

소독제에 따른 어류 병원성 바이러스의 불활화 효과

박경희* · 오명주**† · 김석렬***,****†

*부산시해양자연사박물관, **전남대학교 수산생명의학과
****공주대학교 스마트수산자원학과, ****농수산생명과학연구소

Viral inactivation of chemical disinfectants on fish pathogenic viruses

Kyung-Hee Park*, Myung-Joo Oh**† and Seokryel Kim***,****†

*Busan Marine Natural History Museum, Dongnae-gu, Busan, 47700, Republic of Korea

**Dept. of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu, 59626, Korea

***Dept. of Smart Fisheries Resources Science, Kongju National University, Yesan, 32439, Korea

****Agricultural and Fisheries Life Science Research Institute

In this study, we studied the use of 10 commercial disinfectant candidates in aquaculture field conditions for fish pathogenic viruses; Marine birnavirus, Infectious pancreatic necrosis virus, Hirame rhabdovirus. Sodium hypochlorite inactivated more than 99% under the treatment conditions of 23 ppm for 20 minutes, 150 ppm for chlorine dioxide, 40-80 ppm for povidone-iodine, 50 ppm for glutaraldehyde, and 150 ppm for didecyl dimethyl ammonium chloride. The virus inactivation ratio exceeded 99% under the treatment conditions of hydrogen peroxide at 1,050 ppm for 60 minutes and Formalin at 500 ppm or more, and the virus inactivation concentration of hydrogen peroxide and formalin was too high. These indicate that its disinfection effect was insignificant. Quaternary ammonium compounds were not expected to inactivate viruses even at 225 ppm of active ingredient, dichlorobenzene at 2,250 ppm, and copper sulfate at 3,000 ppm, so it was showed that it could not be used as a disinfectant. As a result of this study, sodium hypochlorite, chlorine dioxide, povidone-iodine, glutaraldehyde, and didecyl dimethyl ammonium chloride were confirmed to have antiviral effects.

Key words: Fish pathogenic virus, Disinfectants, Inactivation, Chemical

서 론

수산용의약품은 약사법 제85조 및 동물용의약품 등 취급규칙 제2조에 의거 「수산용동물용 의약품으로 어패류 등에 사용함을 목적으로 하는 동물

용의약품」을 말하고, 수산용의약품의 약효분류로는 항병원성약, 생물학적제제, 외피 작용약, 소화기계 작용약, 대사성약, 비뇨생식기계 작용약, 신경계 작용약과 의약외품으로 소독제를 포함하고 있다(Kim et al., 2014).

수산용 소독제는 바이러스, 세균, 곰팡이 원충 및 흡충에 유효성이 있으며, 약제로는 이산화염소, 요오드포비돈, 클로라민티, 과산화수소, 차아염소산칼륨 등 15종이 승인되어 있다(Aquatic Medicine

†Corresponding author

Tel: +82-61-659-7173

E-mail: ohmj@chonnam.ac.kr (Myung-Joo Oh)

Tel: +82-41-330-1141

E-mail: seokryel@kongju.ac.kr (Seokryel Kim)

Catalog, 2022). 소독 행위는 양식 수산생물이 전염병에 감염될 위험성이 있는 병원체와 그 병원체를 전파시키는 오염된 기구, 숙주 및 동물을 불활성화 또는 박멸하여 전염병으로부터 양식생물을 보호하는 수단으로서 양식생물 전염병 발생이나 만연을 방지하는 방법으로 이용되고 있다(Kim et al., 2019).

