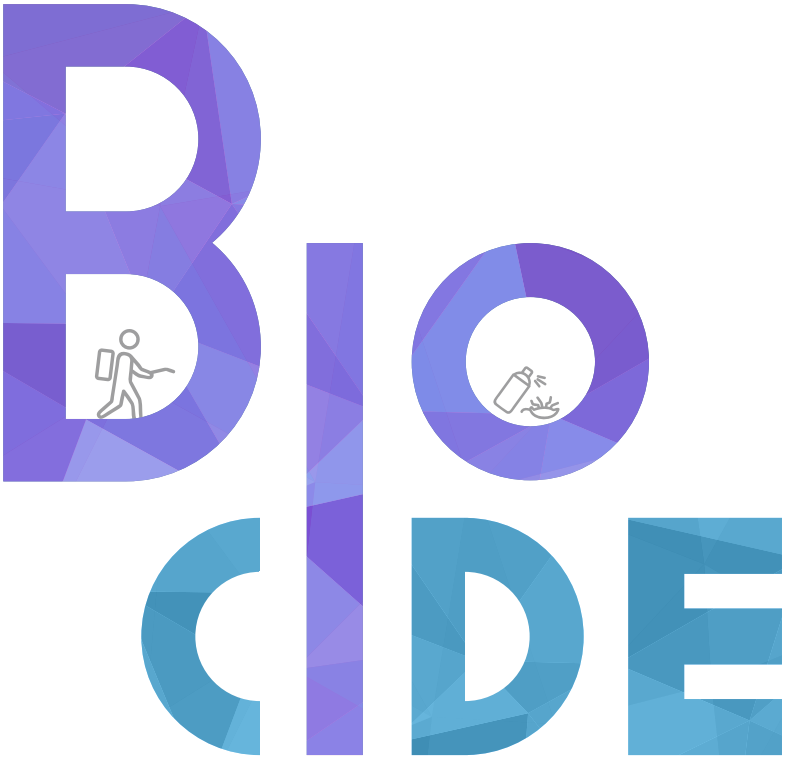
발 간 등 록 번 호
11-1480523-004403-01

NIER-GP2021-023

살생물제

효과·효능 시험방법 자료집 – 살균제류

2021. 6



환 경 부
국립환경과학원

문서 이력

번호	주요 제·개정사항	일자
1.	• 살생물제 승인을 위한 효과·효능 시험방법 자료집-살균제류 • 발간등록번호: 11-1480523-004403-01 • N I E R 번 호: NIER-GP2021-023	2021.6

일러두기

- 이 자료집은 살생물물질 및 살생물제품(이하 '살생물제')의 효과·효능 시험방법 등에 관하여 승인 신청자 및 평가자의 이해를 돕기 위한 작성된 자료입니다.

- 이 자료집은 현재까지의 판단에 근거한 것으로 향후 법령 등이 개정될 경우, 법률 유권해석, 정책적 판단이 변화되는 경우, 또는 새로운 과학적·기술적 사실 등에 따라 달리 적용될 수 있습니다.

- 또한 법률, 시행령, 시행규칙, 고시, 예규 등이 정하는 사항을 종합적으로 고려하여 만든 참고자료로, 관련 법령 및 상위규칙에서 정하는 내용과 다를 경우에는 법령과 상위규칙을 우선 적용합니다.

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항은 국립환경과학원 환경건강연구부 화학물질연구과로 문의 바랍니다.

+ 전화 1800-4840 + 팩스 032-568-2039

목 차

1부 • 총칙(NIER-BP-E1-001) ····· 1

2부 • 살균제류 ····· 7

1. 살균제

1.1 현탁액시험법

1.1.1 세균 (NIER-BP-E1-010) ····· 9
1.1.2 진균 (NIER-BP-E1-011) ····· 25
1.1.3 효모 (NIER-BP-E1-012) ····· 38

1.2 모의표면시험법

1.2.1 세균 (NIER-BP-E1-020) ····· 53
1.2.2 진균 (NIER-BP-E1-021) ····· 69
1.2.3 효모 (NIER-BP-E1-022) ····· 82

1부

총칙

(NIER-BP-E1-001)

살균제 - 총칙

2021

(Disinfectant - Introduction)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 효과·효능 평가를 위한 시험방법으로 「생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률」(이하 "법"이라 한다)에 따른 살생물제 승인제도의 원활한 이행을 목적으로 한다.

1.2 적용범위

살균제 제품의 효과·효능을 평가하기 위해서는 제품의 사용자 및 사용공간 등의 용도에 따라 대상 생물종을 결정하고, 제품의 적용방법에 따라 적합한 시험방법을 선택하여야 한다.

2.0 관련 용어

2.1 **멸균(Sterilization)**: 모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시키는 것을 말한다.

2.2 **소독(Disinfection)**: 물체의 표면에 있는 세균의 아포를 제외한 미생물을 사멸시키는 것이다.

2.3 **항균(Bactericide)**: 세균수 감소, 적절한 생장(growing) 조건에서 세균의 생장(growth)을 저지하는 방법이다.

2.4 **아포(Spore)**: 특정한 세균의 체내에 형성되는 원형 또는 타원형의 구조로 주로 *Bacillus*속 균과 *Clostridium*속 균에 속하는 탄저균, 파상풍균, 보툴리누스균 등이 이에 속한다. 아포는 고온, 건조, 동결, 방사선, 약품 등 물리·화학적 조건에 대해서

저항력이 강하고, 악조건 하에서도 오래 생존이 가능하여 특별한 주의가 필요하다.

2.5 **높은 수준 소독(High-level disinfection)**: 모든 미생물과 일부 세균의 아포를 사멸시킬 수 있는 것을 말한다.

2.6 **중간 수준 소독(Intermediate-level disinfection)**: 결핵균과 영양성 세균, 대부분의 바이러스와 진균을 사멸시킬 수 있으나, 아포는 사멸시키지 못하는 것을 말한다.

2.7 **낮은 수준 소독(Low-level disinfection)**: 10분 이내에 대부분의 영양성 세균과 일부 진균과 바이러스를 제거할 수 있으나 결핵균과 아포는 사멸시키지 못하는 것을 말한다.

2.8 **소독제(Disinfectant)**: 살균제의 일종으로 무생물의 표면에서 모든 병원성 미생물을 불활성화시키지만 세균의 아포에는 작용하지 못한다.

2.9 **살진균제(Fungicide)**: 진균의 생자을 억제하거나 사멸시키는 제품을 말한다.

2.10 **항곰팡이력(Fungicidal Activity)**: 효모와 곰팡이 포자 수를 감소시키는 능력이다.

2.11 **곰팡이 발육저지(Fungistatic)**: 곰팡이의 생장이 억제된 상태를 말한다.

2.12 **세균발육저지(Bacteriostatic)**: 세균의 생장이 억제된 상태를 말한다.

2.13 **무독성량(NOAEL, no observed adverse effect level)**: 각종 독성시험에서 그 시험물질을 시험생물이 섭취하여도 시험생물에 유해한 영향을 주지 않는 시험물질의 양이다.

2.14 부**착형(Adhesive)**: 밴드 또는 패치에 기피제를 적용한 후 손목 또는 발목에 착용하는 형태이다.

2.15 **정균작용(Bacteriostatic activity)**: 세균 증식을 억제하는 작용으로 그 살생물물질을 제거하면 증식이 재개되는 작용을 말한다.

2.16 **표적생물체(Target organism)**: 살생물물질/살생물제품의 기능은 제어하고자 하는 유해생물에 대한 제어작용(살균, 살충, 기피 및 유인 등)으로, 표적생물체는

제어대상이 되는 생물체를 말한다. 대표 표적생물체(representative target organism)은 표적생물체 중에서 효과·효능 시험 시, 대표성을 나타낼 수 있는 생물체를 대표 표적생물체로 구분할 수 있으며, 효과·효능 시험을 실제 시험하는 대상생물체를 시험대상생물체로 표현한다.
예) 표적생물체 - 기어다니는 곤충(crawling insects); 대표 표적생물체 - 바퀴벌레; 시험대상생물체: 독일바퀴벌레

3.0 살균제 효과·효능 평가를 위한 대표 시험대상 생물체

살균제 효과·효능 평가를 위한 대표 시험대상 생물체는 아래 표와 같으며, 시험대상 생물체는 살생물제품에 적용하는 표적생물체와 동일하거나 또는 적절한 대표 시험대상 생물체를 선택·사용하여야 한다. 아래 명시한 시험대상 생물체 이외의 생물체에 대한 시험은 사용 용도에 대한 대상 생물체의 연관성을 인정할 수 있는 과학적 근거가 뒷받침 된 경우에 한하여 인정될 수 있다.

