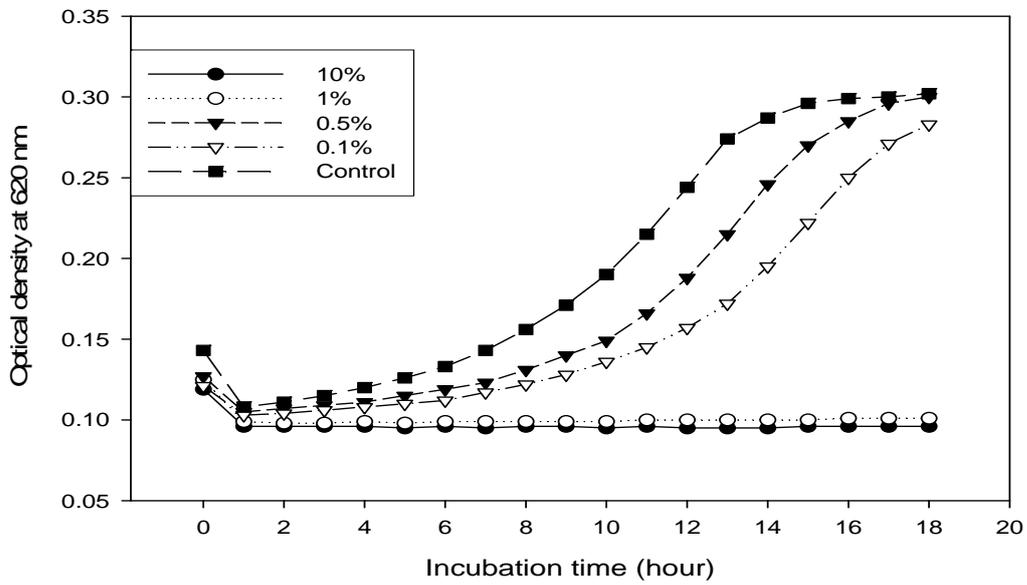
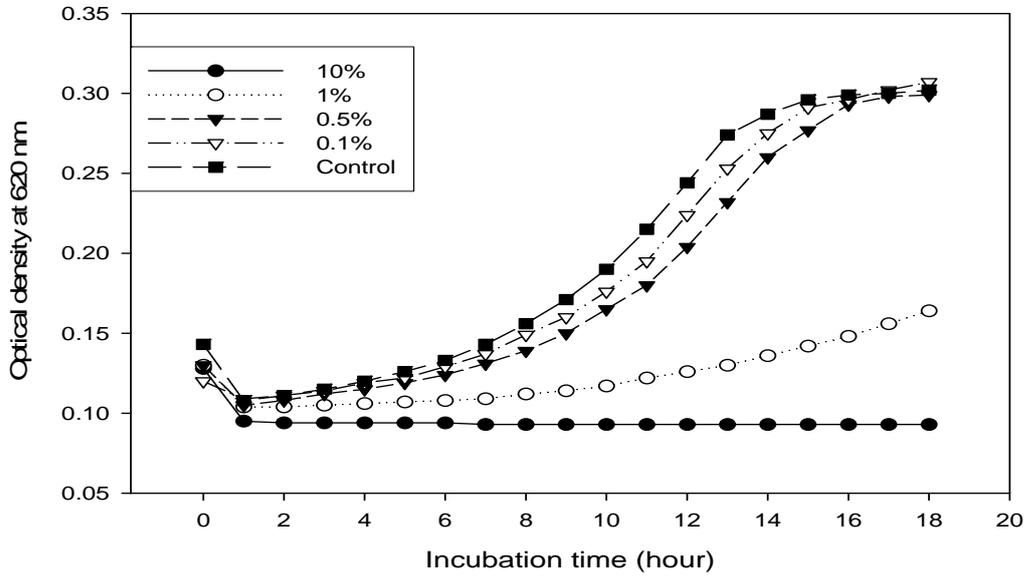


그림 3. 4. 시판 안정화 이산화염소 제재에 3분 및 60분 노출시킨 조건에서의 *Streptococcus* sp.의 처리농도별 성장곡선

나. 소독제처리에 따른 효과검정을 위한 평판 디스크법에 의한 어류병원성
세균 증식억제 효과 판정

주요 어류 병원체중 대표적인 그람음성균인 *Vibrio sp*, *Edwardsiella tarda*와 그람양성균인 *Staphylococcus sp.*, *streptococcus sp.*에 대한 소독제의 효과를 보다 쉽게 판단 할 수 방법을 모색하고자, 일반적으로 세균 감염증 발생시 그 치료 약제를 선별하기 위하여 적용하고 있는 평판 디스크법을 응용하여 각각의 소독제의 처리효과 분석을 행하였다.

각각 세균현탁액을 1% NaCl이 첨가된 BHIA (brain heart infusion agar. Difco)배지에 100 μ l씩 도말하여 1시간 동안 23 $^{\circ}$ C에서 배양하여 준비한 후, 시판 소독제를 워액으로 하여 PBS를 이용해 10^{-1} , 10^{-2} , 5×10^{-2} , 10^{-3} 가 되게 농도별로 희석한 다음 멸균된 디스크에 10 μ l씩 흡입시켜 각각의 세균이 도말된 평판배지에 부착하고 23 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후, 저지대를 확인한 결과를 그림 5 및 표 3에 나타내었다.

이들 결과에서 나타낸 바와 같이 세균 증식의 저지대를 판단하여 소독제의 효과를 판단하는 것은 포르름 알데하이드 제제, 4급 암모늄염복합 제제 및 오르소 디클로로벤젠 제제와 같은 일부의 경우에는 가능한 것으로 나타났으나, 그 외의 다른 제제는 원액정도의 고농도에서만 그 저지대가 확인되어져, 앞에서의 증식곡선 연구를 통하여 확인되어지는 다른 유용한 제제 및 유효농도에서는 그 반응이 나타나지 않은 점에서 그 적용 범위가 매우 한정적임을 판단할 수 있었다. 따라서 간이적인 효과 판정에는 적용할 수 있을지 모르나, 일반적인 소독제의 효과판정 방법으로는 부적합할 뿐 아니라, 본 연구를 통하여 얻고자 하는 병원체에 대한 효과판정을 위한 연구에는 적용할 수 없는 방법으로 판단되어졌다.

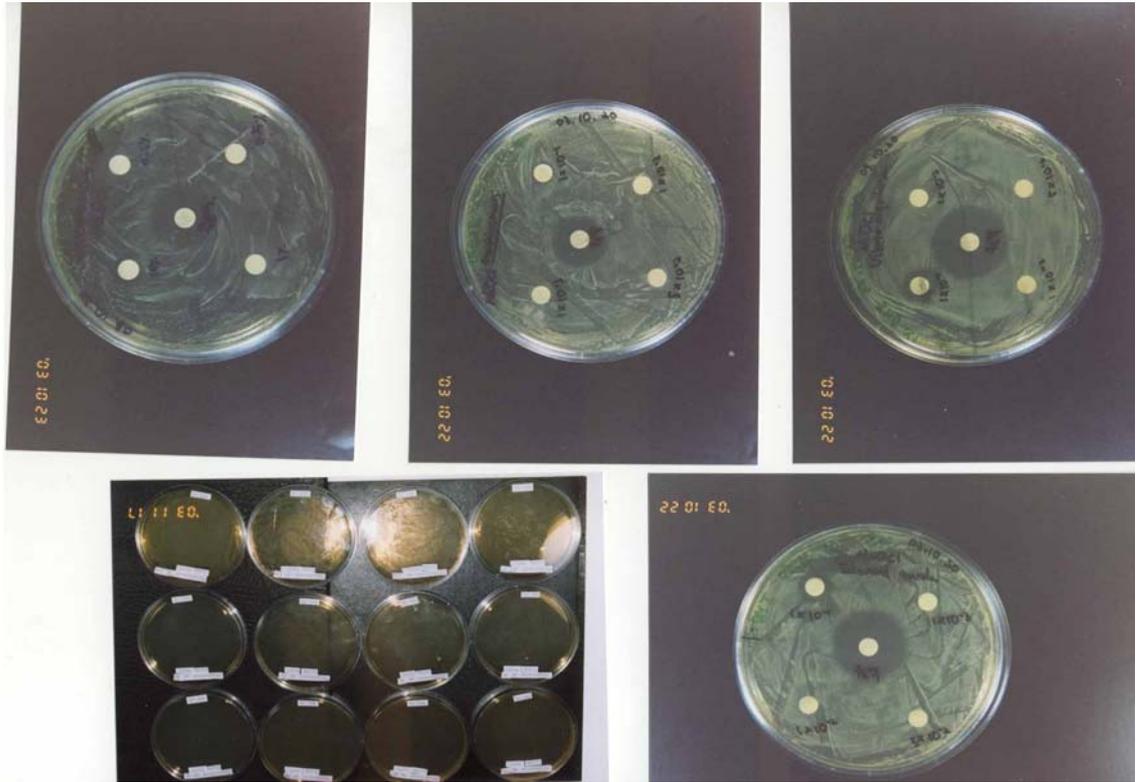


그림 5. 소독제처리에 따른 효과검정을 위한 평판 디스크법

표 3. 소독제별 세균 증식억제에 따른 저지대 비교 결과

소독제		세균에 대한 소독제의 증식억제 지대(cm)			
종류	농도 (ppm)	<i>Vibrio sp.</i>	<i>Edward tarda</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
과산화수소 제재	원액	4.2	4.8	6.6	4.6
	10000	1.6	0.8	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·
차염소산염 제재	원액	1.6	1.4	1.4	1.4
	10000	·	·	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·
안정화 이산화염소 제재	원액	3.0	3.2	·	0.8
	10000	·	·	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·
포비돈 요오드 제재	원액	0.8	0.6	0.8	0.6
	10000	·	·	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·
포름 알데하이드 제재	원액	6.8	7.2	6.8	7.2
	10000	3.0	2.4	2.6	2.0
	5000	1.2	0.8	·	·
	1000	1.0	·	·	·
구루타르 알데하이드 제재	원액	1.8	1.2	0.6	0.8
	10000	·	·	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·
4급암모늄염 복합제재A	원액	1.6	1.4	3.2	3.0
	10000	·	0.8	2.2	2.2
	5000	·	·	1.8	1.6
	1000	·	·	1.0	1.0
4급암모늄염 단일제재B	원액	1.2	1.2	1.2	1.0
	1000	·	·	·	·
	500	·	·	·	·
	100	·	·	·	·
오르소 디클로로벤젠 제재	원액	1.2	1.4	1.8	1.8
	10000	1.0	1.0	1.4	1.4
	5000	·	0.8	1.2	1.2
	1000	·	·	1.2	1.0
황산동	원액	1.66	1.3	1.22	1
	10000	·	·	·	·
	5000	·	·	·	·
	1000	·	·	·	·

다. 소독제처리에 따른 효과검정을 위한 콜로니카운팅법에 의한
어류병원성 세균 소독효과 판정

소독제의 어류 병원성세균에 대한 살균효과가 반응 시간과 농도에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위한 실험으로 *Vibrio sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* 각각의 현탁액을 농도별로 미리 PBS를 이용하여 희석해 놓은 소독제와 1:1로 3분, 20분, 60분간 반응 시킨 후 반응을 멈추기 위한 중화제로 1 % NaCl이 첨가된 BHIB (brain heart infusion broth. Difco) 배지를 위의 반응물과 1:1로 반응시킨다.

세균의 소독여부를 판정하기 위하여 최종 반응물을 1 % NaCl이 첨가된 BHIA (brain heart infusion agar. Difco)배지에 100 μ l씩 도말하여 24시간동안 23 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 각각의 처리 농도에 해당하는 세균의 콜로니수를 계수하여 초기균수에 대한 생존수의 감소율을 계산하여 그 효과를 판정하였다. 그 결과를 표 4에서 표 13에 나타내었다.

10종류의 시판 소독제의 어류병원세균에 대한 소독효과를 콜로니카운트법으로 실시한 결과,

1) 과산화수소수 제제의 경우, 유효 성분인 hydrogen peroxide가 35 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균, 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균 모두 시판 용액 처리농도 1600 ppm이상의 조건에서 20분간 처리시 99.9 % 이상의 살균효과를 나타내었고, 동일 농도에서 60분간 처리시에 4종류의 대상 세균이 99.99 % 이상 살균되어지는 것으로 조사 되어졌다. 시판 용액 1600 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 수중세균의 양을 99.9 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 hydrogen peroxide 560 ppm, 20분 이상의 처리가 필요한 것으로 판단되어졌다 (표 4).

표 4. 과산화수소수제재 처리에 따른 어류병원세균의 살균 효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	90	99	99.99	>99.999
	60min	<90	<90	<90	90	99	99.9	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	<90	90	99	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	90	99	99.9	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.9	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.99	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.9	99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	99	99.99	>99.999

2) 차아염소산염 제재의 경우, 유효 성분인 sodium hypochlorite solution available chlorine이 11.5 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오팀, 에드워드균은 시판용액 처리농도 400 ppm 이상 농도에서 20분 이상의 처리조건에서 99.9 % 이상의 살균 효과를 나타내었으나, 연쇄구균의 경우 20분 처리시는 800 ppm, 60분 처리시는 400 ppm의 처리 농도에서 99.99 %의 살균력을 나타내었고, 포도상구균의 경우 다른 세 종류의 균에 비하여 저항력이 조금강한 결과를 보였는데, 포도상구균의 99.99 % 이상의 살균을 위해서는 1600 ppm 이상의 시판 제재 처리 농도 조건이 요구되어지는 결과를 나타내었다.

시판 용액 400, 800 및 1600 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 44, 88 및 176 ppm의 농도 조건으로 4 종류의 세균을 공히 99.999 % 이상 살균시키기 위해 요구되어지는 유효 처리 농도 조건은 176 ppm 이상으로 20분 이상 처리로 판단되어졌다. 하지만 이 농도 범위는 생물에 있어 매우 유해한 농도 조건으로서 그 사용에 있어 독성 농도 결과를 참조하여 생물과 직접 연관이 없는 단순한 기구의 소독 및 출입자의 장비 소독에 적용하는 것이 타당할 것으로 판단되었다 (표 5).

표 5. 차아염소산염제재 처리에 따른 어류병원세균의 살균 효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99.9	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	99.99	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99.99	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	99	99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	90	99	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	99	99	>99.999	>99.999

3) 안정화 이산화염소 제재의 경우, 유효 성분인 ClO_2 가 5 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리�균 및 에드워드균에 한하여 최고 처리 농도 조건인 3200 ppm의 조건에서만 99.9 이상의 소독효과가 인정되었으나, 연쇄구균 및 포도상구균의 경우 실험 최고 농도 조건인 3200 ppm의 조건에서 3 order 이상의 균수를 제균 시키지 못하여 그 효과가 미미함을 확인할 수 있었다.

