

살조제 - 총칙

2021

(Algicide - Introduction)

1.0 개요

이 시험방법은 살조제의 효과·효능 평가를 위한 시험방법으로 「생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률」(이하 “법”이라 한다)에 따른 살생물제 승인제도의 원활한 이행을 목적으로 한다. 단 이 시험방법은 참고자료로서 대외적으로 법적 효력을 가지는 것은 아니다.

2.0 적용범위

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

3.0 대상 생물종

살조제 대상 생물종은 아래 표와 같으며 살조제의 적용 대상이 다양하기 때문에 세부용도별 대상 생물종을 구분하지는 않는다. 이에 시험자는 평가 대상 살조제가 처리되는 환경을 고려하여 효능을 주장하고자 하는 평가 대상을 선정하여 시험할 수 있다.

| 생물종 | 학명 |
|-----|---|
| 조류 | <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12 |
| | <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> CCAP 1401/3 |
| | <i>Microcystis aeruginosa</i> CCAP 1450/1 |
| | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1 |
| | <i>Skeletonema costatum</i> CCAP 1077/1C |
| | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC 22662 |
| | <i>Desmodesmus subspicatus</i> 86.81 SAG |
| | <i>Navicula pelliculosa</i> UTEX 664 |
| | <i>Anabaena flos-aquae</i> ATCC 29413 |
| | <i>Synechococcus leopoliensis</i> CCAP 1405/1 |

4.0 시험결과의 보고

살조제 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.

살조제-생장 저해 시험방법

2021

(Algicide-Growth inhibition test)

1.0 개요

살생물제가 살조류 효능을 나타내는지 확인하기 위한 시험방법이다. 배양된 조류 배양액을 대상으로 살생물제를 규정한 배양조건 및 시간 동안 처리하여 생장 속도 및 생장 저해 효과를 계산한다.

본 시험방법은 승인 기준에 해당하는 시험 조건을 기술하고 있으며, 필요 시 본 시험방법에 기재되지 않은 추가 시험 조건(대상 조류¹⁾, 처리 온도, 배양 조건 등)이 도입될 수 있다.

2.0 시험 조건 선택

다음은 조류 생장 저해 시험방법의 제시된 기본적인 시험 조건이다. 제품의 실사용 조건을 고려하여 추가적인 시험 온도, 시험 시간, 배양 조건을 선정할 수 있다.

| | |
|--|---|
| 시험 온도 θ ($^{\circ}\text{C}$) | $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 과 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 사이로서 상온이 되도록 함. |
| 시험 시간 t (일) | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 |
| 배양 조건 | 대상 생물종의 따라 $40\text{--}120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 빛 농도, 12시간:12시간 빛: 암흑 사이클 혹은 일정한 빛 농도로 유지되는 배양기에서 배양 |

3.0 시험준비

3.1 배지 및 시약

시약은 analytical grade에 해당하는 것으로 사용해야 하며 미생물 시험에 적합해야 한다.

| 번호 | 재료 및 장비 | 준비 방법 |
|----|---------|---|
| #1 | 물 | <ul style="list-style-type: none"> - 미생물에 독성을 나타내거나 미생물 생장을 억제할 수 있는 물질을 포함하지 않아야 한다. - 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용해서는 안 된다²⁾. - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균³⁾한다. |

1) 조류는 최적 생장 조건에서 배양되어야 하고, 미생물의 적합성이 입증되어야 한다. 해당 조류에 대한 정보(조류명, 생장 조건, 시험방법에 기재된 조류와의 특성 차이 등)를 시험 보고서에 기재해야 하며, 5년 동안 해당 조류를 보관해야 한다.

2) 적절한 품질의 증류수를 이용할 수 없는 경우 주사제로 사용될 수 있는 물을 사용할 수 있다.