어류 및 갑각류 바이러스성 질병은 현재까지 치료 대책은 없으며, 그 위험성을 최소화하는 방법으로 백신과 바이러스 확산을 방지하는 소독법만이 최선의 예방법으로 여겨진다. 양식생물 전염병 유래 바이러스의 생물 및 세포계 외에서의 불활성화에 관한 연구로서 Infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) 및 Infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV)를 대상으로 Phosphate buffered saline(PBS), Balanced salt solutions(BSS), Minimum essential medium(MEM) 내에서의 불활성화에 대하여 Amend(1970), Mackelvie와 Desautels(1975), Gosting 와 Gould(1981)등이 보고한 바 있으나, 어류 서식환경인 수중에서의 바이러스 감염가 변화에 대한 연구는 많지 않다. 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., 2005) 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 보고되어 있다. Watanabe와 Yoshimizu(2001)는 작업자의 손, 장화 소독을 비롯하여 육상시설에서는 사육기구류 및 사육수조의 소독이 중요성에서 고안하여 오존처리수를 이용한 양식장내 사용기구류의 소독을 조사한 바 있으나, 소독제를 사용한 결과는 많지 않다.

소독제의 사용에는 시판의 소독약 중에서 수중에 잔류하면서 어류에 독성이 적은 것을 골라 적절히 사용하여야 하며, 또한 반복사용이 가능한지, 저온에서의 효력 유무 등도 고려해야한다(Kimura and Yoshimizu, 1991). Kasai 등(2002)은 해수의 오

존처리에 의해 생성되는 옥시단트 또는 차아염소산을 소독제로 사용하는 것을 검토하였는데, 옥시단트에 의한 난소독은 요오드제에 의한 소독보다도 효과적이었다고 보고하였으나, 소독제들의 바이러스 소독효과에 대해서는 정보가 제한적이다.

본 연구에서는 시판되는 10종의 소독제의 어류 양식장에서의 사용가능성과 적합한 소독제의 사용방법을 검토하기 위한 연구의 일환으로, 어병 바이러스를 대상으로 소독제들의 바이러스 불활화 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

소독제

국내 시판 소독제는 hydrogen peroxide(H_2O_2 35%, pH 1.3, Hansol Co., Seoul, Korea), sodium hypochlorit ($NaClO$ 1.5%, pH 12.1, Samchun Co., Seoul, Korea), chlorine dioxide(ClO_2 5%, pH 5.0), povidon iodine[(C_6H_9NO)nI 10%, Samyang Chem., Seoul, Korea], formalin(CH_2O 35%, Duksan, Co., Seoul, Korea), glutaraldehyde($C_5H_8O_2$, Samyang Chem.), quaternary ammonium compounds(QACs, formula of NH_4Cl , Samwoo Chem. Co., Seoul, Korea), didecyl dimethyl ammonium chloride(DDAC, Samwoo Chem.), ortho-dichlorobenzene($C_6H_4Cl_2$, Samwoo Chem.)와 copper sulfate($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

바이러스

국내 양식어류로부터 분리 후 연구실에서 보관 중인 Marine birnavirus(MABV)와 Infectious pancreatic necrosis virus(IPNV)는 CHSE-214세포, Hiram rhabdovirus(HIRRV)는 RTG-2세포를 이용하여 배양하였다. 바이러스는 역가를 높이기 위해 각각 2회의 계대배양을 실시하였으며 MABV, IPNV는 75 cm^2 tissue culture flask에 Dulbecco's Modified Eagle Medium-5(DMEM: 100 ug/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 5% Fetal Bovine Serum, pH 7.4)를 이용하여 단층 배양된 CHSE-214세포에 접종한 후 20°C 에서 배양하였고, HIRRV는 75 cm^2 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.

바이러스 titer

CHSE-214 cell line과 RTG-2 cell line을 계대배양하여 96 well microplate에 cell수가 2.5×10^5 cells /ml 가되게 100 μ l 분주한 후 15°C에서 15시간 배양 후, DMEM-0에 10배 희석계열로 희석한 MABV, IPNV는 CHSE-214 cell line에 100 μ l씩 접종 후 20°C에서 그리고 HIRRV는 RTG-2 cell line에 100 μ l씩 접종 후 13°C에서 7일간 배양하면서 CPE를 관찰하고 바이러스 감염가는 end point dilution assay 방법인 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) (Reed & Muench, 1938)의 방법으로 계산하였다.

$$\text{Index} = \frac{a - 50\%}{a - b}$$

a; % infected at dilution immediately above 50%,

b; % infected at dilution immediately below 50%

바이러스 불활화 반응

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, 25 ppm이 되게 조정된 소독제액과 MABV, IPNV, HRV 바이러스액을 $2 \times 10^{7.5}$ 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.