시판 용액 3200 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 수중세균의 양을 99.9 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 160 ppm, 60분 이상의 처리가 필요한 것으로 판단되어졌다. 일반적으로 순수 이산화염소 단일제재의 경우 100 ppm의 전후에서 유효 세균 소독효과가 나타나는 점과 비교해 보았을때 시판되는 본 실험 대상제재의 경우 그 유효 염소가 순수 이산화염소 및 그 외 이온화 된 이산화염소를 모두 포함한 양을 유효 이산화 염소량으로 표기 함으로 생긴 오차로서 생각되어지고, 더불어 염소의 안정화 사용되어진 알 수 없는 다른 성분이 이산화염소가 가진 소독력을 감소시킨 결과로 이와 같이 높은 농도가 실제 소독에는 필요한 것으로 나타나 것이 아닌가 하고 생각되어졌다.

따라서 안정화 이산화염소를 소독제로 사용할 경우, 사용자의 측면에서 유효 성분 및 혼합되어진 기타 성분의 소독력 장애에 관한 검토가 따라야 할 것으로 생각되어졌다 (표 6).

표 6. 안정화 이산화염소제재의 처리에 따른 어류병원세균의 살균 효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.9
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.9
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	99.99
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	99	99.99
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90	95
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.5

4) 포비돈 요오드 제재의 경우, 유효 성분인 povidon iodine이 10 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균, 에드워드균 및 연쇄구균의 경우 시판 용액 처리농도 800 ppm이상의 조건에서 20분간 처리시 99.9 % 이상의 살균효과를 나타내었고, 동일농도에서 60분간 처리시에 세균이 99.99 % 이상 살균되어지는 것으로 조사 되어졌다. 하지만 포도상구균의 경우 약간 저항성이 높게 나타나, 1600 ppm 이상의 시판제재의 처리에 의하여 99.9 % 이상의 살균 효과를 나타내었다.

시판 용액 800 및 1600 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 povidon iodine 80 및 160 ppm의 처리량으로서 수중의 비브리오, 에드워드균 및 연쇄구균의 경우 99.9 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 유효 농도 80 ppm으로 20분 이상의 처리 시간이면 가능하고, 포도상구균의 경우 유효 농도 160 ppm으로 20분 이상의 처리가 필요한 것으로 판단되어졌다 (표 7).

표 7. 포비돈 요오드제재의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	90	99.9	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	90	99.99	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	90	99	99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	90	99	99.9	99.99	>99.999
	60min	<90	<90	<90	90	99	99.9	99.99	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	90	95	99.9	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	90	95	99.99	>99.999

5) 포름 알데하이드 제재의 경우, 유효 성분인 formaldehyde 가 35% 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리�균, 에드워드균 및 연쇄구균의 경우 포비돈 요오드의 시험에서와 유사하게 시판 용액 처리농도 800 ppm 이상의 조건에서 20분간 처리시 99.9 % 이상의 살균효과를 나타내었고, 동일농도에서 60분간 처리시에 세균이 99.99 % 이상 살균되어지는 것으로 조사 되어졌다. 하지만 포도상구균의 경우 약간 저항성이 높게 나타나, 1600 ppm 이상의 시판제재의 처리에 의하여 99.9 % 이상의 살균 효과를 나타내었다.

시판 용액 800 및 1600 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 formaldehyde 280 및 560 ppm의 처리량으로서 수중의 비브리오, 에드워드균 및 연쇄구균의 경우 99.9 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 유효 농도 280 ppm으로 20분 이상의 처리 시간이면 가능하고, 포도상구균의 경우 유효 농도 560 ppm으로 20분 이상의 처리가 필요한 것으로 판단되어졌다. 하지만 이들 처리 조건은 생물에 매우 유독한 상태를 유발할 수 있는 조건으로서 실제 양식장에서 사용하기보다는 사육기구나 차량 등의 사전 소독에 적용하는 것이 타당할 것으로 판단되어졌다 (표 8).

표 8. 포르름 알데하이드제재의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99	99.99	99.99	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	90	99.99	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	90	99	99.95	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	<90	90	99	99.99	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	99	99.9	99.99	>99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	99	99.9	99.99	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	90	99.9	99.999
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	99	99.99	99.999

6) 글루타르 알데하이드 제재의 경우, 유효 성분인 glutaraldehyde가 10% 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균, 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균 모두가 시판 용액 처리농도 200 ppm이상의 조건에서 20분간 처리시 99.9 % 이상의 살균효과를 나타내었고, 동일농도에서 60분간 처리시에 세균이 99.99 % 이상 살균되어지는 것으로 조사 되어졌다. 아울러, 100 ppm의 시판 용액 농도를 60분간 처리하였을 경우, 99.9% 이상의 살균 효과를 나타내는 것이 확인 되어졌다.

시판 용액 100과 200 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 glutaraldehyde 10 및 20 ppm의 처리량으로서 수중의 비브리오, 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균의 경우 99.99 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 유효 농도 20 ppm으로 20분 이상의 처리 시간이면 가능하고, 10 ppm의 처리의 경우 60분간의 침지 조건에서 99.9 % 이상의 세균을 살균을 할 수 있는 것으로 판단되어졌다.

이들 처리 조건은 생물에 유독한 상태를 유발할 수 있는 조건과는 상당히 차를 가진 비교적 안정된 농도 범위로서 실제 양식장에서 사용되어지는 수중의 병원체를 처리하기에 다른 소독제에 비하여 유리한 점을 가진 것으로 판단되어졌다 (표 9).

표 9. 글루타르 알데하이드제재 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	99	99.99	99.999	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	99	99.9	99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	99.99	99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	90	99.9	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	90	99.5	99.95	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	90	99.99	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99.99	99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999

7) 4급 암모늄염 혼합제재 A의 경우, 유효성분인 Octyldecyl dimethyl ammonium, Dioctyl dimethyl ammonium chloride, Didecyl dimethyl ammonium chloride, Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride가 각각 2.250 %, 1.125 %, 1.125 % 및 3.000 %가 함유되어져, 계 유효성분량이 7.5 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균, 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균 모두가 시판 용액 처리농도 200 ppm이상의 조건에서 20분간 처리시 99.9 % 이상의 살균효과를 나타내었고, 동일농도에서 60분간 처리시에 에드워드균, 연쇄상구균 및 포도상구균이 99.99 % 이상 살균되어지는 것으로 조사 되어졌다. 아울러, 100 ppm의 시판 용액 농도를 60분간 처리하였을 경우 포도상구균에 한정되어 99.9% 이상의 살균 효과를 나타내는 것이 확인 되어졌다.

시판 용액 100과 200 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 Octyldecyl dimethyl ammonium, Dioctyl dimethyl ammonium chloride, Didecyl dimethyl ammonium chloride, Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride 혼합액이 7.5 및 15 ppm으로 계산된다. 이를 수중에 처리할 경우 수중의 비브리오, 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균의 경우 99.99 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 유효 농도 15 ppm으로 20분 이상의 처리 시간이면 가능하고, 7.5 ppm의 처리의 경우 60분간의 침지 조건에서 포도상구균에 한하여 99.9 % 이상의 세균을 살균할 수 있는 것으로 판단되어졌다.

이들 처리 조건은 생물에 유독한 상태를 유발할 수 있는 조건과는 상당히 차를 가진 비교적 안정된 농도 범위로서 실제 양식장에서 사용되어지는 수중의 병원체를 처리하기에 있어 글루타르 알데하이드 처리 효과와 유사하여 다른 소독제에 비하여 유리한 점을 가진 것으로 판단되어졌다 (표 10).

표 10. 4급 암모늄염혼합제제A의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	90	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	99	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	99	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	90	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	90	99	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99	99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	90	99	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99.9	99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999

8) 4급 암모늄염 단일제재 B의 경우, 유효성분인 Didecyl dimethyl ammonium chloride가 10 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균의 경우 시판 용액 처리농도 100 ppm 20분 조건에서 99.9 % 살균력을 보인 것 이외에 동일조건에서 에드워드균, 연쇄구균 및 포도상구균 모두가 시판 용액 처리농도 100 ppm이상의 조건에서 20분간 및 60분간 처리시 99.999 % 이상의 완벽한 살균효과를 나타내었다. 아울러, 그람 양성균인 연쇄구균과 포도상구균을 대상으로한 최저 처리 농도 조건인 25 ppm의 조건에서도 이들 두 종류의 세균은 99.9 % 이상 사멸되어지는 우수한 소독효과가 확인 되어졌다.

시판 용액 100 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 Didecyl dimethyl ammonium chloride 10 ppm의 유효 농도 조건이 되는데, 이러한 조건으로 두 종류의 간균 및 구균은 거의 완전히 소독되어지고, 더욱 낮은 농도조건인 유효농도 조건 2.5 ppm의 조건에서 그람 양성균인 연쇄구균 및 포도상구균의 경우 99.9 % 이상의 소독효과가 확인 되어졌다.

이 결과는 이번에 비교하고자 한 10종의 소독제 중에서 가장 완벽한 소독효과를 표시한 것으로서, 이들 처리 조건은 생물에 유독한 상태를 유발 하지 않는 비교적 안정된 농도 범위의 처리 조건으로서도 완벽한 살균 효과를 보인 점에서 실제 양식장에서 사용되어지는 수중의 병원체를 처리하기에 있어 글루타르 알데하이드 및 4급 암모늄 복합제재와 더불어 유효한 소독제로서의 검토 필요성이 매우 높은 소독제로 판단되어졌다 (표 11).

표 11. 4급 암모늄염단일제재B의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	90	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	95	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	90	95	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	90	95	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	99.9	99.99	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999

9) 오르소 디클로로 벤젠 제제의 경우, 유효 성분인 O-dichlorobenzene, Methanol 및 Cresol이 각각 750, 40, 및 50 g/kg으로 혼합되어져 있는 혼합제제로 이와같이 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 비브리오균, 에드워드균, 연쇄상구균 및 포도상구균은 시판용액 처리농도 400 ppm 이상 농도에서 20분 이상의 처리조건에서 99.9 % 이상의 살균 효과를 나타내었다. 이들 모든 세균의 경우 200 ppm의 처리 농도로서 60분간의 처리시간을 주었을 경우 20분처리 조건에서는 99 %에 머물던 소독 효과가 99.9 % 이상으로 상승하는 효과를 나타내었다.

시판 용액 200 및 400 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하면 160 및 320 ppm의 농도 조건으로 4 종류의 세균을 공히 99.9 % 이상 살균시키기 위해 요구되어지는 유효 처리 농도 조건은 320 ppm 이상으로 20분 이상 처리로 판단되어졌다. 하지만 이 농도 범위는 생물에 있어 매우 유해한 농도 조건으로서 그 사용에 있어 독성 농도 결과를 참조하여 생물과 직접 연관이 없는 단순한 기구의 소독 및 출입자의 장비 소독에 적용하는 것이 타당할 것으로 판단되었다 (표 12).

표 12. 오르소 디클로로벤젠 제재의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio</i> sp.	20min	<90	<90	90	99	99.9	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	<90	90	99.9	99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	90	99	99.9	99.9	99.999	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	90	99	99.9	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Streptococcus</i> sp.	20min	<90	90	95	99	99.99	99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99	99.99	99.99	>99.999	>99.999	>99.999
<i>Staphylococcus</i> sp.	20min	<90	90	90	99	99.99	>99.999	>99.999	>99.999
	60min	<90	90	99	99.9	>99.999	>99.999	>99.999	>99.999

10) 황산동 제재의 경우, 유효 성분인 copper sulfate가 99 % 함유되어진 상태의 시판용 약제를 원액으로 취급하여 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 및 3200 ppm으로 20분 및 60분간 반응 시켰을 때 에드워드균에 한하여 최고 처리 농도 조건인 3200 ppm의 조건에서만 99.999 이상의 소독효과가 인정되어졌으나, 그 외 비브리오, 연쇄구균 및 포도상구균의 경우 실험 최고 농도 조건인 3200 ppm의 조건에서 90 % 이상의 균수를 제균 시키지 못하여 그 효과가 미미함을 확인할 수 있었다.

시판 용액 3200 ppm의 조건은 유효 성분 농도로 환산하여도 동일한 농도로서 수중세균의 양을 99.9 % 이상 살멸시키기 위한 처리 조건은 적어도 3200 ppm 이상의 처리가 필요한 것으로 판단되어졌다. 따라서 황산동의 세균 소독제로서의 사용 가능성은 매우 희박한 것으로 판단되었다 (표 13).

표 13. 황산동 제재의 처리에 따른 어류병원세균의 살균효과

		처리된 소독제의 농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1600	3200
<i>Vibrio sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90
<i>Edwardsiella tarda</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	90	95	99
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	95	99.5	99.999
<i>Streptococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90
<i>Staphylococcus sp.</i>	20min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90
	60min	<90	<90	<90	<90	<90	<90	<90	90

이들 결과를 종합하여 표 14에 나타내었다. 그 결과를 종합적으로 검토하여 보면,

1) 4종류의 어류 병원세균에 대하여 가장 높은 소독력을 나타내는 제재는 4급 암모늄 단일제재B로서 유효성분농도 2.5 ppm (처리농도 25 ppm)의 조건에서 그램 양성균은 전면 사멸시키고, 유효 5 ppm 이상의 조건에서 그램 음성의 세균에도 높은 소독력을 나타내고 있다.

2) 4급 암모늄 단일제재B와 함께 높은 효과가 나타난 종류는 글루타르 알드하이드 제재와 4급 암모늄 혼합제재A의 경우가 좋은 살균 효과를 나타내었는데 2종류의 경우 유효성분 농도 15 ppm 이상의 농도, 20분 이상의 처리에서 99.9 % 이상의 소독력이 있음을 확인 할 수 있었다.

3) 차아염소산염 제재의 경우 유효농도 44 ppm 이상으로 20분 이상 처리할 경우 그램음성균이 99.9 % 이상, 그램 양성균이 99 % 이상 사멸되는 것으로 나타났다.

4) 포비돈 요오드 제재의 경우 유효농도 80 ppm -160 ppm의 처리로 99.9 % 이상의 살균 효과를 기대할 수 있는 것으로 보인다.

5) 오르소 디클로로벤젠 제재의 경우 150 ppm - 300 ppm의 유효성분 처리조건이 되어야 살균 가능하고,

6) 포름 알데하이드 제재의 경우는 99.9 % 이상의 살균을 위하여 유효성분 560 ppm 이상 즉 시판농도로 1600 ppm 이상의 처리 조건이 필요한 것으로 나타났다.

7) 과산화수소수 제재의 시판 상품내 hydrogen peroxide가 35%인 점에서 실제 유효농도로 계산하여보면, 처리농도 1600 ppm 즉 유효농도 560 ppm 이상으로 20분 이상의 경우 99.9 %이상의 살균효과가 있는 것으로 판단되었다.

