

지속방출형 살균제의 공기소독 효과·효능 시험방법

1. 시험방법의 개요

1.1 지속방출형 살균제의 부유미생물 저감효능은 일정한 온도 및 상대 공기 습도를 유지한 시험 챔버 내부에 시험대상 살균제를 일정 시간 방치 후, 미생물 배양액을 부유하고, 챔버 내 공기를 포집하여 미생물의 감소율을 계산한다. 이 때 미생물의 균질성 및 자연적 붕괴율을 고려하여 정해진 기간 동안 배양 가능한 공기 중 미생물의 감소율을 계산하여 공기소독의 효과·효능을 평가한다.

1.2 지속방출형 살균제의 표면미생물 저감효능은 일정한 온도 및 상대 공기 습도를 유지한 시험 챔버 내부에 시험대상 살균제를 일정 시간 방치 후, 미생물 배양액을 접종한 배지를 챔버 내에 노출시켜 미생물의 감소율을 계산한다.

1.3 지속방출형 살균제의 효과·효능시험 결과 평가를 위해, 부유미생물 및 표면미생물의 저감효율을 함께 제시하여야 한다.

1.4 지속방출형 살균제의 제품별 특성에 따라 시험방법 및 조건 등을 변경하고자 하는 경우, 이에 대한 근거자료 등을 제시하여야 한다.

2. 시험 기구 및 장치

2.1. 대형챔버시스템

대형챔버시스템은 공기 중 부유 미생물 저감 성능을 평가하기 위한 시스템으로 챔버, 분사장치, 공기채취기로 구분할 수 있다.

2.2. 시험챔버

미생물 시험을 위한 대형챔버는 기본적으로 청결하고 향온 및 향습이 가능한 실험 공간에 설치되어야 하고 챔버 내부 청결 및 무균조작 할 수 있는 시스템이 갖추어

져야 한다. 챔버의 세부사항은 ISO 16000-36을 참고할 수 있다.

2.3. Bioaerosol generator(미생물 분사장치)

Bioaerosol generator는 미생물을 분사시킬 수 있는 장비이다.

펌프, Clean air supply, Nebulizer, 수분제습장치 총 4가지로 구성되어 있다.

2.4. 공기채취기(Air sampler)

Air sampler는 관성충돌법(Impactor method)를 이용한 채취기를 사용하며 흡입 공기의 유량은 일정해야 하고 측정 가능한 것이어야 한다. 기본원리는 구멍이 뚫린 샘플링헤드 plate를 통해 공기를 일정 유량으로 흡입하며 공기는 plate에 있는 미생물 배지에 포집된다. 포집 후 미생물 배지를 배양시켜 집락수를 계수한다. 채취가 완료된 후 오염을 방지하기 위하여 샘플링 헤드를 분리한 후 70 % 에탄올로 청정화를 시킨다.

2.5. 임팩터

30 ± 1 °C 또는 37 ± 1 °C로 유지 가능 해야 하며(36 ± 1 °C가 사용 불가할 경우 37 ± 1 °C로 사용 가능) 95 % air, 5 % CO₂ 조절 가능해야 한다.

2.6. 오토클레이브(Autoclave)

(121 ± 3) °C 및 (103 ± 5) kPa의 압력에서 자동 온도 조절 식이 가능해야 한다.

2.7. 인큐베이터

(36 ± 2) °C에서 온도 조절 식으로 제어 가능해야 한다.

2.8. 냉동고

(-70 ± 10) °C에서 온도 조절 식으로 제어 가능해야 한다.

2.9. 저울

± 0.01 g의 무게 측정 가능해야 한다.

2.10. 스탠드

2.11. 클린벤치

2.12. 배양접시

2.13. 유리비드

2.14 pH미터

2.15. 타이머

2.16 자동 균수 측정기

3. 배지 및 시약

시약은 analytical grade에 해당하는 것으로 사용해야 하며 미생물 시험에 적합해야 하며, 아래 명시된 배지뿐만 아니라 기타 특정미생물 배양에 적합한 배지 및 시약을 사용해도 된다.