3) 물이 시약을 멸균하는 과정에서 함께 멸균된다면 물만을 이용한 별도의 멸균은 필요하지 않다.

| | | | |
|----|--------------|--|------------|
| #2 | 인공 해수 | NaCl | 24.53 g |
| | | MgCl ₂ | 5.20 g |
| | | Na ₂ SO ₄ | 4.09 g |
| | | CaCl ₂ | 1.16 g |
| | | KCl | 0.695 g |
| | | NaHCO ₃ | 0.201 g |
| | | KBr | 0.101 g |
| | | H ₃ BO ₃ | 0.027 g |
| | | SrCl ₂ | 0.0025 g |
| | | NaF | 0.003 g |
| | | Water | 1000.00 mL |
| | | - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다. | |
| | | - pH는 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 8.2±0.1로 조정한다. | |
| #3 | BG-11 medium | NaNO ₃ | 1500 mg |
| | | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 36 mg |
| | | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 75 mg |
| | | K ₂ HPO ₄ | 40 mg |
| | | Na ₂ CO ₃ | 20 mg |
| | | Fe(NH) ₄ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ | 6 mg |
| | | Na ₂ EDTA | 1 mg |
| | | C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O | 6 mg |
| | | H ₃ BO ₃ | 2.86 mg |
| | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 1.81 mg |
| | | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.222 mg |
| | | NaMoO ₄ · 2H ₂ O | 0.39 mg |
| | | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.079 mg |
| | | Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0.0494 mg |
| | | Artificial sea water | 1000.0 mL |
| | | - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다. | |
| | | - pH는 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 7.5±0.1로 조정한다. | |
| #4 | F/2 medium | NaNO ₃ | 75.00 mg |
| | | NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O | 5.65 mg |
| | | Na ₂ EDTA | 4.16 mg |
| | | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 3.15 mg |
| | | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.01 mg |
| | | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.022 mg |
| | | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.01 mg |
| | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.18 mg |
| | | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.006 mg |
| | | Cyanocobalamin(Vitamin B12) | 0.0005 mg |
| | | Thiamine HCl(Vitamin B1) | 0.1 mg |
| | | Biotin | 0.0005 mg |
| | | Artificial sea water | 1000.00 mL |
| | | - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다. | |
| | | - pH는 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 8.0±0.1로 조정한다. | |

| | | | |
|-----|-----------------------|--|------------|
| #5 | AAP medium | NaHCO ₃ | 15.0 mg |
| | | NaNO ₃ | 25.5 mg |
| | | MgCl ₂ · 6H ₂ O | 12.16 mg |
| | | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 4.41 mg |
| | | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 14.6 mg |
| | | K ₂ HPO ₄ | 1.044 mg |
| | | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 0.160 mg |
| | | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 0.300 mg |
| | | H ₃ BO ₃ | 0.186 mg |
| | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.415 mg |
| | | ZnCl ₂ | 0.00327 mg |
| | | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.00143 mg |
| | | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.00726 mg |
| | | CuCl ₂ · 2H ₂ O | 0.000012 |
| | | Water | 1000.0 mL |
| | | - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다. - pH는 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 7.5±0.1로 조정한다. | |
| #6 | OECD TG 201 medium | NaHCO ₃ | 50.0 mg |
| | | NH ₄ Cl | 15.0 mg |
| | | MgCl ₂ · 6H ₂ O | 12.0 mg |
| | | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 18.0 mg |
| | | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 15.0 mg |
| | | KH ₂ PO ₄ | 1.60 mg |
| | | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 0.0640 mg |
| | | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 0.100 mg |
| | | H ₃ BO ₃ | 0.185 mg |
| | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.415 mg |
| | | ZnCl ₂ | 0.00300 mg |
| | | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.00150 mg |
| | | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.00700 mg |
| | | CuCl ₂ · 2H ₂ O | 0.00001 |
| | | Water | 1000.0 mL |
| | | - 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다. - pH는 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 8.1±0.1로 조정한다. | |
| #7 | Lugol solution | - 요오드화칼륨(potassium iodide, KI) 20 g을 물 200-300 mL에 녹이고 여기에 요오드(iodine, I) 10 g을 넣어 녹인 다음 물을 1 L까지 첨가한다. - 이 용액을 사용하기 수일 전에 아세트산(acetic acid, CH ₃ COOH) 20 mL를 넣어 갈색 시약병에 보존한다. | |
| #8 | Formaldehyde solution | - 포름알데하이드(formaldehyde, H ₂ CO, 35.0-38.0 % 함유)에 탄산수소나트륨(sodium hydrogen carbonate, NaHCO ₃)을 넣어 pH를 7.0으로 조정하여 사용하거나 포름알데하이드 함량이 8%인 중성완충포름알데하이드용액(조직 고정용)을 사용한다. | |
| #9 | Glutaraldehyde | - | |
| #10 | 제품 희석을 위한 경수 | 1000 mL 메스플라스크에 최소 600 mL의 물을 첨가한 후 6.0 mL의 solution A, 8.0 mL의 solution B를 첨가한다. 교반하고 1000 mL까지 물을 첨가하여 희석한다. 최대 기공 크기가 0.45 µm 인 필터를 이용하여 멸균한다. 경수의 pH는 20±1°C에서 측정 시 7.0±0.2 이어야 한다. pH 조절이 필요한 경우 약 40 g/L(대략 1 mol/L)의 수산화나트륨(NaOH) 또는 약 36.5 g/L(대략 1 mol/L)의 염산(HCl)을 이용한다. 경수는 무균 조건 하 제조되어야 하고 12시간 이내에 사용해야 한다. | |