8) 안정화 이산화염소 제재의 경우 본 실험 조건에서는 99.9 % 이상의 소독효과를 얻는 농도는 3200 ppm 즉 유효농도 160 ppm 이상의 조건이 필요한 것으로 판단되어졌다.

9) 본 실험을 통하여 확인한 결과 세균에 대하여 가장 효과가 떨어지는 소독제는 황산동으로 나타났는데 99% 이상의 세균을 살균하기 위하여서는 유효농도 조건으로 3200 ppm 이나 또는 그 이상이 필요하여 실제 세균 소독제로서의 사용가능성은 매우 희박한 것으로 판단되어졌다.

표 14. 시판소독제의 어류 병원세균 99.9 %이상 살균 표준 조건

소독제의종류	20분처리(ppm)		60분처리(ppm)	
	시판재제	유효농도	시판재제	유효농도
과산화수소 제재	1600	560	1600	560
차염소산염 제재	800	88	400	44
안정화이산화염소 제재	>3200	>160	>3200	>160
포비돈요오드 제재	1600	160	1600	160
포름알데하이드 제재	1600	560	1600	560
구루타르알데하이드 제재	200	20	100	10
4급암모늄염복합A 제재	200	15	200	15
4급암모늄염단일B 제재	100	10	100	10
오르소디클로르벤젠 제재	400	320	200	160
황산동 제재	-*	-	-	-

*: - 세균에 대한 소독력을 확인할 수 없음

2. 어류 양식장 사용수 유기물 조건에 따른 소독제의 살균 효과

소독제를 양식현장에 적용하여 사용하기 위하여서는 일반적인 양식현장에서 소독을 목적으로 사용할 수 있는 두 가지 종류의 물의 조건을 생각할 수 있는데, 그 하나는 사육이 이루어지고 있는 사육수와, 사육을 위하여 전처리과정을 거쳐 유입시키고자하는 사육원수를 나누어 생각할 수 있다. 본 실험에서는 이들 두 가지 조건의 어류양식장 소독대상수의 유기물조건을 일반적인 조건에서 분석하여 그 각각의 유기물 조건이었을 때, 앞선 연구 내용에서 얻어낸 소독제의 살균효과가 어떻게 변화되는 지를 확인 함으로서, 실제 사용할 수 있는 농도를 검토하고자 하였다. 이를 위하여 어류 병원성세균인 *Vibrio sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* 를 유기물이 있는 조건인 일반적인 어류사육조내 사육수와 어류사육용 원수로 투입하는 여과해수에 일정 세균수로 조정하여 현탁 시킨 후, 각각의 소독제를 원액으로 하여 조정한 농도 조건에 따른 살균효과를 콜로니계수법으로 실시하고 그 효과를 검정하였다. 실험용 사용수의 유기물은 상법에 따라 SS 및 COD 양을 측정하여 그 기준으로 삼았으며 분석결과는 표 15에 나타내었고, 유기물이 다량인 조건의 사육수에 처리하였을 때의 소독효과를 표 16에 제시하였고, 상대적으로 유기물이 대다수 제거되어진 여과해수에 소독제를 처리하였을 때의 소독효과를 표 17에 나타내었다.

각각의 어류 양식장 사육수내 수중 유기물 조건에 따른 소독제별을 소독효과의 변동을 확인하기 위하여 사용한 두 종류 즉, 넙치 양식장의 사육수와 사육원수용 여과해수를 대상으로 수중의 SS와 COD를 분석하여본 결과 사육수의 SS는 56 ppm 정도로서, 여과해수의 18 ppm 정도에 비하여 3배 이상 높은 조건이었고, COD의 경우 사육수내 5 ppm 정도인 것에 비하여 여과수는 0.60으로 약 10배의 양적인 차이를 나타내고 있는 조건을 확인 할 수 있었는데 이 결과는 일반적으로 다른 연구에서 확인되어지는 넙치 등의 사육조내 사육수 및 원수의 측정 결과치와 그 농도 범위가 유사하여, 본 연구에서 얻고자 하는 어류 사육장의 처리조건을 잡는 실험의 목적으로 보았을 때 합당한 범위로 판단 할 수 있었다.

표 15. 넙치 사육장내 일반 사육수 및 여과 사육원수내 유기물양 측정

	시험수	
	사육수	여과해수
SS (ppm)	56.14	18.00
COD (ppm)	5.075	0.60

넙치 양식장의 사용 사육수의 유기물 조건인 SS 56.14 ppm 및 CDO 5.075 ppm의 조건수에 10종류의 소독제를 각각 설정 실험 농도로 살포하고, 4종류의 어류병원세균의 살균 효과를 실험한 결과를 검토해 보면,

1) 과산화수소수 제제, 포비돈 요오드 제제, 포름 알데하이드 제제, 4급 암모늄 단일제제B, 오르소 디클로로벤젠 제제의 처리 효과는 앞선 연구에서 측정된 시험관 조건에서의 소독효과에 비하여 그 변화는 인정할 수 없는 범위로 나타나, 그 효과는 같은 정도로 판단되어졌고,

2) 안정화 이산화염소 제제, 4급 암모늄 혼합제제A, 황산동 제제의 경우 그람음성균은 효과가 유지되거나 약간의 감소가 나타나는 결과를 나타내었는데 비하여 그람양성균에 대해서는 약간의 효과 상승을 보인 결과가 나타났다.

3) 글루타르 알데하이드 제제의 경우는 4종류의 세균에 대하여 모두 표준조건의 소독효과에 비하여 약간의 상승효과가 나타났다.

4) 한편, 차아염소산염 제제의 경우 그람양성균은 그 효과가 유지되어지지만 음성균의 경우, 본 사육수의 유기물 조건에서 소독효과가 2 - 3배 정도 낮아짐을 확인할 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 사육수의 유기물 오염조건에서 시판소독제의 세균에 대한 99.9 % 소독효과를 얻을 수 있는 조건을 정리하여 표 16에 나타내었다.

4급 암모늄 단일제제 및 글루타르 알드하이드 제제, 4급 암모늄 혼합제제A의 경우가 좋은 살균 효과를 나타내었다. 차아염소산염 제제의 경우 유효농도 88 ppm 이상으로 20분 이상 처리할 경우 99.9 % 이상의 소독효과가 인정되었다. 포비돈 요오드 제제의 경우 유효농도 160 ppm의 처리로 99.9 % 이상의 살균 효과를 기대할 수 있는 것으로 보인다. 오르소 디클로로벤젠 제제의 경우 160 ppm -

320 ppm의 유효성분 처리조건이 되어야 살균 가능하고, 포름 알데하이드 제재의 경우는 99.9 % 이상의 살균을 위하여 유효성분 560 ppm 이상 즉 시판농도로 1600 ppm 이상의 처리 조건이 필요한 것으로 나타났다. 과산화수소수제재는 유효농도 1120 ppm 이상으로 20분이상의 경우 99.9 %이상의 살균효과가 있는 것으로 판단되었다. 안정화 이산화염소 제재의 경우 본 실험 조건에서는 99.9 %이상의 소독효과를 얻는 농도는 3200 ppm 즉 유효농도 160 ppm 이상의 조건이 필요한 것으로 판단되어졌다.

표 16. 사육수* 조건에서 시판소독제의 어류병원세균 99.9 % 이상 살균조건

소독제의종류	20분처리(ppm)		60분처리(ppm)	
	시판제제	유효농도	시판제제	유효농도
과산화수소 제제	3200	1120	1600	560
차아염소산염 제제	800	88	800	88
안정화이산화염소 제제	>6400	>320	>6400	>320
포비돈요오드 제제	1600	160	1600	160
포름알데하이드 제제	1600	560	1600	560
구루타르알데하이드 제제	200	20	100	10
4급암모늄염복합A 제제	200	15	150	11
4급암모늄염단일B 제제	150	15	100	10
오르소디클로르벤젠 제제	400	320	200	160
황산동 제제	>3200	>3200	3200	3200

* SS 56.14 ppm 및 CDO 5.075 ppm의 유기물 조건수

어류 양식장의 방역을 위하여 사육 단계에 들어가기 전에 사용하는 사육용 원수를 관리하는 것은 매우 중요한 질병 예방 작업으로 인식되고 있는데, 다음의 표 17에서는 일반적인 방법으로 여과시켜 사육원수로 사용하는 여과해수에 소독제를 사용하여 살균하고자 할 때, 그 효과의 기대 범위를 예측할 수 있는 결과를 정리하여 제시하였다.

여과해수조건에서의 소독효과, 즉 SS 18 ppm 및 CDO 0.60 ppm의 유기물 조건수에 10종류의 소독제를 각각 설정실험농도로 살포하고, 4종류의 어류병원세균의 살균 효과를 실험한 결과를 살포하고 그 살균효과를 조사한 결과에서 보면,

1) 과산화수소수 제제, 안정화 이산화염소 제제, 포비돈 요오드 제제, 포름 알데하이드 제제, 4급 암모늄 단일제제B, 오르소 디클로로벤젠 제제의 처리 효과는 표준 조건 및 사육수 조건에서 측정한 소독효과와 유사한 정도로 판단되어졌고,

2) 4급 암모늄 혼합제제A, 황산동 및 글루타르 알데하이드 제제의 경우는 약간의 효과 변화가 나타났다.

하지만 전반적인 효과를 검토해 보면 이들 소독제제를 양식장내의 정상적인 사육수준의 사육수중 및 여과 해수 중에 처리하여 소독을 하는 경우 그 효과의 변동은 표준적인 크게 염려할 정도는 아닌 것으로 판단되어져, 효과가 확인 되어지는 유효농도 및 소독시간을 지켜서 소독 작업을 행하는 조건에서라면 본 연구에서 표준, 사육수, 여과해수 조건의 소독효과의 범위내의 결과를 기대할 수 있을 것으로 판단되어졌다.

표 17. 여과해수조건*에서 시판소독제의 어류병원세균 99 %이상 살균조건

소독제의종류	20분처리(ppm)		60분처리(ppm)	
	시판재제	유효농도	시판재제	유효농도
과산화수소 제재	3200	1120	1600	560
차아염소산염 제재	800	88	400	44
안정화이산화염소 제재	>6400	>320	>6400	>320
포비돈요오드 제재	1600	160	1600	160
포름알데하이드 제재	1600	560	800	280
구루타르알데하이드 제재	200	20	100	10
4급암모늄염복합A 제재	200	15	100	7.5
4급암모늄염단일B 제재	100	10	100	10
오르소디클로르벤젠 제재	400	320	200	160
황산동 제재	>3200	>3200	>3200	>3200

* SS 18ppm 및 CDO 0.60ppm의 유기물 조건수

3. 바이러스에 대한 소독제의 불활화 실험

국내 양식어류로부터 분리되어 본 연구실에서 보관중인 MABV와 IPNV는 CHSE-214세포, HRV는 RTG-2세포를 이용하여 배양하였다. 바이러스는 역가를 높이기 위해 각각 2회의 계대배양을 실시하였으며 MABV, IPNV는 75cm² tissue culture flask에 Dulbecco's Modified Eagle Medium-5 (DMEM: 100 ug/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 5% Fetal Bovine Serum, pH 7.4)를 이용하여 단층 배양된 CHSE-214세포에 접종한 후 20 °C에서 배양하였고, HRV는 75 cm² tissue culture flask에 DMEM-5를 이용하여 단층 배양된 RTG-2세포에 접종하여 15 °C에서 대량 배양하였다. 이들 3종류의 바이러스 배양액을 각각 96 well plate를 이용한 감염가 확인을 행하고, 각각의 바이러스는 1ml씩 분주하여 -80 °C에 보관하며 실험에 사용하였다.

CHSE-214 cell line과 RTG-2 cell line을 계대배양하여 96 well microplate에 cell수가 2.5×10^5 cells /ml가되게 100 μ l씩 분주한 후 15°C에서 15시간 배양 후, DMEM-0에 10배 희석계열로 희석한 MABV, IPNV는 CHSE-214 cell line에 100 μ l씩 접종후 20 °C에서 그리고 HRV는 RTG-2 cell line에 100 μ l씩 접종후 13 °C에서 7일간 배양하면서 CPE를 관찰하고 Reed & Muench (1938)의 방법으로 TCID₅₀값을 계산하였다.

소독제의 어류 병원성 바이러스에 대한 살균효과가 반응 시간과 농도에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위한 실험으로 시판소독제를 원액으로 하여 그 최종농도를 3000, 1500, 800, 400, 200, 100, 50, 25ppm이 되게 조정한 소독제액과 MABV, IPNV, HRV바이러스액을 $2 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀ /ml로 조정하여 준비한 바이러스액을 1:1로 20분, 60분간 반응시키고, 반응 시간 경과된 후, 소독제의 반응을 정지시킬 목적의 소독제의 중화제로서 DMEM-0을 1:100으로 반응시켜서, 세포가 단층 배양된 96 well microplate에 100 μ l씩 접종하고 각각의 온도에서 7일 동안 배양하면서 CPE의 변화를 관찰하였다. 이들 소독제 처리에 따른 바이러스의 감염가의 변화 결과를 표 18, 19, 20에 나타내었다.