결과 및 고찰

본 연구에서는 국내 시판되는 10종의 소독제 후보군에 대하여 어류병원바이러스를 대상으로 양식현장 조건에서의 사용을 검토하고, 소독제 처리

에 따른 바이러스의 감염가의 변화 결과는 Table 1, 2와 3에 나타내었다. Table에는 바이러스 소독에 따른 불활성화 효과를 TCID₅₀/ml로 제시하였고, 본문에는 불활화율로 TCID₅₀/ml 값을 %로 변환하여 설명하였다. 시험 시작 농도는 5.5 TCID₅₀/ml이었고, 2 TCID₅₀/ml이하는 측정 불가하여 <2로 표기하였다.

Hydrogen peroxide(H₂O₂ 35%, pH 1.3)의 실험에 적용된 유효성분량은 8.7, 17.5, 35, 70, 140, 280, 525, 1,050 ppm의 조건이었는데, HIRRV의 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. Hydrogen peroxide는 1,050 ppm이상에서 HIRRV에서만 불활화 효과를 보였고, 해산어에 대한 반수치 사농도가 200 ppm 정도로 보고된 소독제이다(Kim et al., 2008). Hydrogen peroxide의 바이러스 불활화 연구로 Tilapia lake virus(TiLV) 대상으로 한 연구에서 H₂O₂를 300 ppm 28°C에서 10분 노출 후에 조사한 결과 10⁵ TCID₅₀/ml 이상의 TiLV 비활성화를 나타내, 본 연구와 3배 정도의 낮은 농도에서도 바이러스 불활성화 효과가 있음을 보였다. 이들은 소독제들이 바이러스 농도를 최소 수준으로 효과적으로 줄일 수 있으며 양식장 및 관련 시설에서 TiLV의 확산을 제한하려면 소독제의 적절한 사용을 장려해야 한다고 제시하였다(Jaemwimol et al., 2019). Hydrogen peroxide는 기생충 구제제로 검토되었으며(Sahan, 2020; Montgomery-Brock et al., 2007) 어류병원바이러스 소독효과에 대한 연구는 많지 않다. Hydrogen peroxide는 공기 및 수중에 노출되면 빛, 열, 높은 pH 뿐만 아니라 효소 및 화합물 등에 따라 빠르게 산화되는 특성을 갖는 소독제이다. Hydrogen peroxide의 산화 연구에서 공기와 유기물 조건으로 15°C와 20°C 수중에서 과산화수소 농도 10-100 ppm은 2~3일 후에 측정 불가하였고, 공기나 유기물이 없는 정제된 수중에서는 H₂O₂ 농도는 6일째에 반감되었고 10일째에 검출되어 않을 정도로 공기와 유기물에 영향을 받는다(Tort et

Table 1. Inactivation of marine birnavirus (MABV) following treatments of commercial disinfectants ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml)

Disinfectants	Exposure time	concentration (ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1,500	3,000
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂ 35%, pH 1.3)	20min	5.5	5.5	5.5	5	5	5	5	5
	60min	5.5	5.5	5	5	5	5	4.5	4
Sodium hypochlorite (NaClO 1.5%, pH 12.1)	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
Chlorine dioxide (ClO ₂ 5%, pH 5.0)	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
Povidon iodine [(C ₆ H ₉ NO)nI 10%]	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
Formalin (CH ₂ O 35%)	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
Glutaraldehyde (C ₃ H ₈ O ₂)	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
Quaternary ammonium compounds (formula of NH ₄ Cl)	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
Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)	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
Ortho-dichlorobenzen (C ₆ H ₄ Cl ₂)	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
Copper sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	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