| | | |
|-----|---------|---|
| | | <p>- Solution A 19.84 g 무수 $MgCl_2$와 46.24 g 무수 $CaCl_2$을 물에 첨가하여 용해시킨 후 1000 mL까지 희석한다. 막 여과 또는 고압멸균기를 사용하여 멸균한다. 고압멸균 시 액체의 손실이 발생할 수 있다. 이 경우 무균 조건에서 1000 mL까지 물을 첨가한다. 용액은 냉장고에 보관하고 한 달 이상 보관하지 않는다.</p> <p>- Solution B 35.02 g $NaHCO_3$를 물에 첨가하여 용해시킨 후 1000 mL까지 희석한다. 막 여과를 통해 제균한다. 용액은 냉장고에 보관하고 1주 이상 보관하지 않는다.</p> <p>주. 제품 시험 용액 제조 시, 경수에 제품을 첨가하면 각각의 최종 물 경도($CaCO_3$로 표기)가 달라질 수 있다. 어떠한 경우에도 최종 물 경도가 튜브 내 calcium carbonate($CaCO_3$) 375 mg/L보다 낮아야 한다.</p> |
| #11 | 막 여과 장치 | <p>- 여과될 물질과 호환 가능한 물질로 제조 필요</p> <p>- 적어도 50 mL 부피의 필터받침을 지녀야 함</p> <p>- 경수 멸균을 위해서 지름 47-50 mm, 0.45 μm 기공 크기의 필터를 사용하는 것이 적합</p> |

3.2 기구 및 장비

멸균 상태에서 공급된 것들을 제외한 배지와 시약 또는 시료와 접촉할 모든 유리 기구와 장치의 부품은 고압증기멸균기($121_0^{+3}^{\circ}C$, 15분) 또는 건열멸균기($180^{\circ}C$ 30분, 또는 $170^{\circ}C$ 1시간, 또는 $160^{\circ}C$ 2시간)로 멸균해야 한다.