표 18. 시판 소독제의 사용 농도와 반응시간에 따른 MABV의 감염가
(log₁₀TCID₅₀/ml)

		시판 소독제의 처리농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1500	3000
과산화수소수 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5	5	5	5	5
	60min	5.5	5.5	5	5	5	5	4.5	4
차아염소산염 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	3.5	2	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	2.5	<2	<2
안정화 이산화염소 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5	3.5
포비돈 요오드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	4.5	4.5	3	3	2
	60min	5.5	5.5	5.5	4	3	2	<2	<2
포름알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	3	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	4	<2	<2
글루타르 알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5	4.5	4	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5	4.5	3	3	<2	<2
4급암모늄염 혼합제재A	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5
4급암모늄염 단일제재B	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5	3
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	3	2
오르소 디클로로벤젠 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4	4
황산동 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5

표 19. 시판 소독제의 사용농도와 반응시간에 따른 IPNV의 감염가

(log₁₀TCID₅₀/ml)

		처리된 소독제의 농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1500	3000
과산화수소수 제재	20min	5.5	5.5	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4
	60min	5.5	5	4.5	4.5	4.5	4	4	4
차아염소산염 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5	3	2	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5	2	<2	<2	<2
안정화 이산화염소 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	4
포비돈 요오드 제재	20min	5.5	5.5	5	4.5	4	4	2	<2
	60min	5.5	5	5	4	3	2	<2	<2
포름알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5	4	4	<2	<2
글루타르 알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	4.5	4.5	3	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	4.5	4	<2	<2	<2
4급암모늄염 혼합제재A	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5
4급암모늄염 단일제재B	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	3.5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4	3	2
오르소 디클로로벤젠 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5
황산동 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5

표 20. 시판 소독제의 사용농도와 반응시간에 따른 HRV의 감염가
(log₁₀TCID₅₀/ml)

		처리된 소독제의 농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1500	3000
과산화수소수 제재	20min	5.5	5.5	5	5	4.5	4.5	4	4
	60min	5.5	5.5	4.5	4.5	4	4	4	3.5
차아염소산염 제재	20min	5.5	5.5	4.5	3.5	3.5	<2	<2	<2
	60min	5.5	5	4	3	3	<2	<2	<2
안정화 이산화염소 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5	5	4.5	4.5	3.5
	60min	5.5	5.5	5.5	4.5	4.5	4.5	4	3
포비돈 요오드 제재	20min	5.5	5.5	5	4	2	2	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5	3.5	2	<2	<2	<2
포름알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5	4.5	3.5	<2	<2
글루타르 알데하이드 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5	4.5	3	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5	4.5	3.5	<2	<2	<2
4급암모늄염 혼합제재A	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5	5	3
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5	4.5	3
4급암모늄염 단일제재B	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	4
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5	3.5	3
오르소 디클로로벤젠 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5	5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5	4
황산동 제재	20min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5
	60min	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	4.5	4.5

소독제처리에 따른 바이러스감염가의 변동은 대조군 바이러스액의 감염가인 $1 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀ /ml를 기준으로 CPE 확인에 의한 감염가의 변동을 바이러스종류별과 비교해보면 인벨롭을 가지고 있지 않은 MABV 및 IPNV의 경우 검출 한계인 $1 \times 10^{2.0}$ TCID₅₀ /ml 이하 까지 불활성화 시키는 소독제로서는 차아염소산염 제재, 포비돈 요오드 제재, 포름알데히드 제재, 글루타알데히드 제재가 확인되어졌고 (표 18, 19), 인벨롭을 가지는 랩도바이러스에 포함되는 HRV의 경우 IPNV 및 MABV와 마찬가지로 차아염소산제재, 포비돈 요오드 제재, 포름알데히드 제재, 글루타 알데히드 제재에서만 확인되어진 점은 동일하지만 안정화 이산화염소 제재, 포비돈 요오드 제재 및 4급 암모늄염 단일제재B에 좀더 민감히 반응하는 것으로 나타났다 (표 20).

표18, 19 및 20에서 얻어진 결과를 바탕으로 시판소독제 자체 내에 포함하고 있는 유효농도의 처리조건에 따른 3종류의 바이러스 각각에 대한 불활성화 효과를 검토한 결과를 표 21에서 표30에 나타내었다.

1) 시판용 과산화수소수 제재의 실험에 적용되어진 유효성분량은 8.7, 17.5, 35, 70, 140, 280, 525, 1050 ppm의 조건이었는데, HRV의 경우 1050 ppm 60분의 처리조건에서 99 %의 불활화율을 보인 이외에 그 이하의 농도조건 및 처리시간조건에서 3종의 모든 바이러스에 대하여 그 이하의 낮은 바이러스 불활화율을 나타내어 실제적인 양식장에서의 바이러스 방역용으로서 활용성은 효율면에서 매우 기대할 수 없는 정도로 판단되었다 (표 21).

2) 시판용 차아염소산 제재의 적용되어진 유효성분량은 2.9, 5.8, 11.5, 23, 46, 93, 172.5, 345 ppm의 조건이었는데, 이 소독제는 HRV의 경우 23 ppm 20분의 처리조건 이상에서는 99 % 이상의 소독효과를 기대할 수 있었으며, IPNV 및 MABV의 경우에는 50 ppm 정도 이상의 처리 조건이라면 99 % 이상의 불활화율을 기대할 수 이 있을 것이라고 판단되어졌다 (표 22).

표 21. 시판용 과산화수소수 제재내 hydrogen peroxide 유효농도 조건별
 어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		Hydrogen peroxide 유효농도(ppm)							
		8.7	17.5	35	70	140	280	525	1050
MABV	20min	0	0	0	68.4	68.4	68.4	68.4	68.4
	60min	0	0	68.4	68.4	68.4	68.4	90.0	96.8
IPNV	20min	0	0	68.4	90.0	90.0	90.0	90.0	96.8
	60min	0	68.4	90.0	90.0	90.0	96.8	96.8	96.8
HRV	20min	0	0	68.4	68.4	90.0	90.0	96.8	96.8
	60min	0	0	90.0	90.0	96.8	96.8	96.8	99.0

표 22. 시약용 차아염소산염 제재의 상품내 available chlorine 유효농도 조건별
 어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		Available chlorine 유효농도(ppm)							
		2.9	5.8	11.5	23	46	92	172.5	345
MABV	20min	0	0	0	0	90.0	99.0	99.97	>99.99
	60min	0	0	0	0	90.0	99.9	>99.99	>99.99
IPNV	20min	0	0	0	68.4	99.7	99.97	>99.99	>99.99
	60min	0	0	0	68.4	99.97	>99.99	>99.99	>99.99
HRV	20min	0	0	90.0	99.0	99.0	>99.99	>99.99	>99.99
	60min	0	68.4	96.8	99.7	99.7	>99.99	>99.99	>99.99

3) 시판용 안정화 이산화염소 제재의 경우, 유효성분량이 1.3, 2.5, 5, 10, 20, 40, 75, 150 ppm이 되는 농도 조건에서 실험이 행하여졌는데 최고 조건인 150 ppm의 처리조건일 경우 HRV 및 MABV에 대해서만 99 % 이상의 불활화율이 산정되어졌으나, 그 이하의 처리조건에서는 낮은 바이러스 불활화율을 나타내어 실제적인 양식장에서의 바이러스 방역용으로서 사용할 경우 이보다 높은 농도의 유효농도 범위를 적용하여야지만 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다 (표 23).

4) 시판용 포비돈 요오드 제재의 경우, 유효성분량은 2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80, 150, 300 ppm의 조건에서 실험이 이루어졌는데 3가지 바이러스 전체를 대상으로 40 - 80 ppm 농도의 중간정도 즉 50 - 60 ppm의 농도 처리에 의하여 99 % 이상의 불활화율을 기대할 수 있는 처리 조건이 확인되어졌다 (표 24).

5) 포름 알데히드 제재의 경우는 8.8, 17.5, 35, 70, 140, 280, 525, 1005 ppm 유효농도 조건에서 이루어진 실험에서 500 ppm 이상의 유효농도 조건이 성립되어 질 경우에만 바이러스의 제어가 기대되어질 수 있는 조건으로 확인되어져, 실제적으로 어류양식장내 사육중의 조건에서 약욕 등의 처리를 할 경우에는 적용할 수 없는 농도 조건으로 생각되어졌다 (표 25).

6) 글루타르 알데하이드 제재의 경우 유효 농도범위가 2.5, 5.0, 10, 20 ppm의 조건에서는 바이러스의 완전한 제거는 어려운 것으로 판단되었고, 50 ppm 이상의 처리조건을 가정한다면 99 % 이상의 소독효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어졌으나, 공기 중에 기화될 경우 심한 유독물질로 작용할 수 있는 점에서 폐쇄된 시설에서의 실내 사용에는 부적합하나, 개방된 상태의 조건에서는 처리비용 등을 감안하여 사용할 수 있을 것으로 판단되었다 (표 26).

표 23. 시판용 안정화이산화염소 제재의 상품내 ClO₂ 유효농도 조건별
어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		ClO ₂ 유효농도(ppm)							
		1.3	2.5	5	10	20	40	75	150
MABV	20min	0	0	0	0	0	0	68.4	90.0
	60min	0	0	0	0	0	68.4	90.0	99.0
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	68.4	90.0
	60min	0	0	0	0	0	0	90.0	96.8
HRV	20min	0	0	0	68.4	68.4	90.0	90.0	99.0
	60min	0	0	0	90.0	90.0	90.0	96.8	99.7

표 24. 시판용 포비돈 요오드 제제의 상품내 povidon iodine의 유효농도 조건별
 어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		Povidon Iodine의 유효농도(ppm)							
		2.5	5.0	10	20	40	80	150	300
MABV	20min	0	0	0	90.0	90.0	99.7	99.7	99.97
	60min	0	0	0	96.8	99.0	99.97	>99.99	>99.99
IPNV	20min	0	0	68.4	90.0	96.8	96.8	99.97	>99.99
	60min	0	68.4	68.4	96.8	99.7	99.97	>99.99	>99.99
HRV	20min	0	0	68.4	96.8	99.97	99.97	>99.99	>99.99
	60min	0	0	68.4	99.0	99.97	>99.99	>99.99	>99.99

표 25. 시판용 포름 알데하이드 제재의 상품내 formaldehyde 유효농도 조건별
어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		Formaldehyde 유효농도(ppm)							
		8.8	17.5	35	70	140	280	525	1005
MABV	20min	0	0	0	0	0	90.0	99.7	>99.99
	60min	0	0	0	0	90.0	96.8	>99.99	>99.99
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	>99.99	>99.99
	60min	0	0	0	68.4	96.8	96.8	>99.99	>99.99
HRV	20min	0	0	0	0	0	0	68.7	>99.99
	60min	0	0	0	68.4	90.0	99.0	>99.99	>99.99

표 26. 시판용 글루타르 알데하이드 제제의 상품내 glutaraldehyde 유효농도 조건별 어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		Glutaraldehyde 유효농도(ppm)							
		2.5	5.0	10	20	40	80	150	300
MABV	20min	0	0	0	68.4	90.0	96.8	>99.99	>99.99
	60min	0	0	68.4	90.0	99.7	99.7	>99.99	>99.99
IPNV	20min	0	0	0	90.0	90.0	99.7	>99.99	>99.99
	60min	0	0	0	90.0	96.8	>99.99	>99.99	>99.99
HRV	20min	0	0	0	68.4	90.0	99.7	>99.99	>99.99
	60min	0	0	68.7	90.0	99.0	>99.99	>99.99	>99.99

7) 시판용 4급 암모늄염 혼합제재의 경우 1.9, 3.8, 7.5, 30, 60, 113, 225 ppm 조건의 유효농도 범위에서 검토해 본 결과 바이러스의 소독용으로서의 효용성은 높지 않은 것으로 판단되어졌다 (표 27).

8) 4급 암모늄염 단일제재의 경우 그 유효성분 농도가 2.5 ppm에서 300 ppm의 사이의 농도 구간에서 실험이 이루어 졌는데, 150 ppm 이상으로 처리되어진다면 효과를 기대할 수도 있는 제품으로 생각되어졌다 (표 28).

9) 오르소 디클로로벤젠 제재 (표 29) 및 황산동 제재의 경우 (표 30)는 실험 조건 최고 농도인 유효성분 각각 2250 ppm 및 3000 ppm의 조건에서도 99 % 이상의 불활화율을 나타내지 못하여, 실험에 적용한 다른 시판제품과 비교하였을 때 가장 낮은 적용 가능성을 보였다.

표 27. 시판용 4급 암모늄염 혼합제재 A의 상품내 유효성분의 농도 조건별
어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		혼합4급암모늄염 유효농도(ppm)							
		1.9	3.8	7.5	15	30	60	113	225
MABV	20min	0	0	0	0	0	0	68.4	68.4
	60min	0	0	0	0	0	0	68.4	68.4
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	0	68.4
	60min	0	0	0	0	0	0	68.4	68.4
HRV	20min	0	0	0	0	68.4	68.4	68.4	99.7
	60min	0	0	0	0	68.4	68.4	90.0	99.7

표 28. 시판용 4급 암모늄염 단일제재 B의 상품내 유효성분의 농도 조건별
어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		4급암모늄염 유효농도(ppm)							
		2.5	5.0	10	20	40	80	150	300
MABV	20min	0	0	0	0	0	68.4	90.0	99.7
	60min	0	0	0	0	0	90.0	99.7	99.97
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	90.0	99.0
	60min	0	0	0	0	0	96.8	99.7	99.97
HRV	20min	0	0	0	0	0	0	90.0	96.8
	60min	0	0	0	0	0	90.0	99.0	99.7

표 29. 시판용 오르소 디클로로벤젠 제제의 상품내 유효성분의 농도 조건별
 어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		O-dichlorobenzene의 유효농도(ppm)							
		18.8	37.5	75	150	300	600	1125	2250
MABV	20min	0	0	0	0	0	0	68.4	96.8
	60min	0	0	0	0	0	68.4	96.8	96.8
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	0	68.4
	60min	0	0	0	0	0	0	68.4	90.0
HRV	20min	0	0	0	0	0	68.4	68.4	68.4
	60min	0	0	0	0	0	68.4	90.0	96.8

표 30. 황산동 제재의 상품내 copper sulfate 유효성분의 농도 조건별
어류 병원바이러스의 불활성화 효과 (%)

		처리된 소독제의 농도(ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1500	3000
MABV	20min	0	0	0	0	0	0	0	0
	60min	0	0	0	0	0	0	0	68.4
IPNV	20min	0	0	0	0	0	0	0	0
	60min	0	0	0	0	0	0	68.4	68.4
HRV	20min	0	0	0	0	0	0	0	68.4
	60min	0	0	0	0	0	68.4	90.0	90.0

이상의 어류병원바이러스에 대한 10종의 시판 소독제 적용에 따른 바이러스 불활성화 효과를 검토한 결과를 종합해 보면,

- 1) 과산화수소수 제재- 바이러스 방역용으로서 활용성 기대할 수 없음
- 2) 차아염소산염 제재- 50ppm 이상 처리시 99% 이상의 불활화율 기대됨
- 3) 안정화 이산화염소 제재- 낮은 바이러스 불활화율을 보여 이용도 낮음
- 4) 포비돈 요오드 제재- 50-60ppm처리시 99% 이상의 불활화율이 기대됨
- 5) 포름 알데하이드 제재- 500ppm 이상의 농도 조건에서 유효성 기대됨
- 6) 글루타르 알데하이드 제재- 50ppm 이상 처리시 99% 이상의 소독효과 기대됨
- 7) 4급 암모늄염 혼합제재A- 225ppm 이상 처리시 바이러스의 소독 가능
- 8) 4급 암모늄염 단일제재B- 150ppm 이상처리시 바이러스 소독효과 기대 가능
- 9) 오르소 디클로로벤젠 제재 및 황산동 제재- 적용 가능성 희박함

의 결론을 얻을 수 있었으며 (표 31), 어류 병원 바이러스에 효과적인 소독제로서 차아염소산염 제재, 포비돈 요오드 제재, 글루타르 알데하이드 제재 및 4급 암모늄염 제재를 선발할 수 있었다.