구분	시험 대상 생물체
Bacteria (세균)	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442
	Enterococcus hirae ATCC 10541
	Escherichia coli ATCC 10536
	Escherichia coli K12 NCTC 10538
	Escherichia coli A3
	Salmonella typhimurium ATCC 13311
	Lactobacillus brevis DSM 6235
	Enterobacter cloacae DSM 6234
	Enterococcus faecium ATCC 6057
	Proteus vulgaris ATCC 13315
	Enterococcus faecium Teltow 11
	Streptococcus uberis ATCC 19436
	Legionella pneumophila ATCC 33152
	Legionella pneumophila ATCC 43108
Yeast (효모)	*Candida albicans* ATCC 10231
	Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763
	Saccharomyces cerevisiae DSM 70487

구분	시험 대상 생물체
Fungal spore(진균)	*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
Virus (바이러스)	Polio virus type 1, LSc-2ab(Picornavirus)
	Adenovirus, type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5.
	Murine Norovirus, strain S99 Berlin
	Murine Parvovirus, strain Crawford, ATCC VR-1346
	Bovine Enterovirus Type 1, ECBO - Virus ATCC VR-248
	Rotavirus ATCC VR-1546
	Enterovirus, Coxsackievirus B4 or B5
Enveloped virus (외피바이러스)	MVA = Modified Vaccinia virus Ankara ATCC VR-1508
Bacteriophage (박테리오파지)	Bacteriophage P001 DMS 4262
	Bacteriophage P008 DMS 10567
	Bacteriophage MS2 DSM 13767 or ATCC 15597-B1
	Bacteriophage PRD1 DSM 19107
	Bacteriophage PhiX174 (ΦX174) ATCC 13706-B1
Mycobacteria (항산균)	*Mycobacterium terrae* ATCC 15755
	Mycobacterium avium ATCC 15769
Bacterial spore(세균 아포)	*Bacillus cereus* ATCC 12826
	Bacillus subtilis ATCC 6633
	Clostridium sporogenes ATCC 7955
	Geobacillus stearothermophilus ATCC 12980
Endoparasite(내부기생체)	Oocysts of *Eimeria tenella* strain Houghton

4.0 시험결과의 보고

살균제류 승인 평가를 위해 제출되는 효과·효능 시험보고서에는 개요, 시험물질(제품) 및 방법, 시험대상생물종, 시험결과와 원자료(raw data), 결론 및 시험기관(시험자)의 정보 등을 포함되어야 한다. 시험물질(제품)에 대한 정보는 함량분석에 따른 조성정보를 별도 서류로서 제출하여야 한다.

시험결과는 정량적인 자료로서, 원자료를 반드시 포함하여야 한다. 반복시험이 수행된 경우, 시험결과의 편차와 함께 통계적 분석을 실시하여 시험결과의 타당성을 입증해야 한다. 효과·효능 결과와 함께 시험결과를 생산한 시험기관의 정보 및 기관수행 시험정보 등에 대한 사항을 제시하여야 한다.

2부

살균제류

1 • 살균제

1.1 현탁액시험법

1.2 모의표면시험법

살균제-현탁액 시험법-세균

2021

Disinfectant-Suspension Test Method-Bacteria

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 세균 현탁액 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

1.2.1 이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 세균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

1.2.2 살균제는 시험과정에서 80 %까지 희석되므로 시험용액의 농도는 요구되는 시험농도(실제 시험농도)의 1.25배이어야 하며, 제품 자체를 시험용액으로 사용할 경우 최고 시험농도는 80 %이다.

2.0 용어정의

2.1 생균수 감소값(율)

시험군과 대조군에 시험균주를 접종하고 배양 후 생균수를 측정하여 시험군과 대조군을 비교한 것

2.2 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등 살균제의 효력에 영향을 미칠 수 있는 물질로써, 살균제의 실제 사용 조건을 모사하기 위해 첨가함

2.3 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가하는 물질

2.4 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시키는 것

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 막여과장치

최소한 50 mL의 용액을 담을 수 있어야 하고 적합한 재질의 멸균된 여과막(지름 : (47 ~ 50) ㎜, pore size : 0.45 ㎛)을 사용하여야 한다. 진공을 사용하는 경우 균일한 여과율을 보여 미생물이 여과막 전면에 균일하게 분포될 수 있어야 하며 지나치게 장시간 여과를 하지 않도록 세척액 100 mL가 (20 ~ 40)초 사이에 여과될 수 있도록 설계되어야 한다.

3.8 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.9 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.10 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.11 메스 플라스크

3.12 루프

백금, 니크롬 또는 텅스텐으로 만든 것

3.13 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.14 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 4가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541

4.1.2 상기 표준 균주 외에 다음과 같은 시험 균주를 선택하여 추가할 수 있다.

- *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311
- *Lactobacillus brevis* DSM 6235
- *Enterobacter cloacae* DSM 6234

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.3 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제

3.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g, Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 **4.3항** 물

4.8.2 **4.6항** 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 **4.7항** 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 제형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 24 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지 또는 사면배지에 접종하여 (18 ~ 24) 시간 배양한다.

6.1.2 같은 방법으로 2차 또는 3차 배양하여 이를 활성 배양균으로 사용한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 시험관에 넣고 활성 배양균을 멸균 루프로 취하여 해당 희석액에 접종한다. 이 때 루프를 희석액에 담그고 시험관의 벽면에 문질러 균을 완전히 떨어뜨려 희석액에 혼합되도록 하고, 균질하게 섞는다.

6.2.2 희석액을 사용하여 시험 균수를 ($1.5 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$) CFU/mL로 조정하며, 흡광도 측정법이나 기타 적절한 방법을 이용하여 균수를 추정한다. 시험균주 현탁액은 시험균 활성저하를 고려하여 2시간 이내에 사용한다.

6.2.3 시험균주 현탁액 농도 측정시 생균수 계수를 위해 희석액을 사용하여 시험균주 현탁액을 단계희석한 후 2개의 배지에 주입평판법 및 도말평판법을 이용하여 배양한다.

6.2.4 접종한 배지는 배양기에서 (18 ~ 24) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다. 시험 현탁액 농도는 ($1.5 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$) CFU/mL이어야 한다.

비고 5 배양시간은 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

7.0 시험 절차

희석-중화법을 기본 시험방법으로 하며, 제시된 중화제로 중화되지 않을 경우 막-여과법으로 시험한다. 간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 희석-중화법 시험

7.1.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.3 시험군 시험관 3개와 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 6 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.1.4 항온수조에 유지 후 시험군은 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 대조군은 시험용액 대신 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 7 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 8 반응 시간은 5분 ± 10초(일반) 를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 15분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군의 혼합용액 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 1.0 mL 물을 포함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 (10 ± 1) 초간 유지한다. 반응 시간이 10분 초과인 경우 5분 ± 10초간 유지한다.

7.1.6 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다..

7.1.7 접종한 배지는 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

7.2 막-여과법 시험

7.2.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.2.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치에 혼합용액 0.1 mL를 각각 넣고 여과한다. 혼합용액을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척하고, 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물

200 mL로 세척한다). 세척한 막을 고체 배지에 옮겨 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양한다.

7.2.3 1.0 mL의 4.5항 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 6.2.2항 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 9 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.2.4 유지 후 5.1항 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 시험 대조군은 시험 용액 대신 4.4항 경수(바로 사용하는 제품은 4.3항 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 10 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 11 시험 시간은 5분 ± 10초(일반) 또는 1분 ± 5초(손 소독제)를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 15분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군 혼합물 0.1 mL를 2번 취하여 각각 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치로 여과한다. 혼합물을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척한 후 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물 200 mL로 세척한다).

7.2.6 세척한 막을 고체 배지에 옮겨 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관 1개를 준비하여 1.0 mL의 4.5항 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 4.6항 희석액과 5.1항 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 반응

시간 종료 직전 다시 혼합한 후 즉시 혼합용액 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 0.9 mL 물을 포함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 (10 ± 1) 초간 유지한다. 반응 시간이 10분 초과인 경우 5분 ± 10초간 유지한다. 중화 후, 6.2.2항 시험균주 현탁액 0.1 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양하며, 총 생균수 확인은 7.1.7항에 따라 확인한다. 중화효능 유효성 확인 농도는 (1.0×10^6) CFU/mL 이상이어야 한다.

비고 12 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다. 중화 온도는 (20 ± 1) ℃이다.

8.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도는 (1.5×10^7 ~ 5.0×10^7) CFU/mL 이내이어야 하며, 시험 대조군 농도는 (1.0×10^6) CFU/mL 이상이어야 한다.

9.0 결과 계산 및 표현

9.1 결과 계산

9.1.1 시험 결과는 희석배수를 고려하여 CFU/mL로 환산하며, 균 농도는 다음과 같이 계산한다. 단, 유효 숫자 2자리까지 표시한다.

$$N = C \times D$$

N : 균 농도(CFU/mL)
C : 2개 배양접시 평균 생균수(CFU/mL)
D : 희석배수

비고 13 혼합물 원액의 배양접시를 계수했을 때, 집락이 없는 경우, 균농도는 '< 1' 로 표기한 후, 생균수 감소값(율) 계산에 사용하는 수는 '1'이 된다.

9.1.2 3회 반복시험에서 시험균 및 대조군의 유효한 시험 성립 조건은 다음과 같다.

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} \leq 0.2$$

L_{max} : 최대 균수의 로그 값
L_{min} : 최소 균수의 로그 값
L_{maen} : 평균 균수의 로그 값

9.1.3 생균수 감소값과 감소율은 다음과 같이 계산한다.