| 번호 | 재료 및 장비 | 준비 방법 |
|-----|-------------------------|---|
| #1 | 멸균 장치 | 1) 습열멸균기 $121_0^{+3}^{\circ}C$ 에서 15분 이상 유지 가능 2) 건열멸균기 $180^{\circ}C$ 30분, $170^{\circ}C$ 1시간, 또는 $160^{\circ}C$ 2시간 이상 유지 가능 |
| #2 | 조류 배양기 혹은 빛 조절이 가능한 배양기 | <p>- $20 \pm 1^{\circ}C$과 $25 \pm 1^{\circ}C$로 유지 가능</p> <p>- 빛 농도 조절 및 빛:암흑 사이클 가능</p> |
| #3 | pH 측정기 | $20 \pm 1^{\circ}C$ 에서 pH가 0.1 단위의 칼리브레이션 정확도 필요 |
| #4 | 진탕교반기 | 기계 또는 전기교반기(예: Vortex [®] mixer ⁴⁾) |
| #5 | 용기 | 적합한 용량(250 mL)을 가진 시험관이나 플라스크 |
| #6 | 눈금피펫 | 10 mL, 1 mL, 0.1 mL 및 0.05 mL 또는 자동보정 피펫 |
| #7 | 미생물 시험용 클린벤치 | - |
| #8 | 광학현미경 혹은 위상차현미경 | 1,000배율까지 확대 가능한 현미경을 사용 |
| #9 | 혈구계수기 | 슬라이드글라스의 중앙에 격자모양의 계수 구역이 상하 2개로 구분되어 있으며, 계수 구역에는 격자모양으로 구분 |
| #10 | 원심분리기 | 최대 1,500g 구동 |
| #11 | 플랑크톤 네트 혹은 핸드 네트 | - |
| #12 | 사이폰 | - |
| #13 | 유리 실린더 | - |

4) Vortex[®]는 상업적으로 이용할 수 있는 적당한 제품의 예이다. 이 정보는 이 기준을 사용하는데 편의를 제공하고자 주어진 것이다.

4.0 시험 미생물 현탁액 제조

4.1 시험 생물종

- (1) *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12
- (2) *Aphanizomenon flos-aquae* CCAP 1401/3
- (3) *Microcystis aeruginosa* CCAP 1450/1
- (4) *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1
- (5) *Skeletonema costatum* CCAP 1077/1C
- (6) *Pseudokirchneriella subcapitata* ATCC 22662
- (7) *Desmodesmus subspicatus* 86.81 SAG
- (8) *Navicula pelliculosa* UTEX 664
- (9) *Anabaena flos-aquae* ATCC 29413
- (10) *Synechococcus leopoliensis* CCAP 1405/1

4.2 시험 대상 미생물 배양 및 시험 배양액 제조

4.2.1 일반사항

시험 미생물의 활성 배양을 위하여 각각의 미생물의 스톡 컬처를 배양액에 접종하여 시험 배양액을 제조한다. 배양 기간은 2~4일로 권장되나, 권장된 적정세포농도를 위해 조정될 수 있다.

4.2.2 배양조건

각각의 미생물의 권장 배양온도 및 빛 조건, 배양액과 적정세포농도는 다음과 같다.

| 대상 | 배양액 | 배양온도 | 빛 조건 | 적정세포농도 |
|----------------------------------|--------------|-------|--|-------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | F/2 medium | 22±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s): 암흑 사이클 | 2.0×10 ⁸ /mL |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | F/2 medium | 21±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s): 암흑 사이클 | 1.0×10 ⁸ /mL |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | BG-11 medium | 25±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s): 암흑 사이클 | 5.0×10 ⁸ /mL |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | F/2 medium | 20±1℃ | 12시간:12시간= 빛(48 μmol/m ² s): 암흑 사이클 | 2.0×10 ⁸ /mL |
| <i>Skeletonema costatum</i> | F/2 medium | 20±1℃ | 12시간:12시간= 빛(48 μmol/m ² s): 암흑 사이클 | 8.2×10 ⁷ /mL |