표 31. 수중 어류바이러스 90 % 이상 살균을 위한 소독제의 유효농도 처리조건

소독제의종류	20분 처리조건		60분 처리조건	
	무인벨륨	인벨륨	무인벨륨	인벨륨
과산화수소 제재	1050	280	525	70
차아염소산염 제재	46	11.5	30	8.5
안정화이산화염소 제재	150	40	75	20
포비돈요오드 제재	20	15	15	15
포름알데하이드 제재	350	750	140	140
구루타르알데하이드 제재	40	40	20	20
4급암모늄염 복합제재A	450	225	450	113
4급암모늄염 단일제재B	150	150	80	80
오르소디클로르벤젠제재	2250	>2250	2250	2250
황산동 제재	>6000	-	>4500	2000

4. 어류주화세포에 대한 소독제의 독성실험

CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) 어류 주화세포를 DMEM5 (100 ug /ml penicillin, 100 ug /ml streptomycin (Gibco BRL Co.), 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL Co., pH 7.4)을 이용하여 96 well plate에 100 μ l씩 분주하여 15 °C에서 24시간 배양하였다. 10종의 소독제를 소독제 별로 DMEM5를 이용하여 원액부터 2ⁿ 계열로 희석하여 2¹⁹까지 준비한 후 배양된 세포의 상층 배양액을 제거하고 소독제 별로 희석 순서에 따라 세포에 100 μ l씩 접종하고 20 °C에서 배양한 24시간 후 MTT법으로 확인한 결과를 표 32에 제시하였다. 어류 주화세포에 대한 각각의 소독제의 24시간 독성농도를 조사한 결과, 과산화 수소수 제제의 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 0.955 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.334 ppm 으로 세포에 대한 독성이 매우 높게 나타났다. 차아염소산염 제제의 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 12.5 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 1.44 ppm이었다. 안정화 이산화염소 제제의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 62.5 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 3.13 ppm이었다. 포비돈 요오드제의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 50 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 5.0 ppm이었다. 포르말데하이드 제제는 24시간 최소독성 농도가 시판액 기준으로 4 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 1.4 ppm으로 나타났다. 또한 글루타르 알데하이드 제제의 경우에 있어서는 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 1 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.1 ppm이었다. 4급 암모늄염 혼합제재 A의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 10 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.75 ppm이었다. 한편 4급 암모늄염 단일제재 B의 경우에는 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 0.4 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.04 ppm으로 매우 민감한 결과를 나타내어 장기간의 적용에는 생물체의 유해성이 높은 것으로 나타났다. 오르소 디클로로벤젠 제제의 경우 6.2 ppm 이었고, 유효농도로 4.65 ppm이 24시간 독성 농도 이었다.

표 32. 어류주화세포 CHSE-214에 독성을 나타내는 시판소독제의 농도
(24시간반응)

소독제종류	최소독성농도(ppm)		소독제종류	최소독성농도(ppm)	
	시판	유효		시판	유효
과산화수소수 제재	0.955	0.334	그루타르 알데하이드 제재	1	0.1
차아염소산염 제재	12.5	1.44	4급 암모늄염 혼합제재A	10	0.75
안정화 이산화염소 제재	62.5	3.13	4급 암모늄염 단일제재B	0.4	0.04
포디돈 요오드 제재	50	5.0	오르소 디클로로벤젠 제재	6.2	4.65
포름 알데하이드 제재	4	1.4			

5. 어류에 대한 소독제의 독성실험

넙치, 조피볼락과 감성돔에 대한 10종의 소독제의 어독성을 조사하였다. 실험 방법은 본 보고서의 연구방법에 제시한 바와 같이 Hall and Golding (1998)의 "Acute toxicity test protocol" 및 "환경생물독성시험의 기준과 방법 (2003)"에 준하여 행하였으며 24시간 반수치사농도 (LC₅₀)를 probit 분석을 통하여 구하였다. 그 결과를 표 33에서 표 42에 제시하였다.

1) 시판용 과산화수소수 제재의 넙치에 대한 평균 24h LC₅₀는 575 ppm 정도로 나타났고, 조피볼락에서는 770.67 ppm이었으나 감성돔의 경우는 두 종의 어류에 비하여 독성에 민감하여 390 ppm 정도의 24시간 반수치사농도를 보였다. 이를 유효성분 농도로 계산하여 보면 넙치는 200 ppm, 조피볼락은 270 ppm, 감성돔은 136 ppm의 처리 수준에서 반수가 치사되어지는 것을 의미하였다 (표 33).

2) 시판용 차이염소산 제재에 적용되어진 경우, 넙치에 대한 평균 24h LC₅₀는 30 ppm 정도로 나타났고, 조피볼락에서는 45.8 ppm, 감성돔의 경우는 48.7 ppm 정도의 유사한 범위의 24시간 반수치사농도를 보였다. 이를 유효성분 농도로 계산하여 보면 넙치는 3.4 ppm, 조피볼락은 5.2 ppm, 감성돔은 5.6 ppm의 처리 수준에서 반수가 치사되어지는 것을 의미하였다 (표 34).

3) 시판용 안정화 이산화염소 제재의 경우 시판용액을 기준으로 했을 때 그 농도가 매우 높아서 2073, 1179 및 1207 ppm의 농도에서 반수치사를 나타내었다. 이를 유효성분량으로 환산하면 104, 59, 60 ppm의 유효조건이 된다 (표 35).

4) 시판용 포비돈 요오드 제재의 경우, 넙치는 예민하여 51 ppm, 조피볼락 및 감성돔은 200-250 ppm의 시판용액농도에서 반수치사 하였는데 유효성분량으로는 각각 5 ppm, 27 ppm, 19 ppm이 반수치사농도이었다 (표 36).

표 33. 시판 과산화수소수제제의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95%confidence limit	
넙치	575.16	536.80	628.85
조피볼락	770.67	675.96	785.07
감성돔	398.08	247.12	509.14

표 34. 시판 차아염소산염제제의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	30.00	23.40	36.61
조피볼락	45.82	52.92	92.33
감성돔	48.74	47.21	49.48

표 35. 시판 안정화 이산화염소제제의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	2073.44	1764.19	2795.62
조피볼락	1179.93	1159.53	1196.43
감성돔	1207.16	1176.67	1233.63

표 36. 시판 포비돈요오드제제의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	51.09	38.49	57.78
조피볼락	272.68	130.73	286.77
감성돔	187.98	162.64	195.23

5) 포름알데히드 제재의 경우 감성돔이 가장 민감하여 175 ppm, 조피볼락은 287 ppm, 가장 높은 농도에 반응한 것은 넙치로서 407 ppm 정도의 시판 포르말린에 24시간 노출되었을 때 반수치사 되었다 (표 37).

6) 글루타르 알데하이드 제재의 경우 시판용액을 기준으로 했을 때 611, 330 및 208 ppm의 농도 범위에서 넙치, 조피볼락, 감성돔에 각각의 반수치사를 나타내었다. 이를 유효성분량으로 환산하면 61, 33, 21 ppm의 유효 조건이 된다 (표 38).

7) 시판용 4급 암모늄염 혼합제재의 경우 3종의 어류에 강한 독성을 나타내어 넙치 45, 조피볼락 35, 감성돔 37 ppm의 시판제제농도 조건에서 반수치사 하였는데, 이를 유효성분으로 환산하며, 3.4, 2.6 및 2.8 ppm의 유효농도범위에서 반수치사 되어지는 결과가 된다 (표 39).

8) 4급 암모늄염 단일제재의 경우도 혼합제재와 유사하게 높은 독성을 나타내는데, 넙치 21, 조피볼락 10, 감성돔 15 ppm의 시판제제농도 조건에서 반수치사 하였고, 이를 유효성분으로 환산하며, 2.1, 1.0 및 1.5 ppm의 유효농도범위에서 반수치사 되어지는 결과가 된다 (표 40).

9) 오르소 디클로로벤젠 제재 의 경우 17.5, 12.5, 20 ppm의 시판농도조건에서 반수가 치사되어 그 유효성분 농도로 환산해 보면 13, 9.4, 15 ppm의 농도에서 독성을 나타냄을 알 수 있었다 (표 41).

10) 황산동 제재 (표 42)는 넙치에 대해서는 유효농도 43 ppm의 농도에서 반수를 치사시켰으나, 다른 조피볼락 및 감성돔에 대해서는 4 - 5 ppm의 농도조건에서 독성을 나타내었다.

표 37. 시판 포름 알데하이드 제제의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	406.69	374.01	431.51
조피볼락	286.89	263.15	295.16
감성돔	174.99	169.54	180.45

표 38. 시판 글루타르 알데하이드 제재의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	611.29	582.85	696.16
조피볼락	329.81	285.84	408.7
감성돔	207.67	202.46	244.03

표 39. 시판 4급 암모늄염 혼합제재A의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	45.32	37.28	49.49
조피볼락	34.99	33.78	36.18
감성돔	37.25	35.38	39.47

표 40. 시판 4급 암모늄염 단일제재B의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	20.91	19.97	21.68
조피볼락	10.38	10.03	11.19
감성돔	15.1	4.9	20.47

표 41. 시판 오르소 디클로로벤젠 제재의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	17.47	12.37	20.24
조피볼락	12.49	11.85	13.14
감성돔	19.94	19.48	20.46

표 42. 시판 황산동 제재의 어류독성실험 결과

	24h LC50 (mg/L)		
	Mean	95% confidence limit	
넙치	43.22	21.95	65.73
조피볼락	5.00	4.32	5.23
감성돔	4.49	3.89	4.78

이들 결과를 바탕으로 넙치, 조피볼락 및 감성돔에 대한 소독제의 유효성분을 기준으로 한 반수 치사농도를 표 43에 정리하여 나타내었다.

어류에 대한 독성 실험 결과를 종합적으로 검토하여 보면, 앞의 소독제의 병원에 대한 살균 효과에서 얻진 유효한 살균제로서의 사용가능성이 우수한 것으로 평가 되어진 차아염소산염, 포비돈 요오드 및 4급 암모늄염 제재가 실제 세포나 어체 에는 상대적으로 높은 독성을 나타내는 점에서 이들 소독제는 실제 어류가 사육중인 사육수 중에 살포하여 처리하기에는 매우 위험 요인이 따르는 것으로 판단되어짐으로 사용에 있어 그 위험을 인지하고 어종에 따라 유의하여 살포하여야 할 것으로 생각되어졌다.

표 43. 넙치, 조피볼락 감성돔에 대한 각 소독제의 유효성분 기준 24h LC50

소독제의종류	Mean of 24hLC50(mg/L)		
	flounder	Rock fish	Sea bream
과산화수소	201.3	269.7	139.3
차염소산염	3.45	5.27	5.61
안정화이산화염소	103.6	59.0	60.4
포비돈요오드	5.1	27.3	18.8
포름알데하이드	142.2	94.1	61.2
구루타르알데하이드	61.1	33.0	20.8
4급암모늄염복합A	3.4	2.6	2.8
4급암모늄염단일B	2.1	1.0	1.5
오르소디클로르벤젠	13.1	9.4	15.0
황산동	43	5	4.5

6. 소독제의 사용기간 및 보존안정성

시판 소독제 10 종에 대한 어병 세균 및 바이러스에 대한 살균효과 및 불활화 효과를 측정하여 본 결과, 어병 세균에 대한 살균효과 및 바이러스에 대한 불활화효과에서 높은 활성을 나타낸 4종의 소독제, 즉, 차아염소산염 제재, 과산화수소수 제재, 글루타르알데히드 제재 및 양이온성 계면활성제에 속하는 4급 암모늄 단일제재B를 선정하고 보관조건에 따른 유효성분의 함량변화를 측정하였다.

1) 차아염소산염 제재

차아염소산염의 소독효과를 나타내는 유효성분인 염소의 보관조건에 따른 함량변화를 알아보았다. 이를 위하여 본 연구 수행에 사용된 차아염소산나트륨 수용액을 현장에서의 일반적인 보관방법인 냉장 보관한 것 (개봉 후 6개월)과 개봉 직후로 나누어 측정하였다.

본 연구에서 유효염소량은 식품첨가물공전에 공시된 정량법에 의거, 요오드칼륨 (KI)과 0.1 M 치오황산나트륨 용액 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)을 이용한 적정을 통하여 측정되었다. 그 결과는 표 44와 같다.

본 실험에서 차아염소산염 제재의 보존 안전성을 검토한 결과, 시판 차아염소산염 나트륨 용액의 원액을 개봉 후 냉장 보관할 경우 약 39 % 정도의 유효염소의 함량감소가 야기되는 것으로 나타났다.

따라서, 현장에서 사용시, 사용하고 남은 차아염소산 나트륨 원액을 재사용할 경우 유효염소량의 감소를 감안하여 희석배수를 조절해야 하며 소독제 제조사에서는 보관온도나 기간에 따른 사용지침을 구체적으로 제시할 필요가 있을 것으로 사료된다.

표 44. 차아염소산염제재의 보관조건에 따른 유효성분 함량의 변화

시료	유효염소 함량	상대함량
개봉직후	67.0 ± 0.1 mg/ml (6.7 ± 0.0 % (w/v))	100 %
개봉 후 6개월 냉장 (4℃) 보관한 것	40.7 ± 0.1 mg/ml (4.1 ± 0.0 % (w/v))	61.1 ± 0.1 % (<i>P</i> <0.001)

2) 과산화수소수 제재

본 연구에 사용한 과산화수소 용액은 수산용으로 제조된 35 %의 hydrogen peroxide를 함유한 수용액으로서 본 실험에서는 보관조건에 따른 hydrogen peroxide의 함량변화를 알아보았다. 이를 위하여 본 실험에서는 과산화수소 용액을 개봉후 6개월간 실온보관. 6개월간 냉장 보관 및 개봉직후, 3가지로 나누어 측정하였다.

과산화수소량은 식품첨가물공전에 공시된 정량법에 의거, 0.1 N 과망간산칼륨 용액 (KMnO_4)을 이용한 적정을 통하여 측정되었다. 그 결과는 다음의 표 45 에 서와 같다.

본 실험에 사용된 수산용 과산화수소용액의 경우 과산화수소의 분해가 거의 일어나지 않아 그 함량이 보존 온도나 기간에 거의 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과는 제조사에서 제공한 자체 검사결과와도 일치함을 알 수 있었다.

따라서, 과산화수소용액은 현장에서 사용시 일반적인 실온 보관에서도 살균력의 저하 없이 사용할 수 있는 것으로 사료된다.