[생균수 감소값]

$$\log R = \log N_t - \log N_a$$

[생균수 감소율]

$$감소율(\%) = \frac{N_t - N_a}{N_t} \times 100$$

R : 생균수 감소값
N_t : 3회 대조군 평균 농도(CFU/mL)
N_a : 3회 시험군 평균 농도(CFU/mL)

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 로그 감소값으로 표기된다. 감소율(%) 추가 표기도 가능하다.

9.2.2 로그 감소값으로 표기되는 시험결과는 소수점 둘째자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기한다. 감소율(%)로 표기되는 시험결과는 소수점 셋째자리까지 표기가능하며 이하는 버림한다.

9.2.3 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.4 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

9.2.5 막-여과법 사용 시, 여과 시간이 1분이 넘어갈 경우 여과 시간을 기입한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 EN 1276:2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.5 JIS Z 2801:2012. Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy. (2012).

10.6 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.7 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 15442	37	TSA
	Escherichia coli	ATCC 10536	37	NA
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538	37	TSA
	Enterococcus hirae	ATCC 10541	37	BHIA
추가 균주	*Salmonella Typhimurium*	ATCC 13311	37	NA
	Lactobacillus brevis	DSM 6235	30	LMA
	Enterobacter cloacae	DSM 6234	30	NA
	기타 균주		분양정보에 따름	

※ TSA : Tryptic Soybean Agar

TSA 조성	용량	TSA 조성	용량
Tryptone	17 g	K_2HPO_4	2.5 g
Soytone	3 g	Agar	15 g
Dextrose	2.5 g	DI Water	1,000 mL
NaCl	5.0 g		

※ NA : Nutrient Agar

NA 조성	용량	NA 조성	용량
Beef Extract	3.0 g	Agar	15.0 g
Peptone	5.0 g	DI Water	1,000 mL

※ BHIA : Brain Heart Infusion Agar

BHIA 조성	용량	BHIA 조성	용량
Calf Brains, infusion from	200 g	NaCl	5.0 g
Beef Hearts, infusion from	250 g	Na_2HPO_4	2.5 g
Proteose Peptone	10.0 g	Agar	15 g
Dextrose	2.0 g	DI Water	1,000 mL

※ LMA : Lactobacilli MRS Agar

NA 조성	용량	NA 조성	용량
Proteose Peptone	10.0 g	Sodium acetate	5.0 g
Beef extract	10.0 g	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05 g
Yeast extract	5.0 g	Na_2HPO_4	2.0 g
Dextrose	20.0 g	Agar	15.0 g
Sorbitan monooleate	1.0 g	DI Water	1,000 mL
Ammonium citrate	2.0 g		

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

표 3. 시험 결과 예시

<생균수 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과					
		반복 횟수	생균수 [CFU]	평균값 [CFU]	희석 배수	균 농도 [CFU/mL]	평균값 [CFU/mL]
녹농균	대조군	1회	164	162	10^4	1.6×10^6	1.6×10^7
			160				
		2회	173	170	10^4	1.7×10^6	
			168				
		3회	165	164	10^4	1.6×10^6	
			162				
	액상 살균제	1회	< 1	< 1	1	1	1
			< 1				
		2회	< 1	< 1	1	1	
			< 1				
		3회	< 1	< 1	1	1	
			< 1				

<감소율 계산 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과		
		반응 후 농도	로그 감소값	감소율[%]
녹농균	대조군	1.6×10^6	-	-
	액상 살균제	1	6.2	99.999

<반복시험 유효성 확인>

시험 항목		시험 결과
녹농균	대조군	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{(1.7 \times 10^6) - (1.6 \times 10^6)}{1.6 \times 10^6} = 0.062 \leq 0.2$
	액상 살균제	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{1-1}{1} = 0 \leq 0.2$

※ 사용 균주 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
※ 시험 현탁액 농도 : 1.8×10^8 CFU/mL
※ 접종 직후 초기 대조군 농도 : 1.6×10^7 CFU/mL
※ 중화효능 유효성 확인 농도 : 1.1×10^6 CFU/mL
※ 시험 조건
시험용액 농도 80 %(원액); 온도 (20 ± 1) ℃; 반응 5분 ± 10초; 청정 조건(0.3 g/L BSA)
※ 배양 조건
온도 (37 ± 1) ℃, 24시간 배양

살균제-현탁액 시험법-진균

2021

Disinfectant-Suspension Test Method-Fungi

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 진균 현탁액 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

1.2.1 이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 진균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

1.2.2 살균제는 시험과정에서 80 %까지 희석되므로 시험용액의 농도는 요구되는 시험농도(실제 시험농도)의 1.25배이어야 하며, 제품 자체를 시험용액으로 사용할 경우 최고 시험농도는 80 %이다.

2.0 용어정의

2.1 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등 살균제의 효력에 영향을 미칠 수 있는 물질로써, 살균제의 실제 사용 조건을 모사하기 위해 첨가함

2.2 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가하는 물질

2.3 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시킴

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 막여과장치

최소한 50 mL의 용액을 담을 수 있어야 하고 적합한 재질의 멸균된 여과막(지름 : (47 ~ 50) ㎜, pore size : 0.45 ㎛)을 사용하여야 한다. 진공을 사용하는 경우 균일한 여과율을 보여 미생물이 여과막 전면에 균일하게 분포될 수 있어야 하며 지나치게 장시간 여과를

하지 않도록 세척액 100 mL가 (20 ~ 40)초 사이에 여과될 수 있도록 설계되어야 한다.

3.8 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.9 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.10 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.11 메스 플라스크

3.12 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.13 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

3.14 Hemocytometer

진균 포자를 계수할 때 사용

3.15 광학현미경

3.16 필터 페이퍼

pore size 5 ㎛ 의 필터 페이퍼

3.17 원심분리기

3.18 유리비드

균사체에서 포자를 분리하기 위해 사용

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 1가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.3 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제

3.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g, Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 **4.3항** 물

4.8.2 **4.6항** 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 **4.7항** 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 제형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 24 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지에 접종하여 5일 동안 배양한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 활성 배양균 표면에 고루 도포하여 유리막대로 균사체를 배지로부터 분리한다.

6.2.2 분리한 균사체를 멸균된 유리비드 5 g이 들어 있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 균질하게 현탁하여 균사체에서 포자를 분리한다.

6.2.3 균질하게 혼합한 희석액을 멸균된 필터 페이퍼에 균사체 및 한천배지를 걸러 포자로 구성된 시험 현탁액을 제조한다.

6.2.4 포자 시험 현탁액을 원심분리하여 상층액 제거 후 희석액으로 재현탁하고, Hemocytometer로 측정한 포자 농도가 (1.0×10^7 ~ 9.0×10^7) spores/mL이 되도록 제조한다.

7.0 시험 절차

희석-중화법을 기본 시험방법으로 하며, 제시된 중화제로 중화되지 않을 경우 막-여과법으로 시험한다. 간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 희석-중화법 시험

7.1.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합물을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.3 시험군 시험관 3개와 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 5 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.1.4 항온수조에 유지 후 시험군은 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 대조군은 시험용액 대신 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 6 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 7 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 5분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군의 혼합용액 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 1.0 mL 물을 포함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다. 반응 시간이 10분 이하인 경우 (10 ± 1) 초간 유지한다.

7.1.6 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.7 접종한 배지는 배양기에서 5일 동안 배양한다.

7.2 막-여과법 시험

7.2.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.2.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치에 혼합용액 0.1 mL를 각각 넣고 여과한다. 혼합용액을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척하고, 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물 200 mL로 세척한다). 세척한 막을 고체 배지에 옮겨 배양기에서 5일 동안 배양한다.

7.2.3 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 8 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.2.4 유지 후 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조

절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 시험 대조군은 시험 용액 대신 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 9 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 10 시험 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 5분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군 혼합물 0.1 mL를 2번 취하여 각각 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치로 여과한다. 혼합물을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척한 후 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물 200 mL로 세척한다).

7.2.6 세척한 막을 고체 배지에 옮겨 배양기에서 5일 동안 배양한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관 1개를 준비하여 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **4.6항** 희석액과 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한 후 즉시 혼합물 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 0.9 mL 물을 포함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다. 반응 시간이 10분 이하인 경우 (10 ± 1) 초간 유지한다. 중화 후, **6.2.2항** 시험균주 현탁액 0.1 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 5일 동안 배양한다.

비고 11 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다. 중화 온도는 (20 ± 1) ℃이다.

8.1.2 대조군 3회 반복시험 결과는 모두 '증식'이여야 한다.

8.1.3 시험군 3회 반복시험 결과, 불일치(예; '증식', '미증식', '미증식')하는 경우 재시험을 진행한다.

9.0 결과 판정 및 표현

9.1 결과 판정

9.1.1 배양접시 균 성장 여부에 따라 균이 성장할 경우 '증식', 균이 성장하지 않은 경우 '미증식'으로 판정한다.

비고 12 '미증식'일 경우, 초기 접종 포자 농도를 적용할 시 진균 감소값은 '5 log'에 해당된다.

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 '증식' 또는 '미증식'으로 표기한다.

9.2.2 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.3 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

9.2.4 막-여과법 사용 시, 여과 시간이 1분이 넘어갈 경우 여과 시간을 기입한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 ASTM G21-15. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. 1 - 6. ASTM International. (2015).