Table 2. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) following treatments of commercial disinfectants ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml)

Disinfectants	Exposure time	Concentration (ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1,500	3,000
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂ 35%, pH 1.3)	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
Sodium hypochlorite (NaClO 1.5%, pH 12.1)	20min	5.5	5.5	5.5	5	3	2	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5.5	5	2	<2	<2	<2
Chlorine dioxide (ClO ₂ 5%, pH 5.0)	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
Povidon iodine [(C ₆ H ₉ NO)nI 10%]	20min	5.5	5.5	5	4.5	4	4	2	<2
	60min	5.5	5	5	4	3	2	<2	<2
Formalin (CH ₂ O 35%)	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
Glutaraldehyde (C ₃ H ₈ O ₂)	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
Quaternary ammonium compounds (formula of NH ₄ Cl)	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
Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)	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
Ortho-dichlorobenzen (C ₆ H ₄ Cl ₂)	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
Copper sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	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

Table 3. Inactivation of hirame rhabdovirus (HIRRV) following treatments of commercial disinfectants ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml)

Disinfectants	Exposure time	Treated concentration of disinfectants (ppm)							
		25	50	100	200	400	800	1,500	3,000
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂ 35%, pH 1.3)	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
Sodium hypochlorite (NaClO 1.5%, pH 12.1)	20min	5.5	5.5	4.5	3.5	3.5	<2	<2	<2
	60min	5.5	5	4	3	3	<2	<2	<2
Chlorine dioxide (ClO ₂ 5%, pH 5.0)	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
Povidon-iodine [(C ₆ H ₅ NO)nI 10%]	20min	5.5	5.5	5	4	2	2	<2	<2
	60min	5.5	5.5	5	3.5	2	<2	<2	<2
Formalin (CH ₂ O 35%)	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
Glutaraldehyde (C ₅ H ₈ O ₂)	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
Quaternary ammonium compounds (formula of NH ₄ Cl)	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
Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)	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
Ortho-dichlorobenzen (C ₆ H ₄ Cl ₂)	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
Copper sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	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

al. 2003). Russo 등(2007)은 관상용 어류와 어류가 없는 흙 연못에서 수조를 대상으로 H₂O₂의 안정성을 테스트하였는데, H₂O₂ 시작 농도는 1.2-26.9 ppm 범위였는데, 1시간 후 농도는 모든 탱크에서 시작 농도와 크게 다르지 않았지만 24시간 후 모든 탱크의 농도는 0.4-0.8 ppm으로 크게 감소하였고, 흙 연못 조건에서 초기 H₂O₂ 농도가 각각 6.46-13.60 ppm인 두 개의 연못은 24시간 후 농도가 1-2 ppm으로 감소할 만큼 빠르게 산화되는 소독제이다 (Russo et al. 2007).

Sodium hypochlorite(NaClO 1.5%, pH 12.1)는 유효성분량을 2.9, 58, 11.5, 23, 46, 93, 172.5, 345 ppm의 조건으로 적용하였는데, 이 소독제는 HIRRV의 경우 23 ppm 20분의 처리조건 이상에서는 99% 이상의 불활화 시켰고, IPNV 및 MABV의 경우에는 50 ppm 정도 이상의 처리 조건이라면 99% 이상의 불활화율을 기대할 수 있을 것이라고 판단되어졌다. Sodium hypochlorite는 1820년에 항균활성 능력이 밝혀짐에 따라 소독제로 널리 사용 시작했다 (Coates, 1985; Topic et al., 2021). 차아염소산나트

륨(2%)은 메티실린 내성 황색 포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)과 같은 항생제 내성균도 1분 이내에 사멸시킬 수 있을 정도로 항균 활성이 뛰어나다(Lee et al., 2009). 그렇지만 어류 바이러스에 대한 사례는 많지 않다. 본 연구에서 Sodium hypochlorite는 3 바이러스에 대해 50 ppm 이상에서 99% 이상의 불활화 효과가 관찰되었지만 틸라피아에서 발견되는 Tilapia lake virus(TiLV)는 28°C에서 10분간의 노출에도 10⁵ 이상의 바이러스 불활화 효과를 보여(Jaemwimol et al., 2019) 온도에 따른 불활화 효과가 다른 것으로 사료되었다.