| | | | | |
|---|---------------------------------|-------|-------------------------------------|---|
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | AAP medium 혹은 OECD TG 201 | 20±1℃ | 일정한 빛 (40 μmol/m ² s) | 5.0×10 ⁵ – 5.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Desmodesmus subspicatus</i> | AAP medium 혹은 OECD TG 201 | 20±1℃ | 일정한 빛 (40 μmol/m ² s) | 2.0×10 ⁵ – 5.0×10 ⁵ CFU/mL |
| <i>Navicula pelliculosa</i> ⁵⁾ | AAP medium 혹은 OECD TG 201 | 20±1℃ | 일정한 빛 (40 μmol/m ² s) | 1.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Anabaena flos-aquae</i> | AAP medium 혹은 OECD TG 201 | 20±1℃ | 일정한 빛 (40 μmol/m ² s) | 1.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Synechococcus leopoliensis</i> | AAP medium 혹은 OECD TG 201 | 20±1℃ | 일정한 빛 (40 μmol/m ² s) | 5.0×10 ⁶ – 5.0×10 ⁷ /mL |

- 시험 배양액은 배양 중 하루에 두 번씩 교반한다. 모든 조류 세포들은 지수성장단계의 조류 세포들이 모든 시험 과정에서 사용된다.
- 시험 생물종의 배양액이 두 가지가 제시된 경우, 시험자의 상황에 따라 선택하여 사용한다.
- 시험 배양액의 적정세포농도는 후에 접종을 위해 초기세포농도의 100배 높은 세포 농도까지 배양한다.

4.3 시험 배양액 계수

4.3.1 시험 배양액 계수 절차

4.3.1.1 일반사항

- 시험 배양액의 세포 수는 계수면적당 10-40 정도가 되도록 희석 또는 농축한다⁶⁾.

4.3.1.2 시험 배양액 희석

- 시험 배양액이 육안으로 녹색이나 갈색으로 보일 경우 멸균된 물로 적절한 농도로 희석한다.

4.3.1.3 시험 배양액 농축

4.3.1.3.1 원심분리방법

- 일정량의 시험 배양액을 원심분리기에 넣고 1000×g로 20분 원심분리하여 일정배율로 농축한다.
- 미세한 조류의 경우는 1500×g에서 30분 원심분리를 시행한다. 침강성이 좋지 않은 남조류 배양액은 루골용액으로 고정한 후 농축하거나 일정량을 플랑크톤 넷트 또는 핸드 넷트로 걸러 일정배율로 농축한다.

5) *Navicula pelliculosa*의 배양액을 제조할 시, 1.4 mg Si/L을 맞추기 위해 두 가지 배양액 모두 Na₂SiO₃·9H₂O를 첨가한다.

6) 계수면적은 현미경 시야에서 계수하기 위하여 설정된 혈구계산기의 격자 크기로 한다.

4.3.1.3.2 자연침전법

- 시험 배양액에 포르말린용액을 1% 또는 루골용액을 1-2% 첨가하여 조류를 고정시켜 실린더 용기에 넣고 일정시간 정치 후(0.5 시간/mm) 사이폰을 이용하여 상층액을 따라 내어 일정량으로 농축한다⁷⁾.
- 직경이 작은 실린더로 옮겨 2-3회 반복한다.

4.3.2 계수

4.3.2.1 시험 배양액의 계수는 정확성과 편리성을 위하여 혈구계수기와 현미경을 사용한다.

4.3.2.2 혈구계수기에 커버글라스를 덮고 조심스럽게 시험 배양액을 주입시킨다. 5분 정도 정치시킨 다음 혈구계수기 격자상의 세포 수를 현미경을 이용하여 계수한다. 이때 혈구계수기는 5회 이상 반복한다.

4.3.2.3 1 mL 내의 세포 수는 다음 식으로 계산한다.

$$\frac{C}{A \times D \times N} \times 1,000 (\text{세포수/mL}) \quad (1)$$

C : 계수된 세포 수의 합, A : 혈구계수기 면적(mm^2),
 D : 혈구계수기 깊이(mm), N : 검경한 시야의 횟수

- 집락을 형성하는 조류들은 필요에 따라 단일세포로 분리한 후 고르게 현탁하여 수행한다.
- 혈구계수기의 경우는 가장 큰 격자 크기가 1 mm×1 mm인 것을 이용한다.
- 정체시간이 짧을 경우 충분히 침전되지 않은 세포가 계수 시 제외되어 오차유발 요인이 될 수 있다.
- 배양액이 희석되거나 농축되었을 경우는 세포 수 계산 시 보정계수를 산출하여 적용한다.