3.1. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 배양 배지

표 1. 영양배지(Nutrient broth) 조성

| 성분 | 함량 |
|---------------|----------|
| Bacto Peptone | 5 g |
| Beef extract | 3 g |
| 증류수 | 1,000 mL |

표 2. 영양한천배지(Nutrient agar) 조성

| 성분 | 함량 |
|---------------|----------|
| Bacto Peptone | 5 g |
| Beef extract | 3 g |
| Bacto agar | 15 g |
| 증류수 | 1,000 mL |

3.2. 흑곰팡이(*Aspergillus brasiliensis*) 배양 배지

표 3. PDA(Potato dextrose agar) 조성

| 성분 | 함량 |
|---------------|----------|
| Potato Starch | 4 g |
| Dextrose | 20 g |
| Agar | 15 g |
| 증류수 | 1,000 mL |

3.3 박테리오파지 MS2(*Bacteriophage MS2*) 배양 배지

표 4. ATCC Medium 271(*Escherichia Medium*) Bottom agar 조성

| 성분 | 함량 |
|------------------------|----------|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 1 g |
| NaCl | 8 g |
| *10 % glucose | 10 mL |
| *1 M CaCl ₂ | 2 mL |
| *Thiamine (10 mg/mL) | 1 mL |
| Agar | 15 g |
| 증류수 | 1,000 mL |

표 5. ATCC Medium 271(Escherichia Medium) Top agar 조성

| 성분 | 함량 |
|------------------------|----------|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 1 g |
| NaCl | 8 g |
| *10 % glucose | 10 mL |
| *1 M CaCl ₂ | 2 mL |
| *Thiamine (10 mg/mL) | 1 mL |
| Agar | 5 g |
| 증류수 | 1,000 mL |

표 6. ATCC Medium 271(Escherichia Medium) broth 조성

| 성분 | 함량 |
|------------------------|----------|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 1 g |
| NaCl | 8 g |
| *10 % glucose | 10 mL |
| *1 M CaCl ₂ | 2 mL |
| *Thiamine (10 mg/mL) | 1 mL |
| 증류수 | 1,000 mL |

[주 1] 박테리오파지 MS2 숙주균 배양배지는 MS2 배양배지와 동일하다.

[주 2] 필터여과한 후 무균적으로 첨가한다.

3.4 참고 대상 생물종

제품의 효과·효능을 평가하기 위해 대상 생물종을 선택할 수 있으며, 참고 대상 생물종 이외의 관련 미생물에 대한 효능 주장 시 표적 대상생물종에 관한 자료를 제출해야한다.

표 7. 시험 대상 생물종

| 구분 | 학명 |
|------|---|
| 세균 | - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 |
| 곰팡이 | - <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642 |
| 바이러스 | - Bacteriophage MS2 |

4. 시험 절차

4.1. 시험 미생물 배양액 제조

각 생물종의 배양 조건에 따라 증식한 액상 배양액 준비한다.

표 8. 초기 배양 농도 조건

| 시험 대상 미생물 | 배양 농도 |
|-----------|---------------------------------------|
| 세균 | $(1 \sim 9) \times 10^{8-9}$ cfu/mL |
| 곰팡이 | $(1 \sim 9) \times 10^6$ cfu/mL |
| 바이러스 | $(1 \sim 9) \times 10^{10-11}$ cfu/mL |

4.2 현탁액 준비

4.2.1 세균

4.2.1.1 -70℃ 초저온 냉동고에 동결상태로 보존된 황색포도상구균 (Staphylococcus aureus ATCC 6538)을 Nutrient agar 배지에 순수분리하여 (37 ± 1)℃ 정치배양기에서 24시간 동안 배양한다.

4.2.1.2 순수분리하여 배양된 colony를 100 mL의 Nutrient borth에 접종하여 (37 ± 1)℃ 진탕배양기에서 (18 ~ 24)시간 동안 배양한다.

4.2.1.3 분사용 부유 세균 현탁액의 농도는 (1 ~ 9) × 10^(8~9) cfu/mL 수준으로 사용하였다.

4.2.2 곰팡이

4.2.2.1 -70℃ 초저온 냉동고에 동결상태로 보존된 흑곰팡이(Aspergillus brasiliensis ATCC 9642)를 무균작업을 통하여 PDA 한천배지에 접종하여 (29 ± 1)℃, 90 % R.H. 이상 배양기에서 5 ~ 7일 동안 배양한다(포자 발생 확인).