Chlorine dioxide(ClO₂ 5%, pH 5.0)의 경우, 유효성분량이 1.3, 2.5, 5, 10, 20, 40, 75, 150 ppm이 되는 농도 조건에서 실험이 행하여졌는데 최고 농도인 150 ppm의 처리했을 경우 HIRRV 및 MABV에 대해서만 99% 이상의 불활화됨을 확인하였고, 그 이하의 처리조건에서는 바이러스 불활화율이 낮게 나타나 실제적인 양식장에서의 바이러스 방역 용으로서 사용할 경우 이보다 높은 농도의 유효농

도 범위를 적용하여야지만 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. ClO_2 는 염소 산화물의 일종으로 음용수의 소독처리 및 표백제로 널리 사용되고 있고, 병원성 세균 및 바이러스에 대해 광범위한 살균/불활화 능력을 가지고 있다(Volk et al., 2002). ClO_2 는 높은 산화력으로 생체막을 구성하는 지질과 단백질 구조를 변경시켜 다양한 미생물에 대해서 높은 독성을 발휘하는 것으로 알려지고 있다(Huang et al., 1997; Gordon and Rosenblatt, 2005). ClO_2 의 살균 및 바이러스 불활화 효과는 매우 잘 알려져 있고, 어류바이러스 불활화 연구로는 어류 양식 장비 또는 어란에 100 ppm ClO_2 를 4°C에서 5분간 소독하여 infectious salmon anaemia virus(ISAV)를 10^4 TCID₅₀/ml 이하로 불활성화 시킬 수 있음을 제시하였고(Smail et al., 2004), 본 연구에서도 유사하게 150 ppm 농도로 처리하였을 때 99% 이상의 바이러스 불활화 효과를 확인하였다.

Povidon iodine [(C₆H₉NO)nI 10%]의 경우, 유효 성분량 2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80, 150, 300 ppm의 조건으로 처리했을 때 3종 바이러스 전체를 대상으로 40-80 ppm 농도의 처리에 의하여 99% 이상의 불활화됨이 확인되었다. Povidone-iodine은 바이러스 감염을 예방하기 위해 어류 수정란 소독에 15-100 ppm, 30-60분 정도 널리 사용되어 왔고(Warren, 1991; Smail et al., 2004; Chalupnicki et al., 2011)본 연구에서는 40-80 ppm 구간에서 IPNV, MABV 및 HIRRV 모두 99% 이상의 불활화 효과가 확인되어 기존 연구와 유사한 결과를 확인하였다. 그렇지만 WSBV 불활화 연구에서 30 ppm에 1시간 처리하였으나 불활화 효과를 검증하지 못한 사례도 보고되어 있다(Heo and Shon, 2000).

Formalin(CH₂O 35%)의 경우, 8.8, 17.5, 35, 70, 140, 280, 525 및 1005 ppm 유효농도 조건에서 이루어진 실험에서 500 ppm 이상의 유효농도 조건이 성립되어질 경우에만 바이러스의 제어가 기대되어질 수 있는 것으로 확인되어져, 실제적으로 어류 양식장내 사육중의 조건에서 약욕 등의 처리를 할 경우에는 적용할 수 없는 농도 조건으로 생각되어졌다. CH₂O는 바이러스 백신 제작과정에서 0.1% 농도로 처리하여 바이러스의 불활화 시키는데 사용되어왔다. 그렇지만 틸라피아 TiLV 80 ppm 포르

말린에서 바이러스 불활성화 되었다고 보고한 사례가 있어(Jaemwimol et al., 2019) 어류 병원바이러스 소독제로 사용하기에는 검토가 요구된다.