표 45. 과산화수소수제재의 보관조건에 따른 유효성분 함량의 변화

시료	과산화수소 함량
개봉직후	398.9±0.4 mg/ml (40.0±0.0 % (w/v))
개봉 후 6개월간 실온 보관한 것	402.9±1.6 mg/ml (40.3±0.2 % (w/v))
개봉 후 6개월간 냉장 (4 ℃)보관한 것	404.3±2.4 mg/ml (40.4±0.2 % (w/v))

3) Glutaraldehyde 제재

본 연구에 사용된 시판 글루타르알데히드제재는 10 % glutaraldehyde를 포함한 수용액으로서 본 실험에서는 보관조건에 따른 glutaraldehyde의 함량변화를 알아보았다. 보관온도에 따른 glutaraldehyde의 함량변화를 알아보기 위하여 본 실험에서는 glutaraldehyde 수용액을 개봉후 6개월간 실온 보관, 6개월간 냉장 보관 및 개봉직후, 3가지로 나누어 측정하였다.

Glutaraldehyde의 정량은 *N*-methylbenzothiazolon (MBTH)을 이용한 microplate photometric method에 의하여 실시되었다 (Hauser TR & Cummins RL, Anal.Chem. 35, (1964) 679-681; Zurek G & Karst U, Analytic. Chim. Act. 351, (1997) 247-257). 그 결과는 표 46과 같다.

본 실험에 사용된 시판 글루타르알데히드제재의 경우 6개월간 냉장 보관시에는 거의 glutaraldehyde의 함량이 89.2 %정도로 유지되어 그 변화가 미미했던 반면, 6개월간 실온 보관했을 경우에는 85.6 %로 떨어지며 유의성 있는 함량감소가 일어났음을 나타내었다.

따라서, glutaraldehyde와 같은 산화되기 쉬운 알데히드제재는 현장에서 보관 후 재 사용시 냉장보관을 할 경우 그 함량을 안정되게 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

표 46. 글루타르알데하이드제제의 보관조건에 따른 유효성분 함량의 변화

시료	glutaraldehyde 함량	상대함량
개봉직후	79.9 ± 3.6 mg/ml (8.0 ± 0.4 % (w/v))	100 %
개봉 후 6개월간 실온 (℃)보관한 것	68.4 ± 1.3mg/ml (6.9 ± 0.2 % (w/v))	85.6 ± 1.6 % (P < 0.05)
개봉 후 6개월간 냉장 (4 ℃)보관한 것	71.3 ± 3.3 mg/ml (7.1 ± 0.3 % (w/v))	89.2 ± 4.1 %

4) 4급 암모늄염 단일제제

본 연구에 사용된 양이온성 계면활성제인 4급 암모늄염 단일제제B는 didecyl dimethyl ammonium chloride를 10 % 비율로 함유하고 있는 수용액이다. 이 물질은 화학구조면에서 안정하므로 보관온도나 기간에 거의 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

소독제의 중화능력에 대한 문헌을 검토해 보면,

차아염소산염 제제 (sodium hypochlorite)는 강력한 산화작용으로 살균/소독력을 발휘하는 소독제로서 산성에서 살균력은 증대되고 염기성에서는 감소된다. serum등의 유기물에 의하여 그 살균력이 중화된다. (Gelinas P. & Goulet J. 1983, ; Coates D. 1988). 발생되는 염소의 중화를 위하여 neutralizing agent로서 sodium thiosulfate가 사용된다. 7 mg의 sodim thiosulfate가 1 mg의 염소를 중화시키는 것으로 보고되어지고 있다 (Kuhns J.F., Borgendale K., 1980; Kemp G.K.& Schneider K.R., 2000).

수산용 과산화수소수는 산소와 물로 분해되므로, 실제로 환경이나 인체에 무해하며, 알칼리, 유기물 또는 금속과 접촉하게 되면 쉽게 분해되는 특성을 가진다.

글루타르알데히드제제의 경우는 단백질 등 유기물의 존재하에서도 살균력이 유지되며, 살균작용은 글루타르알데히드의 산화가 덜 일어나는 염기성에서 강하며 (Gelinas P. & Goulet J.,1983), 수용액의 상태에서 상온과 빛에 안정하나, 고온 (50 ℃)에서는 불안정하다. 또한, 담수 및 해수에서 생분해되기 쉽다. 공기가 존재하는 수중에서 glutaric acid를 거쳐 이산화탄소로 대사된다. 화학적 Neutralizing agent로서 sodium bisulfite와 dibasic ammonium phosphate가 주로 사용된다는 보고가 있다 (Leung H.W., 2001; Jordan et al 1996).

4급 암모늄염 화합물의 경우는 유기물에 의하여 소독력이 약화되어지는 경향이 강하며 또한, 퇴적물중에 존재하는 박테리아에 의한 생분해가 가능한 특성이

알려져 있다 (Gelinas P. & Goulet J. 1983; Shimp R.J. & Young R.L. 1988).

이러한 점에서 본 검토를 통하여 선발되어진 4종의 소독제의 경우에 있어서 실제 사용을 위한 보존 기간 및 조건에 따른 유효성분의 변화는 차아염소산염과 글루타르 알데하이드 제재의 경우 인정되어지는 점에서 보존 기간 및 조건에 따른 사용에 주의를 요하며, 실제 이들 제재를 수중에 살포하여 소독의 효과를 얻고자 하는 경우 수중의 유기물 조건 및 pH 조건을 고려하여 효과적으로 적용하여야 할 필요성이 있다고 판단되었다.

7. 양어장내 사용 소독제로서의 적용성 검토

시판 소독제 10종을 대상으로 행한 어류병원체 소독효과, 어체 독성 실험 및 보존 안전성 실험 결과를 바탕으로 실제 양식장내에서 사용해야 하는 상황에 적용하여 질병 방역적인 개념에서의 적용성을 두 가지 측면에서 검토하였다.

그 첫째는 어류 양식 수조내에 병원체가 존재하는 조건을 가정하여 그러한 병원체가 계속적으로 범람하여 다른 수조 내지는 배출수를 통하여 다른 양어장으로 전파되어지는 것을 차단할 목적으로 수평전파의 차단 목적으로 사용하고자 하는 경우를 염두에 둔 “양어장 사육수 소독제 사용가능성 검토”를 행하였다.

그 둘째로서는 양어장의 사전 방역을 목적으로 한 사육조의 사전 소독, 사육장의 수평적인 전염원 차단을 위한 사육장 사용 기구류의 소독, 양어장 출입자의 병원체 전파를 차단하기위한 출입자용 소독 및 활어차등의 운반 도구의 사전 및 사후 소독에 적용 하기위한 “양어장 질병 방역을 위한 방역용 소독제로서의 검토”에 대하여 검토하였다.

1) 양어장 사육수 소독제 사용 가능성 검토

어류 양식 수조내에 병원체가 존재하는 조건을 가정하여 그러한 병원체가 계속적으로 범람하여 다른 수조 내지는 배출수를 통하여 다른 양어장으로 전파되어지는 것을 차단할 목적으로 수평전파의 차단 목적으로 사용하고자 하는 경우를 염두에 둔 “양어장 사육수 소독제 사용가능성 검토”를 행하였다.

어류양식장 사육조에 상재하는 병원체수를 확인하고 실제 사육수에 대한 소독효과를 확인하기 위한 실험으로 여수인근에 있는 넙치, 돔류, 조피볼락 양식장을 대상으로 사육수를 채집하여 실험사육실의 1톤 수조에 각각의 어류 20미씩과 운반해 온 사육수를 수용하여 실험을 행하였다. 사용 대상 소독제는 상기의 연구결과를 바탕으로 과산화수소수 제재 1600 ppm 1시간, 차아염소산 제재 400 ppm 30

분, 포름알데히드 제재 400 ppm 1시간, 글루타알데히드 제재 200 ppm 30분, 4급 암모늄염 혼합A제재 200 ppm 30분, 및 4급 암모늄염 단일B제재 100 ppm 30분 처리 조건을 설정하여 각각의 수조에 처리하였다.

소독제 처리전 조건의 사육수 및 처리후 조건의 사육수를 각각 채수하여 수중의 세균수를 콜로니 카운팅법으로 계수하였다. 소독제 처리가 종료된 수조수는 여과된 해수를 교환하여 주고 약육처리에 따른 영향을 24시간동안 관찰하였다. 각각의 처리전 및 처리후 배양용 샤알레는 20 °C에서 배양하고 24시간 이후의 콜로니수를 카운팅하여 처리에 의한 세균의 살균 효과를 비교하였다. 그 결과를 표 47에 정리하였다.

본 실험 결과 글루타르 알데하이드 제재, 4급 암모늄단일 제재B 및 4급 암모늄 혼합제재A가 수중의 세균수를 60 - 90 % 범위에서 제어하여 상대적으로 가장 높은 소독 효과를 나타내었으나 그 외의 소독제의 경우 유효한 살균 효과는 보이지 못하였다. 실험 대상 사육수인 조피볼락, 감성돔, 돌돔, 참돔 및 넙치의 사육수 내의 총 세균수는 약간씩 차이가 있었으나 효과 판정에는 적용 가능하였다.

실제적으로 수중의 세균을 대상으로 살균율을 비교한 결과 비록 글루타르알데하이드 제재, 4급 암모늄 단일제재B 및 4급 암모늄 혼합제재A가 60 - 90%의 살균율을 보이기는 하였으나, 이는 앞선 연구에서 얻어진 결과와 비교해 보았을 때, 그 효과가 있는 것으로 인정할 수 있는 99 - 99.9% 이상의 소독율에 미치지 못하였는데, 이는 수중에 생존하는 어류로부터 기인되어지는 요인에 의한 것으로 판단되어진다.

비록, 본 조건에서의 수용 어류는 처리 이후 24시간까지의 생존에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났지만, 이들 결과를 종합적으로 검토하여 보았을 때, 실제 사육 중인 수조내에 병원체를 살균하기 위한 목적의 소독제 처리는 무의미 한 것으로 판단 할 수 있었다.

따라서, 어류를 사육하고 있는 사육수중의 소독제의 직접처리는 효과적인 방역법으로 적용할 수 있는 가능성은 매우 희박하며, 만약 사육 후 배출수내의 병

원체의 소독을 위한 소독제의 처리가 필요한 경우에는 배출수내의 유기물량을 고려한 소독제의 처리조건의 제 설정이 필히 따라야 할 것으로 판단되어진다.

표 47. 각각의 소독제를 이용한 사육수 내의 세균 소독효과

	조피볼락1	조피볼락2	감성돔	돌돔	참돔	넙치
	3×10 ⁴ /ml	3×10 ² /m	6×10 ³ /ml	7×10 ³ /ml	1×10 ³ /ml	1×10 ⁴ /ml
*과산화수소수제재	-**	+	-	-	+	-
차염소산염제재	+	+	+	+	+	-
포름알데하이드제재	-	-	-	-	-	-
글루타르알데하이드제재	+	++	++	++	++	++
4급암모늄혼합A제재	+	++	++	+	+	+
4급암모늄단일B제재	+	++	++	++	++	+

* 처리방법: 과산화수소수 제재 1600 (560) ppm 1시간,
 (유효농도) 차아염소산염 제재 400 (44) ppm 1시간,
 포름알데히드 제재 400 (140) ppm 1시간,
 글루타르알데히드제재 200 (20) ppm 30분,
 4급암모늄염혼합A제재 200 (15) ppm 30분,
 4급암모늄염단일B제재 100 (10) ppm 30분

** 처리효과: ++ 90% 살균, + 50-80% 살균, - 50% 이하 살균

2) 양어장 질병 방역을 위한 방역용 소독제로서의 검토

양어장의 질병 발생을 사전 방역할 목적으로 사육수조의 사전 소독, 사육장의 수평적인 전염원 차단을 위한 사육장 사용 기구류의 소독, 양어장 출입자의 병원체 전파를 차단하기 위한 출입자용 소독 및 활어차등의 운반 도구의 사전 및 사후 소독에 적용 하기위한 방역용 소독제로서의 검토를 행하였다.

앞선 실험들을 통하여 10종의 소독제 중에서 유용하게 사용될 수 있는 소독제로서 글루타르알데하이드 제제, 차아염소산염제제 및 4급암모늄염제제를 선정할 수 있는 것으로 판단하였다 (표 48).

이들 소독제의 특성을 살펴보면, 차아염소산염제는 강력한 산화작용으로 살균/소독력을 발휘하는 소독제로서 산성에서 살균력은 증대되고 염기성에서는 감퇴되며, 살균작용은 그람양성, 그람 음성균에 모두 유효하다. 그러나, 유기물의 존재시에는 그 살균력이 감소되면 탈색작용과 피부자극작용이 있어 사용시 주의를 요구되어지는 제제이다. 글루타르알데하이드 제제는 포름알데히드에 비해 피부 및 점막에 대한 자극성이 낮고 살균력도 광범위하다. 또한, 단백질 등 유기물의 존재하에서도 살균력을 유지하며, 살균작용은 글루타르알데히드의 산화가 덜 일어나는 염기성에서 강하다. 일반적으로 pH 7.5-8.5의 2 % 완충용액으로 사용시 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 4급 암모늄염소독제는 암모늄 (NH_4^+)이온에 존재하는 4개의 수소가 유기 분자단으로 치환된 것으로 두개의 수소가 장쇄의 지방측쇄로 치환이 될 경우 양이온성 세정제 역할이 보다 강력해지며 보다 광범위한 염기성 pH에서 효과를 나타내게 된다. 하지만 유기물의 존재시 소독력이 저하된다. 또한, 기구 및 기기소독을 하기 위해서는 먼저 자비소독에 의해 아포균을 죽이고 부착되어 있는 단백질을 제거한 후 4급암모늄염 소독제를 사용하여야 효과적이라고 한다. 4급암모늄염 소독제와 글루타르알데히드제제를 혼합사용할 경우 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서, 이러한 목적으로 혼합되어 제품화

된 상품이 있다면 가장 효과적으로 사용 가능 할 것으로 사료된다.

표 48. 양식장 사전 방역용 소독에 적합한 제재 및 그 적용기준

(대상병원체: 세균 및 바이러스)

선발 소독제 (유효성분)	유효 적용법 (유효성분농도)
글루타르알데하이드제재	40ppm(20분), 20ppm(60분)
차아염소산염제재	80ppm(20분), 40ppm(60분)
4급암모늄염단일제재	200ppm(20분), 100ppm(60분)
4급암모늄염복합제재	450ppm(20분), 200ppm(60분)

표 48에서 시판 되어지는 10종의 소독제 중에서 유용하게 사용될 수 있는 소독제로서 글루타르알데하이드 제제, 차아염소산염제제 및 4급 암모늄염제제 등 4종중에서 글루타르알데하이드 제제를 대상으로 실제 양식장에서 사용되어지는 다양한 도구류를 대상으로 속을 행하여 그 효과를 확인하기 위한 실험을 행하였다.