5.0 제품 시험 용액 제조

5.1 일반 사항

시험 및 절차 확인 과정에서 100배 희석되므로 제품 시험 용액의 농도는 요구되는 시험 농도(실제 시험 농도)의 100배이어야 한다. 제품 시험 용액은 활성 범위의 농도와 비활성 범위의 농도 및 제품을 첨가하지 않는 대조군을 포함하여 최소 3개의 다른 농도로 경수를 이용하여 제조되어야 한다. 제품의 희석은 경수를 이용하여 제조한다. 희석이 되지 않는 바로 사용하는 제품의 희석은 물을 이용하여 제조한다. 제품 시험 용액은 바로 제조해야 하며 2시간 이내에 시험에 사용해야 한다. 용액은 모든 과정에서 안정하고 물리적으로 동질한 제조를 보여야 한다. 절차 중 침전물 혹은 응집물로 인한 비동질화가 육안으로 발견될 경우 이는 시험 보고서에 기록되어야 한다⁸⁾. 샘플로 사용되는 제품의 상세 정보가 기록되어야 한다. 시험 보고서에

7) 침전 용기는 얇고 투명한 유리 실린더를 사용한다.

서술된 제품의 농도는 요구되는 시험 농도여야 한다. 시험 농도를 무게 당 부피 혹은 부피 당 부피로 기록하고 일반적으로 인정되는 제품 샘플의 세부사항도 기록해야 한다.

5.2 고품 제품

고품 제품의 경우 $1\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ 의 제품을 부피 플라스크에 넣고 경수를 부어 용해한다. 추가적인 희석은 부피 플라스크를 이용하여 수행되며 경수의 부피/부피(V/V) 비를 기준으로 한다.

5.3 액상 제품

액상 제품의 경우 제품 시험액은 경수의 부피/부피(V/V)을 기준으로 하여 부피 플라스크에서 희석하는 방식으로 조제한다.

6.0 생장 저해 시험 수행 절차

6.1 실험군 및 대조군 시험 수행(시험 혼합물 제조)

실험군 및 대조군 시험 수행을 위해 아래와 같은 순서로 시험을 수행한다.

| 순서 | 수행 방법 |
|----|--|
| 1 | 멸균된 250 mL 용량의 플라스크를 제조한다. |
| 2 | 무균 상태에서 배양액 ⁹⁾ 98 mL를 멸균된 250 mL 용량의 플라스크에 첨가한 후, 제조된 제품 시험 용액 1 mL를 첨가하여 시험 혼합물을 제조한다. |
| 3 | 제조된 시험 혼합물에 지수 생장 단계의 시험 배양액 1 mL를 초기세포농도에 맞게 첨가하여 접종 후 교반한다. |
| 4 | 각각의 시험 혼합물 및 대조군을 7일간 배양한다. 시험 혼합물 및 대조군의 계수는 1일 간격으로 수행한다. |
| 5 | 위 모든 과정은 독립적으로 3 반복 시험 수행한다. |

- 모든 시험 과정은 무균 조건으로 수행한다.
- 시험 대조군은 제품 시험 용액을 첨가하지 않고, 경수를 1 mL 첨가한다¹⁰⁾.

8) 침전 혹은 응집을 포함한 미생물의 계수는 어렵고 신뢰할 수 없다.

9) 시험 생물종을 배양한 배양액과 동일한 배양액을 첨가한다.

10) 제품 희석 시 사용한 희석액이 경수가 아닐 시, 희석액과 동일하게 추가한다.