Glutaraldehyde(C₅H₈O₂)의 경우 유효 농도범위가 2.5, 5.0, 10, 20 ppm의 조건에서는 바이러스의 불활화는 어려운 것으로 판단되었고, 50 ppm 이상의 처리조건으로 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 판단되었지만, C₅H₈O₂는 아직 수산용 소독제로 승인되어 있지 않다.

Quaternary ammonium compounds(QAC, formula of NH₄Cl)의 경우 1.9, 3.8, 7.5, 30, 60, 113 및 225 ppm 조건의 유효농도 범위에서 검토해 본 결과 바이러스의 소독용으로서의 효용성은 높지 않은 것으로 판단되어졌다.

Didecyl dimethyl ammonium chloride(DDAC)의 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. DDAC는 4급 암모늄의 일종으로 세균 세포벽의 구조와 생리적 활성을 저해함으로써 강력한 살균력을 보이는 것으로 알려져 있고(Takasaki et al., 1994), 또한 미국환경보호청(EPA)의 자료에 따르면, DDAC는 식품 작업장 바닥 및 기구 소독을 목적으로 사용할 경우, 유효농도를 800-2,400 ppm으로 규정하고 있어(EPA, 2006), 향후 수산용의약품으로 승인된다면 양식 현장에서 기구 및 장비 소독제로서 역할을 할 수 있는 제품이라고 판단되었다.

Dichlorobenzene(C₆H₄Cl₂) 및 Copper sulfate(CuSO₄·5H₂O)의 경우는 실험조건 최고 농도인 유효성분 각각 2,250 ppm 및 3,000 ppm의 조건에서도 99% 이상의 불활화율을 나타내지 못하여, 실험에 적용한 다른 시판제품과 비교하였을 때 가장 낮은 적용가능성을 보였으며, 두 성분 모두 어류병원 바이러스에 대한 적용 사례는 거의 없다. Dichlorobenzene은 일명 cresol 명명되는 소독제로서 파리 유충 박멸뿐만 아니라 항균 및 항기생충 특성도 인정받고

있는 소독제이고, 강력한 조류 인플루엔자 바이러스를 불활화시키는 특성이 있어 가금류 산업에는 유용한 소독제로 인정받고 있다(Yabuta et al., 2019). Copper sulfate는 담수·해수 수족관 및 양식 어류의 기생충성 질병 통제와 치료를 목적으로 사용되어 왔으며, 양식 호지에서 달팽이를 제거하기 위한 화학요법제로 많은 국가에서 사용되었다(Calomeni et al., 2018). Copper sulfate 물에 용해되어 구리와 황산염 이온으로 분리되고, 이온성 구리는 여러 단백질 활성부위의 일부를 구성함으로써 세포 대사에서 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 구리는 세포에 독성이 있는 자유 라디칼을 생성하고 환경에서 높은 농도로 유기체에 독성으로 작용할 수 있다(Afaghi and Zare, 2020).

농림축산검역본부 고시 ‘소독제 효력시험지침’에 의하면 바이러스의 소독효과 검증의 경우 원칙적으로 표준시험조건에서 병원체 대조군과 비교하여 병원체가 ml당 10^4 배(또는 TCID₅₀, EID₅₀, LD₅₀) (상용대수로 환산한 값 4) 이상의 사멸 또는 불활화가 확인된 희석배수를 유효농도로 하였다(농림축산검역본부고시 제2018-16호). 이에 의하면 Sodium hypochlorite, Povidon-iodine, Formalin 및 Glutaraldehyde 만이 기준에 충족하는 결과를 보였다. 본 연구를 통해 시판되는 10종의 소독제 성분들의 양식현장 사용가능성을 검토하였고, 이들 성분의 추가 현장 조건 연구 등으로 현장에서 어류전염성 바이러스 불활화에 효율적인 소독제 선택 범위를 확장할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(넙치 SPF 종자 생산기술개발).