10.5 EN 1276:2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.6 ISO 846:2019. Plastics-Evaluation of the action of microorganisms. 1 - 26. International Organization for Standardization. (2019).

10.7 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.8 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Aspergillus brasiliensis*	ATCC 16404	25	PDA
추가 균주	기타 균주		분양정보에 따름	

※ PDA : Potato Dextrose Agar

TSA 조성	용량	TSA 조성	용량
Diced potatoes	300.0 g	Agar	15.0 g
Glucose	20.0 g	DI Water	1,000 mL

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

살균제-현탁액 시험법-효모

2021

Disinfectant-Suspension Test Method-Yeast

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 효모 현탁액 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

1.2.1 이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 효모균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

1.2.2 살균제는 시험과정에서 80 %까지 희석되므로 시험용액의 농도는 요구되는 시험농도(실제 시험농도)의 1.25배이어야 하며, 제품 자체를 시험용액으로 사용할 경우 최고 시험농도는 80 %이다.

2.0 용어정의

2.1 생균수 감소값(율)

시험군과 대조군에 시험균주를 접종하고 배양 후 생균수를 측정하여 시험군과 대조군을 비교한 것

2.2 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등으로 살균제의 실제 사용조건을 모사하기 위해 첨가함

2.3 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가함

2.4 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시킴

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 막여과장치

최소한 50 mL의 용액을 담을 수 있어야 하고 적합한 여과막(지름 : (47 ~ 50) ㎜, pore size : 0.45 ㎛)을 사용하여야 한다. 진공을 사용하는 경우 균일한 여과율을 보여 미생물이 여과막 전면에 균일하게 분포될 수 있어야 하며 지나치게 장시간 여과를 하지 않도록 세척액 100 mL가 (20 ~ 40)초 사이에 여과될 수 있도록 설계되어야 한다.

3.8 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.9 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.10 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.11 메스 플라스크

3.12 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.13 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 1가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.
- *Candida albicans* ATCC 10231

4.1.2 상기 표준 균주 외에 다음과 같은 시험 균주를 선택하여 추가할 수 있다.
- *Saccharomyces cerevisiae* DSM 1333
- *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* DSM 70487

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.3 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제
3.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 100 mL에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g, Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 **4.3항** 물

4.8.2 **4.6항** 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 **4.7항** 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 제형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 24 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지 또는 사면배지에 접종하여 (42 ~ 48) 시간 배양한다.

6.1.2 같은 방법으로 2차 또는 3차 배양하여 이를 활성 배양균으로 사용한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 시험관에 넣고 활성 배양균을 백금이로 취하여 해당 희석액에 접종한다. 이 때 백금이를 희석액에 담그고 시험관의 벽면에 문질러 균을 완전히 떨어뜨려 희석액에 혼합되도록 하고, 균질하게 섞는다.

6.2.2 희석액을 사용하여 시험 균수를 ($1.5 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$) CFU/mL로 조정하며, 흡광도 측정법이나 기타 적절한 방법을 이용하여 균수를 추정한다. 시험균주 현탁액은 시험균 활성저하를 고려하여 2시간 이내에 사용한다.

6.2.3 시험균주 현탁액 농도 측정시 생균수 계수를 위해 희석액을 사용하여 시험균주 현탁액을 단계희석한 후 2개의 배지에 주입평판법 및 도말평판법을 이용하여 배양한다.

6.2.4 접종한 배지는 배양기에서 (20 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다. 시험 현탁액 농도는 ($1.5 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$) CFU/mL이어야 한다.

비고 5 배양시간은 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

7.0 시험 절차

희석-중화법을 기본 시험방법으로 하며, 제시된 중화제로 중화되지 않을 경우 막-여과법으로 시험한다. 간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 희석-중화법 시험

7.1.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합물을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.3 시험군 시험관 3개와 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 6 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.1.4 항온수조에 유지 후 시험군은 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 대조군은 시험용액 대신 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 7 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 8 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 5분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군의 혼합용액 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 1.0 mL 물을 포함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다. 반응 시간이 10분 이하인 경우 (10 ± 1) 초간 유지한다.

7.1.6 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.7 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

7.2 막-여과법 시험

7.2.1 시험을 위한 시험관을 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 대조군으로 사용한다.

7.2.2 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 대조군 시험관 3개에 각각 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액과 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용) 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치에 혼합용액 0.1 mL를 각각 넣고 여과한다. 혼합용액을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척하고, 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물 200 mL로 세척한다). 세척한 막을 고체 배지에

옮겨 배양기에서 (20 ~ 24) 시간 동안 배양한다.

7.2.3 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

비고 9 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

7.2.4 유지 후 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 시험 시간 종료 직전 다시 혼합한다. 시험 대조군은 시험 용액 대신 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 첨가하여 혼합한다.

비고 10 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 11 시험 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 5초, 5분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.5 시험 시간의 종료 시, 즉시 시험군 및 대조군 혼합물 0.1 mL를 2번 취하여 각각 세척액 50 mL로 채워진 2개의 막여과장치로 여과한다. 혼합물을 여과한 직후 세척액 150 mL로 세척한 후 물 50 mL로 추가 세척한다(물로 세척하는 경우, 물 200 mL로 세척한다).

7.2.6 세척한 막을 고체 배지에 옮겨 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관 1개를 준비하여 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 시험관에 분주한 후 1.0 mL의 **4.6항** 희석액과 **5.1항** 시험 용액 8.0 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 반응 시간 종료 직전 다시 혼합한 후 즉시 혼합용액 1.0 mL를 8.0 mL 중화제와 0.9 mL 물을 포

함한 시험관으로 옮긴다. 혼합하고 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다. 반응 시간이 10분 이하인 경우 (10 ± 1) 초간 유지한다. 중화 후, 6.2.2항 시험균주 현탁액 0.1 mL를 첨가하여 혼합한다. 혼합 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합물을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양하며, 총 생균수 확인은 7.1.7항에 따라 확인한다. 중화효능 유효성 확인 농도는 (1.0×10^5) CFU/mL 이상이어야 한다.

비고 12 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다. 중화 온도는 (20 ± 1) ℃이다.

8.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도는 (1.5×10^6 ~ 5.0×10^6) CFU/mL 이내이어야 하며, 시험 대조군 농도는 (1.0×10^5) CFU/mL 이상이어야 한다.

9.0 결과 계산 및 표현

9.1 결과 계산

9.1.1 시험 결과는 희석배수를 고려하여 CFU/mL로 환산하며, 균 농도는 다음과 같이 계산한다. 단, 유효 숫자 2자리까지 표시한다.

$$N = C \times D$$

N : 균 농도(CFU/mL)
C : 2개 배양접시 평균 생균수(CFU/mL)
D : 희석배수

비고 12 혼합물 원액의 배양접시를 계수했을 때, 집락이 없는 경우, 균농도는 ‘< 1’ 로 표기한 후, 생균수 감소값(율) 계산에 사용하는 수는 ‘1’이 된다.

9.1.2 3회 반복시험에서 시험균 및 대조군의 유효한 시험 성립 조건은 다음과 같다.

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} \leq 0.2$$

L_{max} : 최대 균수의 로그 값
L_{min} : 최소 균수의 로그 값
L_{maen} : 평균 균수의 로그 값

9.1.3 생균수 감소값과 감소율은 다음과 같이 계산한다.

[생균수 감소값]

$$\log R = \log N_t - \log N_a$$

[생균수 감소율]

$$감소율(\%) = \frac{N_t - N_a}{N_t} \times 100$$

R : 생균수 감소값
N_t : 3회 대조군 평균 농도(CFU/mL)
N_a : 3회 시험군 평균 농도(CFU/mL)

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 로그 감소값으로 표기된다. 감소율(%) 추가 표기도 가능하다.

9.2.2 로그감소값으로 표기되는 시험결과는 소수점 둘째자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기한다. 감소율(%)로 표기되는 시험결과는 소수점 셋째자리까지 표기가능하며 이하는 버림한다.

9.2.3 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.4 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

9.2.5 막-여과법 사용 시, 여과 시간이 1분이 넘어갈 경우 여과 시간을 기입한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 EN 1276:2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.5 JIS Z 2801:2012. Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy. (2012).