4.2.2.2 PDA 한천배지에서 배양된 시험균주 표면을 멸균된 백금을 이용하여 부드럽게 긁어 50 mL 멸균증류수에 접종하여 포자액을 제조한다.

4.2.2.3 제조된 포자액을 격렬히 흔들어 1차적으로 한천 및 균사체 덩어리를 분리시킨다.

4.2.2.4 한천 및 균사체 덩어리를 제거시키기 위한 작업으로 유리깔대기에 여과지를 장착시킨 후(여과지:ADVANTEC No2) 제조된 포자액을 붓는다. 남아있는 잔여물 및 균사체 덩어리를 제거하기 위하여 최소 2회 이상 정도 필터링을 통하여 포자현탁액을 제조한다.

4.2.2.5 제조된 포자현탁액을 Haemocytometer(계수 챔버)를 이용하여 최종 포자현탁액 농도가 10⁶ spores/mL가 되도록 희석하여 분사용 부유 곰팡이 포자현탁액으로 사용하였다.

[주 3] 제조된 포자현탁액의 활성화를 확인하기 위하여 포자현탁액에서 일정량을 채취하여 PDA 배지에 접종한 후, $(29 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, 90 % R.H. 이상 배양기에서 3 ~ 5일 동안 배양하여 곰팡이 생장을 확인한다.

4.2.3 바이러스

4.2.3.1 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 초저온 냉동고에 동결상태로 보존된 박테리오파지 MS2 숙주균인 대장균(*Escherichia coli* ATCC 15597)을 ATCC medium 271 agar 배지에 순수분리하여 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 정지 배양기에서 24시간 동안 배양한다.

4.2.3.2 순수분리하여 배양된 colony를 20 mL의 ATCC medium 271 borth에 접종하여 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 진탕배양기에서 16시간 동안 배양한다.

4.2.3.3 위의 배양된 숙주 대장균 배양액 0.02 mL를 20 mL의 ATCC medium 271 borth에 접종(100 배 희석)하여 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 진탕배양기에서 약 3시간 동안 배양한다. 이때 숙주 대장균의 농도는 $(1\sim 9) \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ 가 되도록 배양한다.

4.2.3.4 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 초저온 냉동고에 동결상태로 보존된 박테리오파지 MS2*를 실온에서 녹인 후 최종 농도가 $(1\sim 9) \times 10^7 \text{ pfu/mL}$ 가 되도록 박테리오파지를 숙주 대장균 배양액에 접종한다.

4.2.3.5 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 진탕배양기에서 4 시간 동안 배양(숙주균이 용해되는 과정)한 후 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 냉장고에서 하룻밤 보존한다.

4.2.3.6 배양액을 5000 rpm에서 20 분 동안 원심분리하여 숙주 세균의 잔해를 제거한 후 상등액을 멸균 튜브로 옮긴다.

4.2.3.7 상등액을 0.22 μm 의 필터로 정제한 후 박테리오파지 용액의 농도를 확인한다. 이때 박테리오파지 용액의 농도는 $(1\sim 9) \times 10^{11} \text{ pfu/mL}$ 이상이 바람직하다.

4.2.3.8 분사용 부유 바이러스 현탁액의 농도는 $(1 \sim 9) \times 10^{(10\sim 11)} \text{ CFU/mL}$ 수준

으로 사용하였다.

[주 4] 박테리오파지 MS2 채취용 배지는 ATCC medium 271 borth에 접종하여 (37 ± 1) °C 진탕배양기에서 16 시간 동안 배양한 숙주 대장균 20 µL를 ATCC Medium 271 Top agar 2 mL에 넣고 ATCC Medium 271 Bottom agar에 부은 후 굳혀서 사용하며 부유 바이러스 채취 직전에 제조하여 사용한다.

4.3 공기 중 부유미생물 효능 평가

4.3.1 시험 전 챔버 내부 청정화 작업을 한다. (배경농도 : 0 cfu/m³)

4.3.2 공간소독 살균제 제품을 각 제품의 사용 방법에 따라 개봉 후 챔버 내부(8 m³) 중앙에 넣고 제품의 사용방법에 따라 일정시간 동안 챔버 내에 거치시킨다.