References

- Afaghi, A. and Zare, S. Effects of exposure to sub-lethal concentrations of copper on hematological and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus Carpio*. Arch Adv Biosci. 11(1):26-36. 2020. 10.22037/aab.v11i1.28891
- Amend, D.F. Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. Fish Res Board Can. 27:265-270. 1970. <https://doi.org/10.1139/f70-034>
- Aquatic Medicine Catalog. National Fishery Products Quality Management Service. 2022
- Calomeni, A.J. Kinley, C.M. Geer, T.D. Iwinski, K.J. Hendrikse, M. and Rodgers Jr, J.H. Relationship among aqueous copper half-lives and responses of *Pimephales promelas* to a series of copper sulfate pentahydrate concentrations. Ecotoxicol. 27(3):278-285. 2018. 10.1007/s10646-018-1893-9
- Chalupnicki, M.A., George Ketola, H., Starlier, C.E. and Gallagher, D. Efficacy and toxicity of iodine disinfection of atlantic salmon eggs. Nor Ame J Aquacul. 73:124-128. 2011. DOI: 10.1080/15222055.2011.559865
- Coates, D.A. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. J Hosp Infect. 6:31-40. 1985. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(88\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0195-6701(88)90040-0)
- Environmental Protection Agency(EPA): Registration eligibility decision for DDAC CASE3003. EPA-739-R-96-008. 2006.
- 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. DOI: 10.1128/aem.39.6.1105-1110.1980
- Gordon, G. and Rosenblatt, A.A. Chlorine dioxide: the current state of the art. Ozone Sci Eng. 27:203-207. 2005. <https://doi.org/10.1080/01919510590945741>
- 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. DOI: 10.1128/aem.41.4.1081-1082.1981
- Huang, J., Wang, L., Nanqi, R., and Junli, H. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Wat Res. 31:607-613. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8)
- Heo, M.S. and Shon, S.G. Inactivation of white spot baculovirus (WSBV) by chlorine, iodine, sunlight exposure, drying and fresh water. J Fish Pathol. 13(2): 97-102. 2000. I410-ECN-0102-2009-490-006040162
- Jaemwimol, P., Sirikanchana, K., Tattiyapong, P., Mongkolsuk, S. and Surachetpong, W. Virucidal effects of common disinfectants against tilapia lake virus. J Fish Dis. 42(10):1383-1389. 2019. doi: 10.1111/jfd.13060
- Kim, J.W., Cho, M.Y., Jee, B.Y., Park, M.A. and Kim,