본 연구를 통하여 확인된 세균 및 바이러스의 소독력을 99.99 % 이상 발휘하는 유효 성분농도로 확인된 40 ppm (시판제제 농도 400 ppm) 20분 침지방법을 적용하여 넙치 양식장내 사용중 어류 병원체의 이동경로로 제공되어질 수 있는 뜰채, 물긏, 수조 덮개, 호-스, 먹이생물 관찰용 비이커, 물통, 장화를 대상으로 반응 시킨 후, 표면적 25 cm² 부분의 포피 부분을 멸균된 scraper로 채취하여 10배 단계 희석법으로 희석하여 각각의 희석농도별 시험액을 배지 상에 100 ul 씩 접종하여 각각의 배양조상에 나타나는 병원체의 수를 카운팅하여 소독처리 이전 및 이후의 균수의 변동을 체크하여 그 효과를 조사한 결과, 글루타르 알데하이드 제제 400 ppm 수용액에 20분간 담구어 둔에 따라 각각의 기구류에 묻어있던 세균이 99.9 또는 99.99 %이상 제거되어지는 효과를 확인 할 수 있었다 (표 49).

이는 본 연구에서 조사 확인된 표 48에서의 소독제 및 적용법이 양식장 방역을 목적으로 하는

- 1) 양식장내의 사육수조의 사전 소독,
- 2) 사육장의 수평적인 전염원 차단을 위한 사육장 사용 기구류의 소독,
- 3) 양어장 출입자의 병원체 전파를 차단하기위한 출입자용 소독,
- 4) 활어차등의 운반 도구의 사전 및 사후 소독

의 경우에 적용하였을 때 99.9 % 이상의 세균 및 바이러스를 차단하기 위한 방역용 소독제 및 사용기준으로 적합하게 사용되어질 수 있음을 확인 시켜주는 결과로 사료된다.

표 49. 글루타르알데하이드처리*에 따른양식장내 사육용 기구류의 소독 효과

사육도구	세균수 (CFU/cm ²)		살균효과 (%)
	실시전	소독후	
뜯채	2.5 x 10 ⁵	2.2 x 10	>99.99
물오탁하의	5.6 x 10 ⁴	3.4 x 10	>99.9
수조내벽	8.7 x 10 ⁵	4.6 x 10	>99.99
호스내부	3.6 x 10 ⁴	1.4 x 10	>99.99
비이커내부	3.1x 10 ³	2.2 x 10	>99
물통내부	5.8 x 10 ⁴	7.1 x 10	>99.9
장화표면	5.4 x 10 ⁵	6.1 x 10	>99.99

* 처리방법: 시판 제재 400 ppm 수용액, 20분 침지

제 4 장 결과 종합 및 목표 달성도

본 연구는 시판 되어지고 있는 소독제 중에서 어류 양식 과정에서 실제 사용되고 있는 10종을 대상으로 어류병원체에 대한 효과적인 살균 조건의 검토 및 어류양식장 및 출입자의 효과적인 소독법을 검토하여 최종 목표인 어류양식장 방역을 위한 효과적인 소독법을 제안하는 것을 목적으로 국내 양식장에서 수질정화, 양식시설 및 기구 소독, 어류 질병예방 및 치료를 위해 현재 시판되고 있는 소독제들 중 가장 빈번히 이용되는 소독제 제품을 중심으로 과산화제인 과산화수소 제재 (H사 제품), 할로겐제인 차아염소산염 제재 (S1사 제품), 안정화 이산화염소 제재 (S2사 제품), 포비돈 요오드 제재 (S2사 제품), 알데하이드계인 포름알데하이드 제재 (D사 제품), 글루타르 알데하이드 제재 (S2사 제품), 양이온성 세정제인 4급 암모늄 혼합제재 (S3사 제품) 및 4급 암모늄 단일제재 (S3사 제품), 페놀계인 오르소 디클로로벤젠 제재 (S3사 제품) 및 황산구리 제재 (DS사 제품)를 연구 대상 소독제로 선정하여 어류 양식장 병원체 소독제로서의 사용 기준 및 방역법으로서의 적용 방법을 도출할 목적으로 행하여졌다.

10종의 시판 소독제를 4종류의 어류 병원세균에 대하여 소독효과를 판정한 결과 가장 높은 소독력을 나타내는 제재는 4급 암모늄 단일제재B로서 유효 성분 농도 2.5 ppm (처리농도 25 ppm)의 조건에서 그램양성균은 전면 사멸시키고, 유효 5 ppm 이상의 조건에서 그램 음성의 세균에도 높은 소독력을 나타내고 있었다. 4급 암모늄 단일제재B와 함께 높은 효과가 나타난 종류는 글루타르 알드하이드 제재와 4급 암모늄 혼합제재A의 경우가 좋은 살균 효과를 나타내었는데, 이들 2 종류의 경우 유효성분 농도 15 ppm 이상의 농도에서 20분 이상의 처리로 99.9 %이상의 소독력을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 차아염소산염 제재의 경우 유효농도 44 ppm 이상으로 20분 이상 처리할 경우 그램음성균이 99.9 % 이상, 그램 양성균이 99 % 이상 사멸되는 것으로 나타났다. 그 다음으로 포비돈 요오드제재의 경우 유효 농도 80 ppm -160 ppm의 처리로 99.9 % 이상의 살균 효과를 기대할 수 있는 것으로 보였

다. 오르소 디클로로벤젠 제재의 경우 150 ppm - 300 ppm의 유효성분 처리조건이 되어야 살균 가능하고, 포름 알데하이드 제재의 경우는 99.9 % 이상의 살균을 위하여 유효성분 560 ppm 이상 즉 시판농도로 1600 ppm 이상의 처리 조건이 필요한 것으로 나타났다. 과산화수소수 제재의 시판 상품내 hydrogen peroxide가 35%인 점에서 실제 유효농도로 계산하여보면, 처리농도 1600 ppm 즉 유효농도 560 ppm 이상으로 20분 이상의 경우 99.9 %이상의 살균효과가 있는 것으로 판단되었다. 안정화 이산화염소 제재의 경우 본 실험 조건에서는 99.9 %이상의 소독효과를 얻는 농도는 3200 ppm 즉 유효농도 160 ppm 이상의 조건이 필요한 것으로 판단되어졌다. 본 실험을 통하여 확인한 결과 세균에 대하여 가장 효과가 떨어지는 소독제는 황산동으로 나타났는데 99% 이상의 세균을 살균하기 위하여서는 유효농도 조건으로 3200 ppm 이나 또는 그 이상이 필요하여 실제 세균 소독제로서의 사용가능성은 매우 희박한 것으로 판단되어졌다.

넙치 양식장의 사용 사육수의 유기물 조건인 SS 56.14 ppm 및 CDO 5.075 ppm의 조건수에 10종류의 소독제를 각각 설정 실험 농도로 살포하고, 4종류의 어류병원세균의 살균 효과를 실험한 결과를 검토해 본 결과, 과산화수소수제재, 포비돈 요오드 제재, 포름 알데하이드 제재, 4급 암모늄 단일제재B, 오르소 디클로로벤젠 제재의 처리 효과는 앞선 연구에서 측정한 시험관 조건에서의 소독효과에 비하여 그 변화는 인정할 수 없는 범위로 나타나, 그 효과는 같은 정도로 판단되어졌고, 안정화 이산화염소 제재, 4급 암모늄 혼합제재A, 황산동의 경우 그람 음성균은 효과가 유지되거나 약간의 감소가 나타나는 결과를 나타내었는데 비하여 그람양성균에 대해서는 약간의 효과 상승을 보인 결과가 나타났다. 글루타르알데하이드 제재의 경우는 4종류의 세균에 대하여 모두 표준 조건의 소독효과에 비하여 약간의 상승 효과가 나타났다. 한편, 차아염소산염 제재의 경우 그람양성균은 그 효과가 유지되어지지만 음성균의 경우, 본 사육수의 유기물 조건에서 소독효과가 2-3배 정도 낮아짐을 확인할 수 있었다.

여과해수 조건에서의 소독효과, 즉 SS 18 ppm 및 CDO 0.60 ppm의 유기물 조건수에 10종류의 소독제를 각각 설정 실험농도로 살포하고, 4종류의 어류병원 세균의 살균 효과를 실험한 결과, 과산화수소수 제재, 안정화염소 제재, 포비돈 요오드 제재, 포름 알데하이드 제재, 4급 암모늄 단일제재B, 오르소 디클로로 벤젠 제재의 처리 효과는 표준 조건 및 사육수 조건에서 측정된 소독효과와 유사한 정도로 판단되어졌고, 4급 암모늄 혼합제재A, 황산동 및 글루타르 알데하이드 제재의 경우는 약간의 효과 변화가 나타났다. 하지만 전반적인 효과를 검토해 보면 이들 소독제제를 양식장내의 정상적인 사육수준의 사육수중 및 여과 해수 중에 처리하여 소독을 하는 경우 그 효과의 변동은 표준적인 크게 염려할 정도는 아닌 것으로 판단되어져, 효과가 확인 되어지는 유효농도 및 소독시간을 지켜서 소독 작업을 행하는 조건에서라면 본 연구에서 표준, 사육수, 여과해수 조건의 소독 효과의 범위내의 결과를 기대할 수 있을 것으로 판단되어졌다.

소독제의 어류 병원성 바이러스에 대한 살균 효과가 반응 시간과 농도에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위한 실험으로 시판소독제를 원액으로 하여 그 최종 농도를 조정된 소독제액과 MABV, IPNV, HRV 바이러스액을 반응시키고 이들 소독제 처리에 따른 바이러스의 감염가의 변화를 조사한 결과, 소독제처리에 따른 바이러스감염가의 변동은 대조군 바이러스액의 감염가인 $1 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/ml를 기준으로 CPE 확인에 의한 감염가의 변동을 바이러스종류별과 비교해 보면 인벨롭을 가지고 있지 않은 MABV 및 IPNV의 경우 검출 한계인 $1 \times 10^{2.0}$ TCID₅₀/ml 이하 까지 불활성화 시키는 소독제로서는 차아염소산염 제재, 포비돈 요오드 제재, 포름알데히드 제재, 글루타 알데히드 제재가 확인되어졌고, 인벨롭을 가지는 랩도바이러스에 포함되는 HRV의 경우 IPNV 및 MABV와 마찬가지로 차아염소산 제재, 포비돈 요오드 제재, 포름알데히드 제재, 글루타 알데히드 제재에서만 확인되어진 점은 동일하지만 안정화 이산화염소 제재, 포비돈 요오드 제재 및 4급 암모늄염 단일제재B에 좀더 민감히 반응하는 것으로 나타났다.

어류 주화세포에 대한 각각의 소독제의 24시간 독성농도를 조사한 결과, 과산화수소수 제제의 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 0.955 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.334 ppm 으로 세포에 대한 독성이 매우 높게 나타났다. 차아염소산염 제제의 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 12.5 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 1.44 ppm이었다. 안정화 이산화염소 제제의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 62.5 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 3.13 ppm이었다. 포비돈 요오드 제제의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 50 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 5.0 ppm이었다. 포름 알데하이드 제제는 24시간 최소독성 농도가 시판액 기준으로 4 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 1.4 ppm으로 나타났다. 또한 글루타르 알데하이드 제제의 경우에 있어서는 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 1 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.1 ppm이었다. 4급 암모늄염 혼합제제 A의 경우 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 10 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.75 ppm이었다. 한편 4급 암모늄염 단일제제 B의 경우에는 24시간 최소독성 농도는 시판액 기준으로 0.4 ppm 이었고, 이를 유효농도 기준으로 환산하면 0.04 ppm으로 매우 민감한 결과를 나타내어 장기간의 적용에는 생물체의 유해성이 높은 것으로 나타났다. 오르소 디클로로벤젠 제제의 경우 6.2 ppm 이었고, 유효농도로 4.65 ppm이 24시간 독성 농도 이었다.

시판용 과산화수소수 제제의 넙치에 대한 평균 24h LC50는 575 ppm 정도로 나타났고, 조피볼락에서는 770.67 ppm이었으나 감성돔의 경우는 두 종의 어류에 비하여 독성에 민감하여 390 ppm 정도의 24시간 반수치사농도를 보였다. 이를 유효성분 농도로 계산하여 보면 넙치는 200 ppm, 조피볼락은 270 ppm, 감성돔은 136 ppm의 처리 수준에서 반수가 치사되어지는 것을 의미하였다. 시판용 차아염소산 제제에 적용되어진 경우, 넙치에 대한 평균 24h LC50는 30 ppm 정도로 나타났고, 조피볼락에서는 45.8 ppm, 감성돔의 경우는 48.7 ppm 정도의 유사한 범

위의 24시간 반수치사농도를 보였다. 이를 유효성분 농도로 계산하여 보면 넘치는 3.4 ppm, 조피볼락은 5.2 ppm, 감성돔은 5.6 ppm의 처리 수준에서 반수가 치사되어지는 것을 의미하였다. 시판용 안정화 이산화염소 제재의 경우 시판용액을 기준으로 했을 때 그 농도가 매우 높아서 2073, 1179 및 1207 ppm의 농도에서 반수치사를 나타내었다. 이를 유효성분량으로 환산하면 104, 59, 60 ppm의 유효조건이었다. 시판용 포비돈 요오드 제재의 경우, 넘치는 예민하여 51 ppm, 조피볼락 및 감성돔은 200 - 250 ppm의 시판용액농도에서 반수치사 하였는데 유효성분량으로는 각각 5 ppm, 27 ppm, 19 ppm이 반수치사농도이었다. 포름알데히드 제재의 경우 감성돔이 가장 민감하여 175 ppm, 조피볼락은 287 ppm, 가장 높은 농도에 반응한 것은 넘치로서 407 ppm 정도의 시판 포르말린에 24시간 노출되었을 때 반수치사 되었다. 글루타 알데하이드 제재의 경우 시판용액을 기준으로 했을 때 611, 330 및 208 ppm의 농도 범위에서 넘치, 조피볼락, 감성돔에 각각의 반수치사를 나타내었다. 시판용 4급 암모늄염 혼합제재의 경우 3종의 어류에 강한 독성을 나타내어 넘치 45, 조피볼락 35, 감성돔 37 ppm의 시판제재농도 조건에서 반수치사 하였는데, 이를 유효성분으로 환산하며, 3.4, 2.6 및 2.8 ppm의 유효농도범위에서 반수치사 되어지는 결과이었다. 4급 암모늄염 단일제재의 경우도 혼합제재와 유사하게 높은 독성을 나타내는데, 넘치 21, 조피볼락 10, 감성돔 15 ppm의 시판제재 농도 조건에서 반수치사 하였고, 오르소 클로로벤젠 제재의 경우 17.5, 12.5, 20 ppm의 시판농도조건에서 반수가 치사되어 그 유효성분 농도로 환산해 보면 13, 9.4, 15ppm의 농도에서 독성을 나타냄을 알 수 있었다. 황산동 제재는 넘치에 대해서는 유효농도 43 ppm의 농도에서 반수를 치사시켰으나, 다른 조피볼락 및 감성돔에 대해서는 4 - 5 ppm의 농도조건에서 독성을 나타내었다. 어류에 대한 독성 실험 결과를 종합적으로 검토하여 보면, 앞의 소독제의 병원체에 대한 살균 효과에서 얻진 유효한 살균제로서의 사용가능성이 우수한 것으로 평가 되어진 차아염소산염, 포비돈 요오드 제재 및 4급 암모늄염 제재가 실제 세포나 어체 에는 상대적으로 높은 독성을 나타내는 점에서 이들 소독제는 실제 어류가 사육중인 사육수 중에 살포하여 처리하기에는 매우 위험 요인이 따르는

것으로 판단되어짐으로 사용에 있어 그 위험을 인지하고 어종에 따라 유의하여 사용하여야 할 것으로 생각되어졌다.