10.6 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.7 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Candida albicans*	ATCC 10231	24 ~ 26	YMA
추가 균주	*Saccharomyces cerevisiae*	DSM 1333	25	YMA
	Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus	DSM 70487	25	YMA
	기타 균주		분양정보에 따름	

※ YMA : YM Agar

YMA 조성	용량		YMA 조성	용량	
Yeast Extract	3.0	g	Peptone	5.0	g
Malt Extract	3.0	g	Agar	20.0	g
Dextrose	10.0	g	DI Water	1,000	mL

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

표 3. 시험 결과 예시

<생균수 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과					
		반복 횟수	생균수 [CFU]	평균값 [CFU]	희석 배수	균 농도 [CFU/mL]	평균값 [CFU/mL]
칸디다균	대조군	1회	164	162	10^4	1.6×10^6	1.6×10^6
			160				
		2회	173	170	10^4	1.7×10^6	
			168				
		3회	165	164	10^4	1.6×10^6	
			162				
	액상 살균제	1회	< 1	< 1	1	1	1
			< 1				
		2회	< 1	< 1	1	1	
			< 1				
		3회	< 1	< 1	1	1	
			< 1				

<감소율 계산 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과		
		반응 후 농도	로그 감소값	감소율[%]
칸디다균	대조군	1.6×10^5	-	-
	액상 살균제	1	5.2	99.999

<반복시험 유효성 확인>

시험 항목		시험 결과
칸디다균	대조군	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{(1.7 \times 10^5) - (1.6 \times 10^5)}{1.6 \times 10^5} = 0.062 \leq 0.2$
	액상 살균제	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{1-1}{1} = 0 \leq 0.2$

※ 사용 균주 : *Candida albicans* ATCC 10231
※ 시험 현탁액 농도 : 1.8×10^7 CFU/mL
※ 접종 직후 초기 대조군 농도 : 1.6×10^6 CFU/mL
※ 중화효능 유효성 확인 농도 : 1.1×10^5 CFU/mL
※ 시험 조건
시험용액 농도 80 %(원액); 온도 (20 ± 1) ℃; 반응 15분 ± 10초; 청정 조건(0.3 g/L BSA)
※ 배양 조건
온도 (25 ± 1) ℃, 24시간 배양

살균제-모의표면 시험법-세균

2021

Disinfectant-Simulated Surface Test Method-Bacteria

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 세균 모의표면 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 세균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

2.0 용어정의

2.1 생균수 감소값(율)

시험군과 대조군에 시험균주를 접종하고 배양 후 생균수를 측정하여 시험군과 대조군을 비교한 것

2.2 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등 살균제의 효력에 영향을 미칠 수 있는 물질로써, 살균제의 실제 사용 조건을 모사하기 위해 첨가함

2.3 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가하는 물질

2.4 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시키는 것

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.8 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.9 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.10 비다공성 담체(Carrier)

양면이 2b 등급인 평평한 표면의 직경 2 cm의 스테인리스 304 원반을 사용

3.11 다공성 담체(Carrier)

직경 1 cm의 페이퍼 디스크(항생물질검정용 여지)를 사용

3.12 메스 플라스크

3.13 루프

백금, 니크롬 또는 텅스텐으로 만든 것

3.14 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.15 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 4가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541

4.1.2 상기 표준 균주 외에 다음과 같은 시험 균주를 선택하여 추가할 수 있다.

- *Escherichia coli* K12 NCTC 10538
- *Enterococcus faecium* ATCC 6057
- *Legionella pneumophila* ATCC 33152
- *Proteus vulgaris* ATCC 13315

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.6 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제

6.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g,

Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 **4.3항** 물

4.8.2 **4.6항** 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 **4.7항** 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 재형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 5 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지 또는 사면배지에 접종하여 (18 ~ 24) 시간 배양한다.

6.1.2 같은 방법으로 2차 또는 3차 배양하여 이를 활성 배양균으로 사용한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 시험관에 넣고 활성 배양균을 멸균 루프로 취하여 해당 희석액에 접종한다. 이 때 루프를 희석액에 담그고 시험관의 벽면에 문질러 균을 완전히 떨어뜨려 희석액에 혼합되도록 하고, 균질하게 섞는다.

6.2.2 희석액을 사용하여 시험 균수를 ($1.5 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$) CFU/mL로 조정하며, 흡광도 측정법이나 기타 적절한 방법을 이용하여 균수를 추정한다. 시험균주 현탁액은 시험균 활성저하를 고려하여 2시간 이내에 사용한다.

6.2.3 시험균주 현탁액 농도 측정시 생균수 계수를 위해 희석액을 사용하여 시험균주 현탁액을 단계희석한 후 2개의 배지에 주입평판법 및 도말평판법을 이용하여 배양한다.

6.2.4 접종한 배지는 배양기에서 (18 ~ 24) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다. 시험 현탁액 농도는 ($1.5 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$) CFU/mL이어야 한다.

비고 5 배양시간은 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

7.0 시험 절차

간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 비다공성 모의표면 시험법

7.1.1 시험을 위한 비다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 6 비다공성 담체(Carrier)는 다음과 같이 세척·살균한다. 1) 5 % V/V Decon®이 최소한 20 mL 이상 들어있는 비커(최소크기: 50 mL)에 담근다. 2) 60분 후 흐르는 증류수에 10초 동안 세척한다. 표면이 건조해서는 안 된다. 3) 표면의 계면활성제를 충분히 제거하기 위해 원반을 물로 10초 동안 다시 세척한다.(물의 흐름을 충분히 하기 위해서, 적절한 호스와 연결 장치 또는 다른 방법을 사용하여 분당 2 L의 멸균된 물을 공급하도록 관의 수압이 유지되도록 조절) 4) 원반을 70 % 이소프로판올이 들어있는 수조에 15분 동안 놓아둔다. 5) 원반을 꺼내고 생물안전작업대 내에서 증발시켜 건조시킨다.

7.1.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.1.3 멸균 배양접시에 비다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 비다공성 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가

확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.1.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.5 시험군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 5분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 5분 ± 10초간 유지한다.

비고 7 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 8 반응 시간은 5분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 15분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.1.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.8 접종한 배지는 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

7.2 다공성 모의표면 시험법

7.2.1 시험을 위한 다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 9 다공성 담체(Carrier)는 고압증기멸균기로 멸균하여 사용한다.

7.2.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.2.3 멸균 배양접시에 다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.2.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 다공성 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.2.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.5 시험군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 5분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

비고 10 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 11 반응 시간은 5분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 15분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.2.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.8 접종한 배지는 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다. 멸균 배양접시에 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다. 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 0.1 mL **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다. 중화한 시험관에 표면균 담체(Carrier) 1개를 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 (40 ~ 48) 시간 동안 배양하며, 총 생균수 확인은 **7.1.7항**에 따라 확인한다. 중화효능 유효성 확인 농도는 (1.0×10^5) CFU/carrier 이상이어야 한다.

비고 12 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다. 중화 온도는 (20 ± 1) ℃이다.

8.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도는 (1.5×10^5) CFU/carrier 이상이어야 하며, 시험 대조군 농도는 (1.0×10^5) CFU/carrier 이상이어야 한다.

9.0 결과 계산 및 표현

9.1 결과 계산

9.1.1 시험 결과는 희석배수를 고려하여 CFU/carrier로 환산하며, 균 농도는 다음과 같이 계산한다. 단, 유효 숫자 2자리까지 표시한다.

$$N = C \times D$$

N : 균 농도(CFU/carrier)

C : 2개 배양접시 평균 생균수(CFU/carrier)

D : 희석배수

비고 13 혼합물 원액의 배양접시를 계수했을 때, 집락이 없는 경우, 균농도는 '< 10' 로 표기한 후, 생균수 감소값(율) 계산에 사용하는 수는 '10'이 된다.

9.1.2 3회 반복시험에서 시험군 및 대조군의 유효한 시험 성립 조건은 다음과 같다.

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} \leq 0.2$$

L_{max} : 최대 균수의 로그 값

L_{min} : 최소 균수의 로그 값

L_{maen} : 평균 균수의 로그 값

9.1.3 생균수 감소값과 감소율은 다음과 같이 계산한다.

[생균수 감소값]

$$\log R = \log N_t - \log N_a$$

[생균수 감소율]

$$\text{감소율}(\%) = \frac{N_t - N_a}{N_t} \times 100$$

R : 생균수 감소값

N_t : 3회 대조군 평균 농도(CFU/carrier)

N_a : 3회 시험군 평균 농도(CFU/carrier)

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 로그 감소값으로 표기된다. 감소율(%) 추가 표기도 가능하다.

9.2.2 로그 감소값으로 표기되는 시험결과는 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기한다. 감소율(%)로 표기되는 시험결과는 소수점 둘째 자리까지 표기 가능하며 이하는 버림한다.

9.2.3 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.4 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 ASTM E2197-17. Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal, And Sporicical Activities of Chemicals (2017)

10.5 EN 1276 : 2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.6 DIN EN 13697 : 2015-06. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements without mechanical action(phase 2, step 2)(2015)

10.7 JIS Z 2801:2012. Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy. (2012).

10.8 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.9 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 15442	37	TSA
	Escherichia coli	ATCC 10536	37	NA
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538	37	TSA
	Enterococcus hirae	ATCC 10541	37	BHIA
추가 균주	*Escherichia coli* K12	NCTC 10538	37	NA
	Enterococcus faecium	ATCC 6057	37	BHIA
	Legionella pneumophila	ATCC 33152	37	CYEBA
	Proteus vulgaris	ATCC 13315	37	TSA
	기타 균주		분양정보에 따름	

※ TSA : Tryptic Soybean Agar

TSA 조성	용량	TSA 조성	용량
Tryptone	17 g	K_2HPO_4	2.5 g
Soytone	3 g	Agar	15 g
Dextrose	2.5 g	DI Water	1,000 mL
NaCl	5.0 g		

※ NA : Nutrient Agar

NA 조성	용량	NA 조성	용량
Beef Extract	3.0 g	Agar	15.0 g
Peptone	5.0 g	DI Water	1,000 mL

※ BHIA : Brain Heart Infusion Agar

BHIA 조성	용량	BHIA 조성	용량
Calf Brains, infusion from	200 g	NaCl	5.0 g
Beef Hearts, infusion from	250 g	Na_2HPO_4	2.5 g
Proteose Peptone	10.0 g	Agar	15 g
Dextrose	2.0 g	DI Water	1,000 mL