- N.Y. Administration and use of aquaculture drugs in Korea. *J Fish Pathol.* 27(1):67-75. 2014. <https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.067>
- Kim, S.R., Park, K.H., Kim, D.W., Jung, S.J., Kang, S.Y. and Oh, M.J. Antimicrobial effects of chemical disinfectants on fish pathogenic bacteria. *Food Sci Biotechnol.* 17(5):971-975. 2008. G704-000139.2008. 17.5.023
- Kim, Y.J., Seo, J.S., Park, J.O., Jeong, A.R. and Lee, J.H. Monitoring of aquatic medicine managements in South Korea. *J Fish Pathol.* 32(1):37-43. 2019. <https://doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.037>
- Kimura, T. and Yshimizu, M. New bactericidal engineering experiment handbook, Tokyo, pp. 447. 1991.
- 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. DOI: 10.1128/aem.39.3.588-596.1980
- Lee, D., Howlett, J., Pratten, J., Mordan, N., McDonald, A., Wilson, M. and Ready, D. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. *FEMS Microbiol Lett.* 291: 241-246. 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01463.x
- Lo, S., Gilbert, J. and Hetrick, F. Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Appl Environ Microbiol.* 32:245-249. 1976. DOI: 10.1128/aem.32.2.245-249.1976
- Mackelvie, R.M. and Desautels, D. Fish viruses-survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Res Board Can.*, 32:1267-1273. 1975. <https://doi.org/10.1139/f75-147>
- Mentel', R., Shirrmakher, R., Kevich, A., Dreizin, R.S. and Shmidt, I. Virus inactivation by hydrogen peroxide. *Vopr virusol.* 6:731-733. 1977. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203115/>
- Montgomery-Brock, D., Sato, V.T., Brock, J.A. and Tamaru, C.S. The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* on the Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis*. *J World Aqua Soc.* 32:250-254. 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb01103.x>
- Reed, L.J. and Muench, H. A Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Ame J Hygie.* 27:493-497. 1938. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Russo, R., Curtis, E.W. and Yanong, R.P.E. Preliminary investigations of hydrogen peroxide treatment of selected ornamental fishes and efficacy against external bacteria and parasites in green swordtails. *J Aquat Ani Health.* 19:121-127. 2007. DOI: 10.1577/H05-024.1
- Sahan, A. The effects of formaldehyde, hydrogen peroxide and trichlorophon applications on some hematological stress indicators in Mirror Carp(*Cyprinus carpio* L.). *Acta Aquatica Turcica.* 16(1): 71-81. 2020. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.594137>
- Salo, R.J. and Clliver, J.S. Inactivation on enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfate. *Appl Environ Microbiol.* 36:68-75. 1978. DOI: 10.1128/aem.36.1.68-75.1978
- Takasaki, A., Hashida, T., Kato, K. Moriyama, T. and T. Action of a quaternary ammonium disinfectant on cell membrane of *Staphylococcus aureus*. *Jpn J Toxicol Environ Health.* 40:520-526. 1994. DOI: 10.1128/AAC.00375-06
- Topić, F., Marrett, J.M., Borchers, T.H., Titi, H.M., Barrett, C.J. and Friščić, T. After 200 years: The structure of bleach and characterization of hypohalite ions by single-crystal X-ray diffraction. *Angew Chem Int Ed Engl.* 60:24400-24405. 2021. <https://doi.org/10.1002/anie.202108843>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00477.x>
- Toranzo, A.E., Magarinos, B. and Romalde, J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture.* 246:37-61. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
- Tort, M.J., Fletcher, C., Wooster, G.A. and Bowser, P.R. Stability of hydrogen peroxide in aquaria as fish disease treatment. *J Appl Aquac.* 14:37-45. 2003. https://doi.org/10.1300/J028v14n03_03
- Volk, C.J., Hofmann, R., Chauret, C., Gagnom, G.A., Ranger, G. and Andrews, R.C. Implementation of chlorine dioxide disinfection: effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *J Environ Eng Sci.* 1:323-330. 2002. <https://doi.org/10.1139/s02-026>
- Warren, J.W. Diseases of hatchery fish, 6th edition. U.S. Fish and Wildlife Service, Portland, Oregon. 1991.
- Watanabe, K. and Yoshimizu, M. Disinfection of equipment for aquaculture by electrolyzed seawater. *Nip Sui Gakka.* 67:304-305.001.
- Yabuta, T., Otsuki, K., Takakuwa, H. and Komatu, H. Anti-avian influenza virus properties of ortho dichlorobenzene cresol complex formulation with strong antimicrobial activity. *J Jap Vet Med Ass.* 72(4):205-209. 2019. DOI: 10.12935/jvma.72.205

Kasai, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. Disinfection of water for aquaculture. Fisheries Science. 68:821-824. 2002. 10.2331/fishsci.68.sup1_821

소독제 효력시험지침: 농림축산검역본부고시 제2018-16호. <https://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?admRulSeq=2100000129449>

Manuscript Received : May 23, 2023

Revised : Jun 06, 2023

Accepted : Jun 07, 2023