시판 소독제 10 종에 대한 어병 원인 세균 및 바이러스에 대한 살균효과 및 불활화 효과를 측정하여 본 결과, 어병 세균에 대한 살균효과 및 바이러스에 대한 불활화효과에서 높은 활성을 나타낸 4종의 소독제, 즉, 차아염소산염 제제, 과산화수소수 제제, 글루타르 알데히드 제제 및 양이온성 계면활성제에 속하는 4급 암모늄 단일제제B를 선정하고 보관조건에 따른 유효성분의 함량변화를 측정하였다. 차아염소산염 제제의 보존 안전성을 검토한 결과, 시판 차아염소산염 나트륨 용액의 원액을 개봉 후 냉장 보관할 경우 약 39 % 정도의 유효염소의 함량감소가 야기되는 것으로 나타났다. 따라서, 현장에서 사용 시, 사용하고 남은 차아염소산 나트륨 원액을 재사용할 경우 유효염소량의 감소를 감안하여 희석배수를 조절해야 하며 소독제 제조사에서는 보관온도나 기간에 따른 사용지침을 구체적으로 제시할 필요가 있을 것으로 사료되었다. 수산용 과산화수소용액의 경우 과산화수소의 분해가 거의 일어나지 않아 그 함량이 보존 온도나 기간에 거의 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과는 제조사에서 제공한 자체 검사결과와도 일치함을 알 수 있었다. 따라서, 과산화수소용액은 현장에서 사용 시 일반적인 실온보관에서도 살균력의 저하 없이 사용할 수 있는 것으로 나타났다. 시판 글루타르알데히드제제의 경우 6개월간 냉장 보관 시에는 거의 glutaraldehyde의 함량이 89.2 %정도로 유지되어 그 변화가 미미했던 반면, 6개월간 실온 보관했을 경우에는 85.6 %로 떨어지며 유의성 있는 함량 감소가 일어났음을 나타내었다. 따라서, glutaraldehyde와 같은 산화되기 쉬운 알데히드제제는 현장에서 보관 후 재 사용 시 냉장 보관을 할 경우 그 함량을 안정되게 유지할 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구에 사용된 양이온성 계면활성제인 4급 암모늄염 단일제제B는 didecyl dimethyl ammonium chloride를 10 % 비율로 함유하고 있는 수용액이다. 이 물질은 화학구조면에서 안정하므로 보관온도나 기간에 거의 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

시판 소독제 10종을 대상으로 행한 어류병원체 소독효과, 어체 독성 실험 및 보존 안전성 실험 결과를 바탕으로 실제 양식장내에서 사용해야 하는 상황에 적용하여 질병 방역적인 개념에서의 적용성을 두 가지 측면에서 검토하였다. 그 첫째는 어류 양식 수조내에 병원체가 존재하는 조건을 가정하여 그러한 병원체가 계속적으로 범람하여 다른 수조 내지는 배출수를 통하여 다른 양어장으로 전파되어지는 것을 차단할 목적으로 수평전파의 차단 목적으로 사용하고자 하는 경우를 염두에 둔 “양어장 사육수 소독제 사용가능성 검토”를 행하였다. 그 둘째로서는 양어장의 사전 방역을 목적으로 한 사육조의 사전 소독, 사육장의 수평적인 전염원 차단을 위한 사육장 사용 기구류의 소독, 양어장 출입자의 병원체 전파를 차단하기위한 출입자용 소독 및 활어차등의 운반 도구의 사전 및 사후 소독에 적용 하기위한 “양어장 질병 방역을 위한 방역용 소독제로서의 검토”에 대하여 검토하였다. 실험 결과 글루타르 알데하이드 제재, 4급 암모늄염 단일제재B 및 4급 암모늄염 혼합제재A가 수중의 세균수를 60 - 90 % 범위에서 제어하여 상대적으로 가장 높은 소독 효과를 나타내었으나 그 외의 소독제의 경우 유효한 살균 효과는 보이지 못하였다. 실험 대상 사육수인 조피볼락, 감성돔, 돌돔, 참돔 및 넙치의 사육수 내의 총 세균수는 약간씩 차이가 있었으나 효과 판정에는 적용가능하였다. 실제적으로 수중의 세균을 대상으로 살균율을 비교한 결과 비록 글루타르 알데하이드 제재, 4급 암모늄단일 제재B 및 4급 암모늄혼합 제재A가 60 - 90 %의 살균율을 보이기는 하였으나, 이는 앞선 연구에서 얻어진 결과와 비교해 보았을 때, 그 효과가 있는 것으로 인정할 수 있는 99 - 99.9% 이상의 소독율에 미치지 못하였는데, 이는 수중에 생존하는 어류로부터 기인되어지는 요인에 의한 것으로 판단되어졌다. 비록, 어류는 처리 이후 24시간까지의 생존에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났지만, 이들 결과를 종합적으로 검토하여 보았을 때, 실제 사육 중인 수조내에 병원체를 살균하기 위한 목적의 소독제 처리는 무의미 한 것으로 판단 할 수 있었다. 따라서, 어류를 사육하고 있는 사육수중의 소독제의 직접처리는 효과적인 방역법으로 적용할 수 있는 가능성은 매우 희박하며, 만약 사육 후 배출수내의 병원체의 소독을 위한 소독제의 처리가 필요한 경우는 배출수내의 유

기물량을 고려한 소독제의 처리조건의 제 설정이 필히 따라야 할 것으로 판단되어졌다.

이상의 결과들로부터 시판 되어지는 10종의 소독제 중에서 어류 양식장 방역용으로 유용하게 사용될 수 있는 소독제로서 글루타르 알데하이드 제제, 차아염소산염 제제 및 4급 암모늄염 제제 등을 선정 할 수 있었으며, 글루타르 알데하이드 제제 40 ppm (20분), 20 ppm (60분), 차아염소산염 제제 80 ppm (20분), 40ppm (60분), 4급 암모늄염 단일제제 200 ppm (20분), 100 ppm (60분), 4급 암모늄염 복합제제 450 ppm (20분), 200 ppm(60분)의 처리 조건으로 1) 양식장내의 사육수조의 사전 소독, 2) 사육장의 수평적인 전염원 차단을 위한 사육장 사용 기구류의 소독, 3) 양어장 출입자의 병원체 전파를 차단하기위한 출입자용 소독 및 4) 활어차등의 운반 도구의 사전 및 사후 소독에 적용 하였을 때, 99.9 % 이상의 세균 및 바이러스를 차단하기 위한 방역효과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

이들 연구결과를 통하여

- 1) 주요한 해산어류 병원세균 및 병원 바이러스 계 7 종을 대상으로 10종의 시판 되어지는 소독제에 대한 소독제 처리에 따른 효과를 농도별 처리 시간별로 조건을 설정하여 실험하여 그 각각의 소독제에 대한 각각의 병원체의 유효한 살균 농도 및 처리시간을 얻어내었다.
- 2) 소독제의 소독효과를 판정위한 판정법을 3가지의 방법을 적용하여 검토하고 효과적 판정법을 도출하였다.
- 3) 대표적인 어류 주화세포인 CHSE-214세포주를 대상으로 10종의 소독제의 어류주화세포에 대한 독성을 조사하여, 시판 소독제 독성농도를 구하였고, 그들의

유효성분에 대응하는 독성농도를 산정하여 제시하였다.

4) 주요 양식대상종인 넙치, 조피볼락, 감성돔을 대상으로 10종의 소독제에 대한 어류독성을 조사하여 24시간 반수치사농도를 구하였고, 안전하게 사용할 수 있는 유효성분 농도를 제시하였다.

5) 어류양식장 적용을 위한 사육수중의 유기물 조건을 확인하고 유기물의 함유 조건별 소독제 효과를 비교 검토하여 가장 효과적이며 가능성이 높은 소독제를 선별하였다.

6) 실제 양식장 수중의 어류병원체의 오염 조건을 조사하여 그를 기준으로 소독제처리에 따른 소독효과를 확인하여 실제 양식수중에 직접 처리하기에 유리한 소독제를 선별하였으며,

7) 어류병원체에 대한 소독효과 및 어류독성 실험 결과를 바탕으로 선정된 유용 소독제의 사용조건 및 보존조건에 따른 보존성 및 사용 안정성을 유효성분 함량 정량 분석법으로 검토하였고,

8) 양식장내 어류 병원체의 이동 경로로 제공되어질 수 있는 사육용 도구를 대상으로 병원체 제어율을 확인함으로써 소독제를 적용한 양식장 방역 효과를 판정 및 검토하였다.

9) 마지막으로 이들 연구의 결과들로부터 어류 양식장에서 적용하고자 하는 시판 소독제의 사용기준 및 방법을 제시하였다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용

- 양어장내 사용 소독법의 제시를 통하여, 그동안 사전소독의 중요성을 인식하지 못하고 일상적으로 양식장내의 병원체의 확산을 방관하고 있었던 상태의 다수의 양식장들의 질병관리 수준을 상승시켜 줌으로서, 해당 양식장의 생산력에도 향상을 가져오게 할 뿐 만아니라, 그 양어장을 병원체의 온상으로 삼아서 주변의 양식장들로 확산되었던 질병의 발생을 줄여 감염성 질병의 전파경로를 차단하여 감염증의 절대 발생수치를 낮추는데 기여할 것으로 판단된다.
- 어류 양식장에서 사용되어질 수 있는 소독제의 사용기준으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.
- 양식장 어민에게 소독약제 사용에 대한 올바른 방법을 교육하는 교재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 어류질병의 방역 대책 수립에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.
- 양식생산물 생산현장 품질관리에 기초적인 항목인 병원체 관리방법 및 양식장 위생관리방법의 자료로서 유용하게 활용되어질 수 있을 것으로 판단된다.

제 6 장 참고 문헌

- Amend, D. F. : Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. Fish. Res. Board. Can., 27 : 265-270, 1970.
- Coates D. : Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloro isocyanurate disinfectants: neutralization by serum. J. Hosp. Infect., 11 (1) : 60-7, 1988.
- Fujioka, R. S., Loh, P. C. and Lau, L. S. : Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment - evidence for virus inactivating microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 39:1105-1110, 1980.
- Gelinas P. & Goulet, J.: Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. J. Appl. Bacteriol., 54 (2) : 243-70, 1983.
- Gosting, L. H. and Gould, R. W. : Thermal inactivation of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis viruses. Appl. Environ. Microbiol., 41 : 1081-1082, 1981.
- Hall, J. A. and Golding, L. A.: Standard methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report No. MFE 80205. NIWA report for the Ministry for Environment, Wellington, New Zealand. 1998.

Itoh, S., Yoshimizu, M., Oh, M-J., Hyuuga, S., Watanabe, K., Hayakawa, Y and Ezura, Y : Effects of Ozonized Seawater on Bacterial Population and Survival of Cultured Flounders(*Paralichthys olivaceus* and *Verasper moseri*). Suisanzoshoku 44(4) : 457-463, 1996.

Jordan, S. L., Russo, M. R., Blessing, R. L. and Theis, A. B. : Inactivation of glutaraldehyde by reaction with sodium bisulfite. J. Toxicol, Environ. Health, 47 (3) : 299-309, 1996.

Kamei, Y., Moshimizu, M., Ezura, Y. and T. Kimura : Effects of environmental water on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). J. Appl. Ichthyol., 4 : 37-47, 1987.

Kemp G.K.& Schneider K.R. : Validation of thiosulfate for neutralization of acidified sodium chlorite in microbiological testing. Poult. Sci., 79 (12) : 1857-60, 2000.

木村喬久・吉水 守 : 新殺菌工學實用ハンドブック、東京、447p. 1991.

Kuhns J. F. and Borgendale, K. : Studies of the relative dechlorinating abilities of aquarium water conditions. J. Agriculture, 1 (1) : 29-34, 1980.

Labell, R. L., Gebra, C. P., Goyal, S. M., Melnic, J. L., Gech, I. and Bogdan, G. F. : Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 39 : 588-596, 1980.

- Leung H. W.: Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 49 : 26-39, 2001.
- Lo, S., J. Gilbert and Hetrick, F. : Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 245-249, 1976.
- Mackelvie, R. M. and Desautelles, D. : Fish viruses-survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *Fish. Res. Board. Can.*, 32 : 1267-1273, 1975.
- Magunuson, S., Gundersen, K., Brandberg, A. and Lycke, E. : Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta. Pathol. Et. Microbiol. Scandinavica*, 71 : 274-280, 1967.
- 오명주 · 김홍윤 · 조현서 : 오존처리법에 의한 양어용수 살균에 대하여 I. 해산어류 병원세균의 오존 감수성. *J. Fish Pathol.* 12(1) : 42-48, 1999.
- Oh, M. J. : Fish diseases of cultured marine fishes. *Korean Aquaculture.* 11 : 63-66. 1999.
- Salo, R. J. and Cliver, J. S. : Inactivation on enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 : 68-75, 1978.
- 白濱泰彦, 吐山豊秋 : 新毒性試験法. Life-Science Information Center (LIC), Tokyo, Japan. 1986.
- Shimp, R. J. & Young, R.L.: Availability of organic chemicals for

biodegradation in settled bottom sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15 (1) : 31-45, 1988.

Sugita, H., Hayashi, K., Asai, T., Mitsuya, T., Amanuma, K., Maruyama, C. and Deguchi, Y. : Spectrophotometric method for determination of total residual oxidants in sea water. *Suisanzoushoku*, 40 : 45-50, 1992.

Toranzo, A. E. and Hetrick, F. M. : Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Dis.*, 5 : 223-231, 1982.

Watanabe, K. and Yoshimizu, M : Disinfection of equipment for aquaculture by electrolyzed seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 67 : 304-305, 2001.

Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. : Salmonid diseases, Hokkaido Univ. Press., 301-307, 1992.

Yoshimizu, M. and Kasai, K : Disinfection of Hatchery water and waste water for aquaculture. *Industry Water*, 523 : 13-26, 2002.