※ CYEBA : CYE Buffered Agar(+ 50 ℃에서 Solution A, B 첨가)

CYEBA 조성	용량	CYEBA 조성	용량
Yeast Extract	10.0 g	Agar	15 g
Charcoal	2.0 g	DI Water	980.0 mL
ACES Buffer	10.0 g		

Solution A 조성	용량	Solution B 조성	용량
L-Cysteine HCl	0.4 g	Fe-pyrophosphate	0.25 g
DI Water	10.0 mL	DI Water	10.0 mL

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

표 3. 시험 결과 예시

<생균수 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과					
		반복 횟수	생균수 [CFU]	평균값 [CFU]	희석 배수	균 농도 [CFU /carrier]	평균값 [CFU /carrier]
녹농균	대조군	1회	164	162	10^3	1.6×10^5	1.6×10^5
			160				
		2회	173	170	10^3	1.7×10^5	
			168				
		3회	165	164	10^3	1.6×10^5	
			162				
	액상 살균제	1회	< 10	< 10	10	10	10
			< 10				
		2회	< 10	< 10	10	10	
			< 10				
		3회	< 10	< 10	10	10	
			< 10				

<감소율 계산 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과		
		반응 후 농도	로그 감소값	감소율[%]
녹농균	대조군	1.6×10^5	-	-
	액상 살균제	10	4.2	99.99

<반복시험 유효성 확인>

시험 항목		시험 결과
녹농균	대조군	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{(1.7 \times 10^5) - (1.6 \times 10^5)}{1.6 \times 10^5} = 0.062 \leq 0.2$
	액상 살균제	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{10-10}{10} = 0 \leq 0.2$

※ 사용 균주 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
※ 담체(Carrier) : Stainless steel disc 304
※ 시험 현탁액 농도 : 1.8×10^8 CFU/carrier
※ 접종 직후 초기 대조군 농도 : 1.6×10^5 CFU/carrier
※ 중화효능 유효성 확인 농도 : 1.1×10^5 CFU/carrier
※ 시험 조건
시험용액 농도 100 %(원액); 온도 (20 ± 1) ℃; 반응 5분 ± 10초; 청정 조건(0.3 g/L BSA)
※ 배양 조건
온도 (37 ± 1) ℃, 24시간 배양

살균제-모의표면 시험법-진균

2021

Disinfectant-Simulated Surface Test Method-Fungi

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 진균 모의표면 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 진균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

2.0 용어정의

2.1 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등 살균제의 효력에 영향을 미칠 수 있는 물질로써, 살균제의 실제 사용 조건을 모사하기 위해 첨가함

2.2 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가하는 물질

2.3 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시킴

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.8 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.9 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.10 메스 플라스크

3.11 비다공성 담체(Carrier)

양면이 2b 등급인 평평한 표면의 직경 2 cm의 스테인리스 304 원반을 사용

3.12 다공성 담체(Carrier)

직경 1 cm의 페이퍼 디스크(항생물질검정용 여지)를 사용

3.13 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.14 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

3.15 Hemocytometer

진균 포자를 계수할 때 사용

3.16 광학현미경

3.17 필터 페이퍼

pore size 5 ㎛ 의 필터 페이퍼

3.18 원심분리기

3.19 유리비드

균사체에서 포자를 분리하기 위해 사용

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 1가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.6 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제

6.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g, Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 **4.3항** 물

4.8.2 **4.6항** 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 **4.7항** 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 제형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 5 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지에 접종하여 5일 동안 배양한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 활성 배양균 표면에 고루 도포하여 유리막대로 균사체를 배지로부터 분리한다.

6.2.2 분리한 균사체를 멸균된 유리비드 5 g이 들어 있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 균질하게 현탁하여 균사체에서 포자를 분리한다.

6.2.3 균질하게 혼합한 희석액을 멸균된 유리솜 또는 필터에 균사체 및 한천배지를 걸러 포자로 구성된 시험 현탁액을 제조한다.

6.2.4 포자 시험 현탁액을 원심분리하여 상층액 제거 후 희석액으로 재현탁하고, Hemocytometer로 측정한 포자 농도가 (1.0×10^7 ~ 9.0×10^7) spores/mL이 되도록 제조한다.

7.0 시험 절차

간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 비다공성 모의표면 시험법

7.1.1 시험을 위한 비다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 5 비다공성 담체(Carrier)는 다음과 같이 세척·살균한다. 1) 5 % V/V Decon®이 최소한 20 mL 이상 들어있는 비커(최소크기: 50 mL)에 담근다. 2) 60분 후 흐르는 증류수에 10초 동안 세척한다. 표면이 건조해서는 안 된다. 3) 표면의 계면활성제를 충분히 제거하기 위해 원반을 물로 10초 동안 다시 세척한다.(물의 흐름을 충분히 하기 위해서, 적절한 호스와 연결 장치 또는 다른 방법을 사용하여 분당 2 L의 멸균된 물을 공급하도록 관의 수압이 유지되도록 조절) 4) 원반을 70 % 이소프로판올이 들어있는 수조에 15분 동안 놓아둔다. 5) 원반을 꺼내고 생물안전작업대 내에서 증발시켜 건조시킨다.

7.1.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.1.3 멸균 배양접시에 비다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 비다공성 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.1.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여

2개 배양접시에 접종한다.

7.1.5 시험군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다.

비고 6 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 7 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.1.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.8 접종한 배지는 배양기에서 5일 동안 배양한다.

7.2 다공성 모의표면 시험법

7.2.1 시험을 위한 다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 8 시험 표면은 고압증기멸균기로 멸균하여 사용한다.

7.2.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.2.3 멸균 배양접시에 다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.2.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 다공성 표면균 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될

때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.2.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.5 시험군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다.

비고 9 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 10 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.2.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.8 접종한 배지는 배양기에서 5일 동안 배양한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다. 멸균 배양접시에 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로

건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다. 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 0.1 mL **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초간 유지한다. 중화한 시험관에 표면균 담체(Carrier) 1개를 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 5일 동안 배양한다.

비고 11 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

8.1.2 대조군 3회 반복시험 결과는 모두 '증식'이여야 한다.

8.1.3 시험군 3회 반복시험 결과, 불일치(예; '증식', '미증식', '미증식')하는 경우 재시험을 진행한다.

9.0 결과 판정 및 표현

9.1 결과 판정

9.1.1 배양접시 균 성장 여부에 따라 균이 성장할 경우 '증식', 균이 성장하지 않은 경우 '미증식'으로 판정한다.

비고 12 '미증식'일 경우, 초기 접종 포자 농도를 적용할 시 진균 감소값은 '4 log'에 해당된다.

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 '증식' 또는 '미증식'으로 표기한다.

9.2.2 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.3 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 ASTM G21-15. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. 1 - 6. ASTM International. (2015).

10.5 ASTM E2197-17. Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal, And Sporicical Activities of Chemicals (2017)

10.6 EN 1276:2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.7 DIN EN 13697 : 2015-06. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements without mechanical action(phase 2, step 2)(2015)

10.8 ISO 846:2019. Plastics-Evaluation of the action of microorganisms. 1 - 26. International Organization for Standardization. (2019).

10.9 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.10 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Aspergillus brasiliensis*	ATCC 16404	25	PDA
추가 균주	기타 균주		분양정보에 따름	

※ PDA : Potato Dextrose Agar

TSA 조성	용량	TSA 조성	용량
Diced potatoes	300.0 g	Agar	15.0 g
Glucose	20.0 g	DI Water	1,000 mL

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

살균제-모의표면 시험법-효모

2021

Disinfectant-Simulated Surface Test Method-Yeast

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 살균제의 효모 모의표면 대상 살균 효과·효능을 평가하는 방법이다.

1.2 적용 범위

이 시험방법은 가정, 사무실, 다중이용시설 등 일상적인 생활공간 또는 그 밖의 공간에서 사용하는 살균제를 대상으로 하며, 제형은 액체형, 고체형, 분말형, 겔형, 와이프형 등 살균제의 효모균에 대한 효과·효능 평가에 적용한다.