4.3.3 제품 방출 시간 이후, 준비된 미생물 배양 현탁액을 분사기(Nebulizer)에 넣어 챔버 내부로 분사한 후 공기 채취기(50 L/min)로 챔버 내부의 초기 부유 미생물을 측정한다. 이때 챔버 내부의 초기 부유 미생물 농도는 (1~4) × 10⁴ cfu/m³로 한다.

4.3.4 방출된 살균제의 접촉을 위해 30분 후 공기채취기(50 L/min)를 이용하여 각 대상 부유 미생물을 포집한다.

[주 5] 지속방출형 살균제의 방출시간 및 방출된 살균제의 접촉시간은 제품의 사용 조건에 따라 적정하게 변경한다.

4.3.5 배양 후 균수를 확인하고, Feller Conversion Table을 적용하여 결과값 농도를 산출한다.

4.3.6 이때 대조군으로 공간소독 살균제를 넣지 않은 상태에서 각 대상 생물종을 분사하고, 초기와 30분 후 포집·배양하여 공간소독 살균제 제품과 비교하여 부유 미생물 감소율을 측정한다.

4.3.7 이때 부유 미생물 감소율의 계산은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$C = N \times \frac{1}{V}$$

C : 부유 미생물 집락수 산정 생균수(CFU/m³)

N : 3개의 배지에서 측정된 생균수 평균값(CFU)

V : 채취량(m³)

$$R(\%) = \frac{\frac{C_i}{C_{i,t=0}} - \frac{C_t}{C_{t,t=0}}}{\frac{C_i}{C_{i,t=0}}} \times 100$$

R : 부유 미생물 감소율(%)

$C_{i,t=0}$: 시험제품을 넣지 않았을 때 초기 농도(CFU/m³)

C_i : 시험제품을 넣지 않고 30분이 지났을 때 농도(CFU/m³)

$C_{t,t=0}$: 시험제품을 넣은 상태에서의 초기 농도(CFU/m³)

C_t : 시험제품을 넣고 30분이 지났을 때 농도(CFU/m³)

4.4 표면 미생물 효능 평가

4.4.1 시험대상 표면 미생물 준비

4.4.1.1 세균

황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)에 대해 배양 조건에 따라 증식한 배양액을 (1~9)×10⁶ 농도로 각각 준비하고, 커버글라스(1.8 cm × 1.8 cm)에 100 μl를 고르게 분산하여 접종한 후 37 °C 건조기에서 약 40분 동안 건조하여 표

면 세균을 준비한다.

4.4.1.2 곰팡이

흑곰팡이 (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642)를 배양 조건에 따라 증식한 곰팡이 포자액(10^6 spores/mL)을 곰팡이 영양 한천배지(PDA, Potato Dextrose Agar)에 100 μ l 접종하고 배지에 완전히 흡수시켜 표면 곰팡이를 준비하였다.

4.4.1.3 표면 바이러스

박테리오파지 MS2 (Bacteriophage MS2 ATCC 15597-B1)에 대해 배양 조건에 따라 증식한 배양액을 $(1\sim 9)\times 10^7$ 농도로 준비하고, 커버글라스(1.8 cm \times 1.8 cm)에 100 μ l를 고르게 분산하여 접종한 후 37 $^{\circ}$ C 건조기에서 약 40분 동안 건조하여 표면 바이러스를 준비한다.

4.4.2 표면미생물 효능 평가

4.4.2.1 공간소독 살균제 제품을 각 제품의 사용 방법에 따라 개봉 후 챔버(8 m³) 내 중앙에 넣고 제품의 사용조건에 따라 일정시간 동안 챔버 내에 지속방출형 살균제를 방출시킨다.

4.4.2.2 설정한 방출시간 경과 후, 준비한 각 대상 생물종의 표면 미생물을 챔버 내 중앙에 위치시킨다.

4.4.2.3 방출된 살균제의 접촉을 위해 30분 후 표면 미생물을 꺼내 생리식염수로 씻어내고 단계 희석하여 배양한 후 균수를 확인한다.