6.2 시험 혼합물 배양조건

| 대상 | 배양온도 | 빛 조건 | 초기세포농도 |
|--|----------------|--|---|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 22±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s):암흑 사이클 | 2.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 21±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s):암흑 사이클 | 1.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | 25±1℃ | 12시간:12시간= 빛(40 μmol/m ² s):암흑 사이클 | 5.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 20±1℃ | 12시간:12시간= 빛(48 μmol/m ² s):암흑 사이클 | 2.0×10 ⁶ /mL |
| <i>Skeletonema costatum</i> | 20±1℃ | 12시간:12시간= 빛(48 μmol/m ² s):암흑 사이클 | 8.2×10 ⁵ CFU/mL |
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 21±2- 24±2℃ | 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광조명 | 5.0×10 ³ - 5.0×10 ⁴ /mL |
| <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 21±2- 24±2℃ | 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광조명 | 2.0×10 ³ - 5.0×10 ³ /mL |
| <i>Navicula pelliculosa</i> | 21±2- 24±2℃ | 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광조명 | 1.0×10 ⁴ /mL |
| <i>Anabaena flos-aquae</i> | 21±2- 24±2℃ | 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광조명 | 1.0×10 ⁴ /mL |
| <i>Synechococcus leopoliensis</i> | 21±2- 24±2℃ | 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광조명 | 5.0×10 ⁴ - 5.0×10 ⁵ CFU/mL |

- 시험 혼합액은 배양 중 하루에 두 번씩 교반한다.
- 백색 혹은 일광 유형의 일정하고 지속적인 형광 조명의 경우, 60-120 μmol/m²s의 범위에서 적절한 빛의 농도를 선택한다¹¹⁾. 선택된 빛의 농도±15%로 유지한다.
- 시험 혼합물의 계수는 1.3을 참고한다.

7.0 성장 저해 계산

7.1 시험 혼합물의 계수

시험 혼합물의 계수는 배양 기간 7일 동안 1일 간격으로 실시한다. 계수는 1.3을 참고하여 수행한다.

11) *Anabaena flos-aquae*의 경우, 고농도의 빛은 손상을 입힐 수 있으므로 40-60 μmol/m²s의 범위에서 적절한 농도를 선택한다

7.2 생장 속도 계산(μ)

특정 조건의 생장 속도(μ)는 다음과 같은 식을 이용하여 측정한다.

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

N_2 : 지수생장단계 종말점 세포농도(세포수/mL), N_1 : 초기세포농도(세포수/mL),
 t_2 : 지수생장단계 종말점(일), t_1 : 0일

- 지수생장단계 종말점은 세포농도가 감소하기 전 마지막 시점을 뜻하고, 세포 수가 감소하지 않을 경우, 마지막 배양 시점을 지수생장단계 종말점으로 한다(7일).
- 3 반복 시험 결과를 바탕으로 실험군, 대조군의 생장 속도를 계산하고, 이를 통계적 분석에 사용한다.

7.3 생장 저해 효과(I) 계산

생장 저해 효과(I)는 다음과 같은 식을 이용하여 측정한다.

$$I\% = \frac{N_0 - N_1}{N_0} \quad (3)$$

N_0 : 특정 시기의 대조군 세포농도(세포수/mL),
 N_1 : 특정 시기의 실험군 세포농도(세포수/mL)

- N_0 와 N_1 의 특정 시기는 동일해야 한다.
- 3 반복 시험 결과를 바탕으로 실험군, 대조군의 세포농도를 계산하고, 이를 생장 저해 효과 계산에 사용한다.

7.4 통계적 분석

4.2에서 계산된 생장 속도는 대조군의 생장 속도와 유의적 차이 분석을 수행한다. 통계적 분석을 통한 유의적 차이는 least significant difference test(LSD)와 $p < 0.01$ 수준의 one way analysis of variance(ANOVA)를 이용해 유의적 차이를 확인한다.