2.0 용어정의

2.1 생균수 감소값(율)

시험군과 대조군에 시험균주를 접종하고 배양 후 생균수를 측정하여 시험군과 대조군을 비교한 것

2.2 간섭물질

탄수화물, 지방 또는 단백질 등의 유기물과 무기질 물질 등 살균제의 효력에 영향을 미칠 수 있는 물질로써, 살균제의 실제 사용 조건을 모사하기 위해 첨가함

2.3 중화제

살균제 시험용액과 세균 현탁액의 정해진 시간 동안 반응 후 추가 반응이 일어나지 않도록 살균제를 불활성화시키기 위해 첨가하는 물질

2.4 멸균

모든 종류의 미생물과 아포를 완전히 사멸시킴

3.0 시험기기 및 기구

3.1 고압증기멸균기

멸균기는 (121 ± 3) ℃, 압력 (103 ± 5) kPa에서 유지 가능할 것

3.2 항온수조

(4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃, (20 ± 1) ℃, (30 ± 1) ℃, (40 ± 1) ℃ 또는 추가 시험온도 (Θ ± 1) ℃로 조절 가능한 항온수조

3.3 배양기

(20 ~ 40) ℃의 범위로 사용 가능하며, 오차 범위가 ± 1 ℃인 배양기

3.4 pH 측정기

(20 ± 1) ℃에서 pH 측정 시, 0.1 단위의 정밀도를 확보한 장비

3.5 스톱워치

3.6 볼텍스 믹서

3.7 냉장고

(2 ~ 8) ℃ 조절 가능한 냉장고

3.8 눈금 피펫

10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 사용

3.9 배양접시

(90 ~ 100) mm 크기의 배양접시 사용

3.10 비다공성 담체(Carrier)

양면이 2b 등급인 평평한 표면의 직경 2 cm의 스테인리스 304 원반을 사용

3.11 다공성 담체(Carrier)

직경 1 cm의 페이퍼 디스크(항생물질검정용 여지)를 사용

3.12 메스 플라스크

3.13 루프

백금, 니크롬 또는 텅스텐으로 만든 것

3.14 생물안전작업대

생물안전등급이 Ⅱ등급 이상인 생물안전작업대 사용

3.15 초저온 냉동고

(-20 ~ -70) ℃까지 조절 가능한 냉동고

4.0 시험 재료

4.1 시험 균주

4.1.1 다음 1가지 시험 균주를 표준 균주로 사용한다.
- *Candida albicans* ATCC 10231

비고 1 이 시험 방법에서 명시되지 않은 균주를 사용할 경우, 사용한 균주명 및 관련 내용을 기록한다.

4.2 배지

해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른 배지를 사용한다.

4.3 물

미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다. 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4.4 경수

증류수 1 L에 $CaCl_2$ 0.305 g(w/v)와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.139 g(w/v)를 첨가하여 제조한다. 제조된 경수는 막여과장치를 사용하여 여과 멸균한다.

4.5 간섭물질

4.5.1 알부민 용액

- 청정 조건을 위한 조제

0.6 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 0.3 g/L이다.

- 오염 조건을 위한 조제

6.0 g의 Bovine Serum Albumin(Cohn fraction V)을 물 1 L에 녹인다. 막여과장치를 사용하여 여과 멸균하고, 냉장고에서 보관하고 1달 내 사용한다. 최종 농도는 3.0 g/L이다.

4.5.2 추가 간섭 물질 선정 시, 이온 조성(예: pH, 칼슘이나 마그네슘 경도)과 화학 조성(예: 무기질 물질, 단백질, 당질, 지질, 세정제 등)은 명확하여야 한다. 물질명 및 관련 사항은 시험 보고서에 기록되어야 한다.

4.6 희석액

증류수 1 L에 Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0 g, Sodium chloride(NaCl) 8.5 g을 첨가한 후 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하고, 멸균 후 20 ℃에서 pH (7.0 ± 0.2)가 되도록 한다.

4.7 중화제

다음의 기본 중화제를 우선 적용하며, 중화효능 유효성이 확인되지 않을 시 해당 살균제의 특성에 따라 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고, 중화효능 유효성을 확인한다.

4.7.1 기본 중화제

1 % 멸균인산완충용액 또는 **4.6항** 희석액 1 L에 Lecithin 3 g, Polysorbate 80 30 g, Sodium thiosulfate 5 g, L-Histidine 1 g, Saponine 30 g을 첨가하여 제조한 후 멸균한다.

4.7.2 기본 중화제 외의 중화제 조성 및 제조는 부록 표 2.를 참고한다.

비고 2 상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

4.8 세척액

막-여과법 시험에 사용하는 세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과될 수 있어야 한다. 다음의 세척액 중 한 가지를 사용할 수 있다.

4.8.1 4.3항 물

4.8.2 4.6항 희석액

4.8.3 0.1 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.4 0.5 %(V/V) Polysorbate 80 용액

4.8.5 0.5 %(V/V) Polysorbate 80과 Lecithin(0.7 g/L)을 함유한 용액

4.8.6 4.7항 중화제

비고 3 상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

5.0 시험용액 준비

시험용액 준비 시 시험 균주 외 미생물로 인한 오염을 방지하기 위해 생물안전작업대(Ⅱ등급) 내에서 무균적으로 작업하며, 시험용액 제조방법은 다음 표와 같다.

표 1. 제형별 시험용액 제조방법

시료 제형	시험용액 제조방법
액체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
고체형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해. 최소 (1.00 ± 0.01) g 이상 용해
분말형	제품 사용 농도에 따라 경수에 용해
겔형	제품 사용 농도에 따라 경수에 희석
와이프형	최소 5 mL 이상이 되도록 시험용액을 짜냄
기타 제형	제품 사용 농도에 따라 제조
- 희석은 부피/부피(v/v)을 기준으로 하여 경수로 부피플라스크에서 제조된다. - 바로 사용하는 제품의 희석은 물로 제조될 수 있다. - 시험용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. - 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 상태를 유지해야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다.	

6.0 시험 균주 현탁액 준비

6.1 시험 균주 활성 배양

6.1.1 시험 미생물의 활성 배양을 위하여 초저온 냉동고에서 보관 중이던 시험균주를 해당 미생물의 고체배지 또는 사면배지에 접종하여 (42 ~ 48) 시간 배양한다.

6.1.2 같은 방법으로 2차 또는 3차 배양하여 이를 활성 배양균으로 사용한다.

비고 4 배양온도는 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

6.2 시험균주 현탁액

6.2.1 희석액 10 mL를 시험관에 넣고 활성 배양균을 멸균 루프로 취하여 해당 희석액에 접종한다. 이 때 루프를 희석액에 담그고 시험관의 벽면에 묻질러 균을 완전히 떨어뜨려 희석액에 혼합되도록 하고, 균질하게 섞는다.

6.2.2 희석액을 사용하여 시험 균수를 ($1.5 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$) CFU/mL로 조정하며, 흡광도 측정법이나 기타 적절한 방법을 이용하여 균수를 추정한다. 시험균주 현탁액은 시험균 활성저하를 고려하여 2시간 이내에 사용한다.

6.2.3 시험균주 현탁액 농도 측정시 생균수 계수를 위해 희석액을 사용하여 시험균주 현탁액을 단계희석한 후 2개의 배지에 주입평판법 및 도말평판법을 이용하여 배양한다.

6.2.4 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다. 시험 현탁액 농도는 ($1.5 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$) CFU/mL이어야 한다.

비고 5 배양시간은 해당 시험 균주의 분양기관에서 제공하는 정보에 따른다.

7.0 시험 절차

간섭물질의 경우 청정조건 또는 오염조건 중 해당 조건을 선택하여 적용한다.

7.1 비다공성 모의표면 시험법

7.1.1 시험을 위한 비다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 6 비다공성 담체(Carrier)는 다음과 같이 세척·살균한다. 1) 5 % V/V Decon®이 최소한 20 mL 이상 들어있는 비커(최소크기: 50 mL)에 담근다. 2) 60분 후 흐르는 증류수에 10초 동안 세척한다. 표면이 건조해서는 안 된다. 3) 표면의 계면활성제를 충분히 제거하기 위해 원반을 물로 10초 동안 다시 세척한다.(물의 흐름을 충분히 하기 위해서, 적절한 호스와 연결 장치 또는 다른 방법을 사용하여 분당 2 L의 멸균된 물을 공급하도록 관의 수압이 유지되도록 조절) 4) 원반을 70 % 이소프로판올이 들어있는 수조에 15분 동안 놓아둔다. 5) 원반을 꺼내고 생물안전작업대 내에서 증발시켜 건조시킨다.

7.1.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.1.3 멸균 배양접시에 비다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 비다공성 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.1.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.5 시험군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다.

비고 7 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 8 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.1.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 비다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.1.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.1.8 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

7.2 다공성 모의표면 시험법

7.2.1 시험을 위한 다공성 담체(Carrier)를 시험군 3개와 대조군 6개를 준비한다. 대조군 6개 중 3개는 접종 직후 초기 대조군으로 사용한다.

비고 9 시험 표면은 고압증기멸균기로 멸균하여 사용한다.

7.2.2 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다.

7.2.3 멸균 배양접시에 다공성 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.2.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 다공성 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다.

7.2.4 접종 직후 초기 대조군 농도를 확인하기 위해 건조된 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 10 mL의 **4.3항** 물과 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕 용액을 희석하여 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.5 시험군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에 각각 0.1 mL의 **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다. 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier) 3개에는 각각 0.1 mL의 **4.4항** 경수(바로 사용하는 제품은 **4.3항** 물 사용)를 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온기에 15분 ± 10초간 유지한다.

비고 10 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

비고 11 반응 시간은 15분 ± 10초를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 반응시간은 1분 ± 10초, 30분 ± 10초 또는 60분 ± 10초 중에서 선택 가능하다.

7.2.6 항온기에 유지 후 시험군 및 대조군 표면균 다공성 담체(Carrier)를 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초간 유지한다.

7.2.7 중화 후, 즉시 중화된 시험군 및 대조군의 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 각각 2개 배양접시에 접종한다.