[주 5] 지속방출형 살균제 방출시간 및 방출된 살균제의 접촉시간은 제품의 사용 조건에 따라 적정하게 변경한다.

[주 6] 곰팡이의 경우 생물종 특성상 계수가 어려우므로 성장/미성장으로 판독한다.

4.4.2.4 이때 대조군으로 동일한 과정의 시험을 수행하고, 제품에서의 결과와 비교하여 감소율을 측정한다.

5. 참고문헌

5.1 ISO 3696, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods

5.2 ISO 16000-36, Indoor air – Standard method for assessing the reduction rate of culturable airborne bacteria by air purifiers using a test chamber

5.3 EN 13697:2015 Chemical disinfectants and antiseptics, Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)

6. 부록

6.1 시험 챔버 구성



8 m³ chamber (외부)



8 m³ chamber (Main chamber)

- 메인 챔버
 - 크기 : 8 m³
 - 온도 : 5 ~ 40 °C
 - 습도 : (20 ~ 80) % R.H
 - 배경농도
 - : TVOC < 20 µg/ m³
 - : HCHO < 2 µg/ m³
 - : iVOC < 2 µg/ m³

- 내부 특수 장치
 - UV System
 - Rail System
 - Glove Box

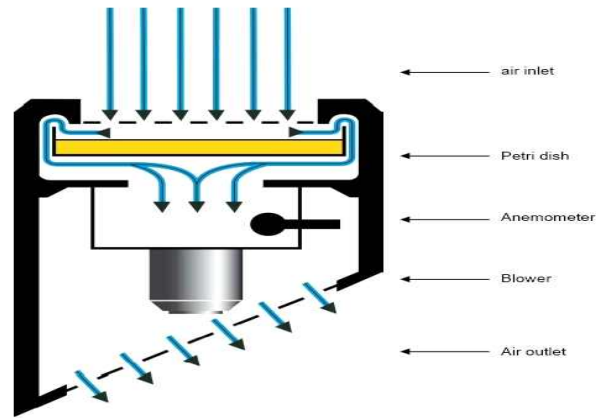
- Control System
 - Data Logger, Monitoring
 - 온도 및 유속 센서
 - : 온도(9지점), 유속(4지점)

6.2 Bioaerosol generator(미생물 분사장치) 구성

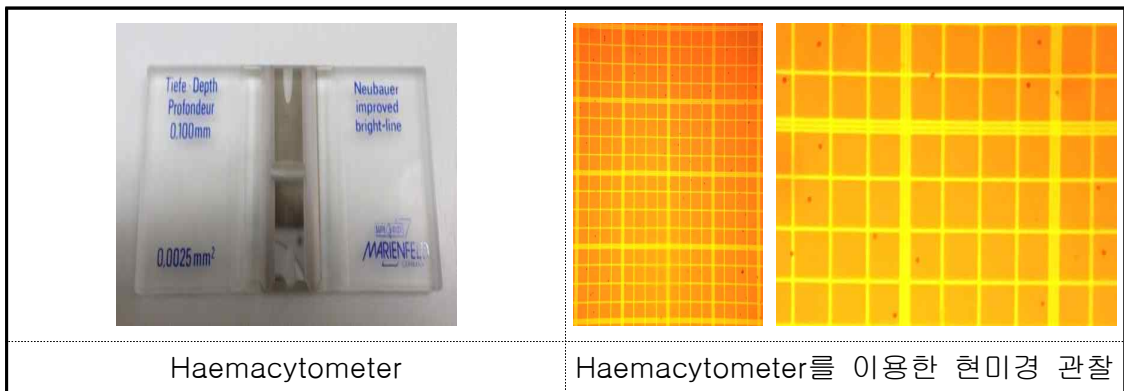
| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>펌프(Compressor)</p> | <p>Clean air supply</p> |
|  |  |
| <p>Nebulizer</p> | <p>Diffusion dryer(수분제습장치)</p> |