7.2.8 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양접시를 배양한다. 총 생균수 확인 시, 배양 후 (15 ~ 300) 개의 집락이 형성된 배양접시를 선택하여 계수한다.

8.0 시험방법 유효성 확인

8.1.1 중화효능 유효성을 확인하기 위해 시험관에 1.0 mL의 **4.5항** 간섭물질을 분주한 후 1.0 mL의 **6.2.2항** 시험균주 현탁액을 첨가한다. 첨가 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 2분 ± 10초간 유지한다. 멸균 배양접시에 담체(Carrier)를 놓고 0.05 mL의 **7.1.2항** 접종 현탁액을 접종한다. 접종한 표면균 담체(Carrier)는 37 ℃에서 육안으로 건조가 확인될 때까지 건조한다. 단, 건조는 60분을 초과할 수 없다. 10 mL의 중화제와 1 g 유리비드가 들어있는 시험관에 0.1 mL **5.1항** 시험 용액을 분주한 후 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 15분 ± 10초간 유지한다. 중화한 시험관에 표면균 담체(Carrier) 1개를 넣고 볼텍스 믹서로 최소 1분 이상 진탕한다. 진탕한 시험관을 (20 ± 1) ℃로 조절된 항온수조에 5분 ± 10초 동안 유지한다. 즉시 혼합용액을 평판계수법을 이용하여 2개 배양접시에 접종한다. 접종한 배지는 배양기에서 (42 ~ 48) 시간 동안 배양한다. 중화효능 유효성 확인 농도는 (1.0×10^4) CFU/carrier 이상이어야 한다.

비고 12 시험 온도는 (20 ± 1) ℃를 기준으로 한다. 제품의 사용 조건에 따라 추가 온도는 (4 ± 1) ℃, (10 ± 1) ℃ 또는 (40 ± 1) ℃ 중 선택 가능하다.

8.1.2 접종 직후 초기 대조군 농도는 (1.5×10^4) CFU/carrier 이상이어야 하며, 시험 대조군 농도는 (1.0×10^4) CFU/carrier 이상이어야 한다.

9.0 결과 계산 및 표현

9.1 결과 계산

9.1.1 시험 결과는 희석배수를 고려하여 CFU/carrier로 환산하며, 균 농도는 다음과 같이 계산한다. 단, 유효 숫자 2자리까지 표시한다.

$$N = C \times D$$

N : 균 농도(CFU/carrier)
C : 2개 배양접시 평균 생균수(CFU/carrier)
D : 희석배수

비고 13 혼합물 원액의 배양접시를 계수했을 때, 집락이 없는 경우, 균농도는 '< 10' 로 표기한 후, 생균수 감소값(율) 계산에 사용하는 수는 '10'이 된다.

9.1.2 3회 반복시험에서 시험군 및 대조군의 유효한 시험 성립 조건은 다음과 같다.

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} \leq 0.2$$

L_{max} : 최대 균수의 로그 값
L_{min} : 최소 균수의 로그 값
L_{maen} : 평균 균수의 로그 값

9.1.3 생균수 감소값과 감소율은 다음과 같이 계산한다.

[생균수 감소값]

$$\log R = \log N_t - \log N_a$$

[생균수 감소율]

$$감소율(\%) = \frac{N_t - N_a}{N_t} \times 100$$

R : 생균수 감소값

N_t : 3회 대조군 평균 농도(CFU/carrier)

N_a : 3회 시험군 평균 농도(CFU/carrier)

9.2 결과 표현

9.2.1 시험 결과는 로그 감소값으로 표기된다. 감소율(%) 추가 표기도 가능하다.

9.2.2 로그 감소값으로 표기되는 시험결과는 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기한다. 감소율(%)로 표기되는 시험결과는 소수점 첫째 자리까지 표기가능하며 이하는 버림한다.

9.2.3 시험 균주의 균주명과 균주 번호를 기록한다.

9.2.4 각 시험 미생물에 대해 시험에서 사용된 제품의 농도를 기록한다.

10.0 참고문헌

10.1 ASTM E1054-08(Reapproved 2013). Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. 1 - 7. ASTM International. (2013).

10.2 ASTM E2149-13a. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 1 - 5. ASTM International. (2013).

10.3 ASTM E2315-16. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. 1 - 5. ASTM International. (2016).

10.4 ASTM E2197-17. Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal, And Sporicical Activities of Chemicals (2017)

10.5 EN 1276:2019. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1);. 1 - 41. European Standard. (2019).

10.6 DIN EN 13697 : 2015-06. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements without mechanical action(phase 2, step 2)(2015)

10.7 JIS Z 2801:2012. Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy. (2012).

10.8 농림축산검역본부. 소독제 효력시험지침. 제2018-16호. 1 - 22. (2018).

10.9 식품의약품안전처. 식품첨가물공전-일반시험법-살균소독력시험법. 1 - 30.

11.0 부록

표 1. 균주별 배양 조건

균주 항목	균주명	분양번호	배양	
			온도[℃]	배지
표준 균주	*Candida albicans*	ATCC 10231	24 ~ 26	YMA
추가 균주	기타 균주		분양정보에 따름	

※ YMA : YM Agar

YMA 조성	용량		YMA 조성	용량	
Yeast Extract	3.0	g	Peptone	5.0	g
Malt Extract	3.0	g	Agar	20.0	g
Dextrose	10.0	g	DI Water	1,000	mL

표 2. 중화제(희석-중화법) 조성 및 제조방법 예시

시료 성분	중화제
4급 암모늄화합물계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin - 30 g/L Polysorbate 80 + 4 g/L Sodium dodecyl sulphate + 3 g/L Lecithin - 3 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 5 g/L Polysorbate 80
비구아니드(Biguanides) 및 유사 화합물	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin
염소계, 과산화물계	- 30~20 g/L Sodium thiosulphate + 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 50 g/L Polysorbate 80 + 0.25 g/L Catalase + 10 g/L Lecithin
알데하이드(Aldehydes)	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine) - 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 1 g/L L-Histidine (또는 Glycine)
페놀계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 3 g/L Lecithin - 7 g/L 지방알코올 축합 Ethylene oxide + 20 g/L Lecithin + 4 g/L Polysorbate 80
알코올계	- 30 g/L Polysorbate 80 + 30 g/L Saponin + 3 g/L Lecithin

- 시료의 pH에 따라 중화제 및 세척액의 pH를 조절하거나 인산 완충용액에서 제조할 수 있다.
- 지방알코올 축합 Ethylene oxide는 C_{12}에서 C_{18}까지 가능하다.
- Lecithin은 계란을 권장한다.
- Sodium thiosulphate의 유독성은 시험 균주마다 다르다.
- 짧은 연쇄 알코올(C_5 미만)의 중화에는 간단한 희석으로도 가능하다. 알코올 기반 제품에 추가 항균 성분이 포함된 경우, 주의해야 한다.
- 하나 이상의 성분을 포함한 경우, 여러 성분의 혼합 중화제가 필요할 수 있다.
- 여러 성분의 혼합 중화제는 고농도의 시료를 중화하지 못할 수도 있다.

표 3. 시험 결과 예시

<생균수 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과					
		반복 횟수	생균수 [CFU]	평균값 [CFU]	희석 배수	균 농도 [CFU /carrier]	평균값 [CFU /carrier]
칸디다균	대조군	1회	164	162	10^2	1.6×10^4	1.6×10^4
			160				
		2회	173	170	10^2	1.7×10^4	
			168				
		3회	165	164	10^2	1.6×10^4	
			162				
	액상 살균제	1회	< 10	< 10	10	10	1.0 × 10
			< 10				
		2회	< 10	< 10	10	10	
			< 10				
		3회	< 10	< 10	10	10	
			< 10				

<감소율 계산 계산 및 표기>

시험 항목		시험 결과		
		반응 후 농도	로그 감소값	감소율[%]
칸디다균	대조군	1.6×10^4	-	-
	액상 살균제	10	3.2	99.9

<반복시험 유효성 확인>

시험 항목		시험 결과
칸디다균	대조군	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{(1.7 \times 10^4) - (1.6 \times 10^4)}{1.6 \times 10^4} = 0.062 \leq 0.2$
	액상 살균제	$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{mean}} = \frac{1-1}{1} = 0 \leq 0.2$

※ 사용 균주 : *Candida albicans* ATCC 10231
※ 담체(Carrier) : Stainless steel disc 304
※ 시험 현탁액 농도 : 1.8×10^7 CFU/carrier
※ 접종 직후 초기 대조군 농도 : 1.6×10^4 CFU/carrier
※ 중화효능 유효성 확인 농도 : 1.1×10^4 CFU/carrier
※ 시험 조건
시험용액 농도 100 %(원액); 온도 (20 ± 1) ℃; 반응 15분 ± 10초; 청정 조건(0.3 g/L BSA)
※ 배양 조건
온도 (25 ± 1) ℃, 24시간 배양

살생물제 효과·효능 시험방법 자료집 – 살균제류

인 쇄	2021년 06월
발 행	2021년 06월
펴 낸 이	국립환경과학원 환경건강연구부 화학물질연구과
주 소	인천광역시 서구 환경로 42(경서동 종합환경연구단지내)
전 화	1800-4840
팩 스	032-568-2037
I S B N	11-1480523-004403-01