- 펌프: 일정 기압을 넣어 분사시킬 수 있는 압력을 넣어주는 장치이다.
- Clean air supply: 공기를 정화시켜주는 역할을 함으로써 깨끗한 공기를 넣어주는 장치이다.
- Nebulizer: 미생물 배양액을 안에 넣고 미생물을 발생시킬 수 있는 장치이다.
- 수분 제습장치: 분사장치의 마지막 단계로서 Nebulizer를 통하여 발생된 미생물 배양액의 수분을 제거 시켜주는 역할을 하는 장치이다. 수분제습장치는 배양액의 수분을 제거시켜 줌으로써 분사되어질 때 최소한의 미생물 입자만 분사시켜 입자의 크기를 줄여 줌으로써 자연 낙하를 방지하고 일정한 환경 내 콜로이드 분사시킬 수 있게 한다.
- 전체적인 분사장치의 노즐은 입자 크기 0.05 ~ 5 μm 크기의 입자를 분사시킬 수 있다.

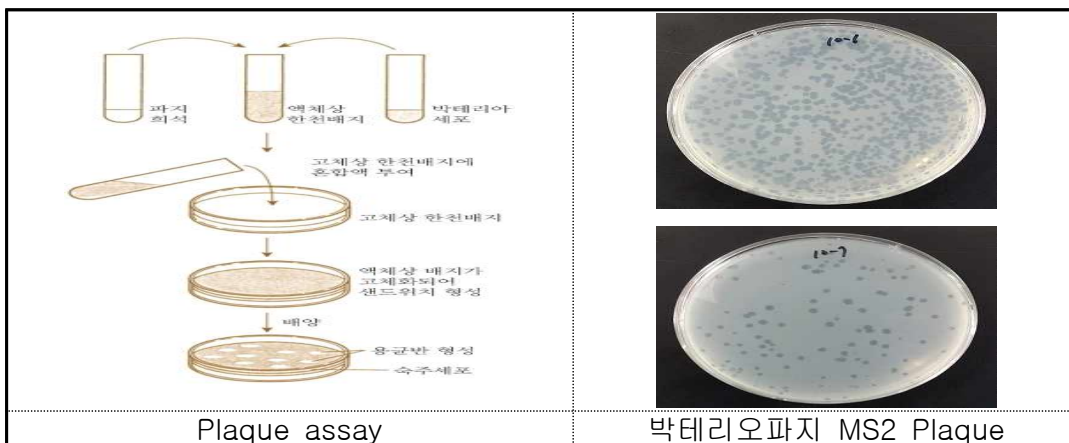
6.3 공기채취기(Air sampler) 채취 원리 모식도



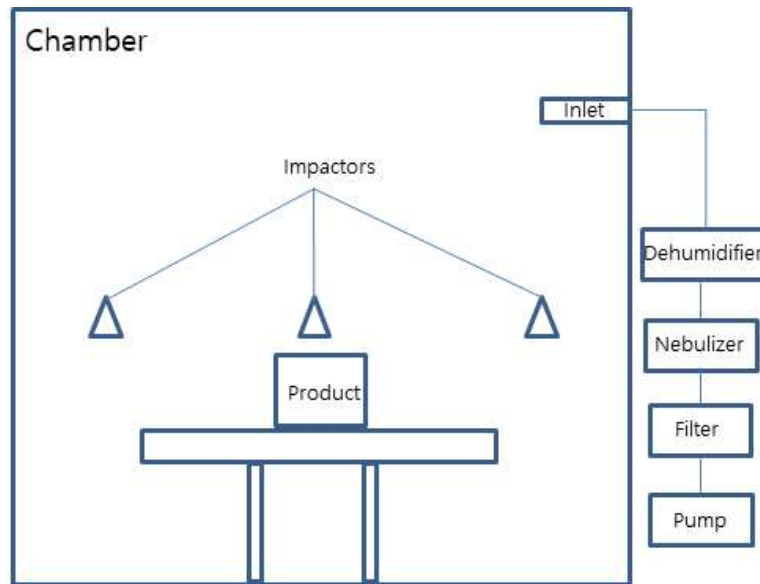
6.4 곰팡이 포자농도 확인



6.5 박테리오파지 MS2 농도 확인



6.6 지속방출형 살균제의 부유미생물 효과·효능시험 장치 모식도



6.7 지속방출형 살균제의 표면미생물 효과·효능시험 장치 모식도

