Journal of Radiation Industry 5 (1) : 63~67 (2011)

감마선을 이용한 *Escherichia coli* K12의 살균에서 persulfate의 효과

이오미* · 김태훈 · 유승호 · 정인하 · 이면주

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소 공업환경연구부

Effect of Persulfate on Disinfection of *Escherichia coli* K12 by Gamma Radiation

O Mi Lee*, Tae Hun Kim, Seungho Yu, Inha Jung and Myun Joo Lee

Radiation Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Reserch Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - A comparative experiment was conducted to compare the effects of persulfate with gamma radiation on the disinfection efficiencies against *Escherichia coli* K12. The microorganism used for the disinfection experiments were prepared by transferring a bacterial stock culture into a 50 ml nutrient broth an incubating for 24 hrs at 37°C. The initial concentration of the harvested culture was approximately 10^7 to 10^9 CFU ml^{-1}. The culture solution was irradiated at different absorbed doses of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, and 1 kGy, respectively. The disinfection efficiency of persulfate with gamma radiation of 0.3 kGy against *Escherichia coli* K12 was 97.2% and while the gamma radiation only was 90.01% at 0.3 kGy. Therefore, it could be thought that addition of persulfate in the disinfection of *Escherichia coli* K12 can enhance the disinfection efficiency when it is used together with gamma radiation.

Key words : Gamma radiation, *Escherichia coli* K12, Disinfection

서 론

살균과정은 수인성 질병을 막기 위하여 수년간 수행되어 왔고, 병원성 미생물들의 살균은 환경적인 안전성을 위한 중요한 과제이다(Chick 1908; Yoon *et al*. 2002). 특히, 전통적인 수처리 방법에 의해서 살균되지 않은 의외의 수인성 질병의 출현이 심각한 문제로 대두되고 있다(Oyane *et al*. 2005). 하수처리장 방류수 수질기준에 대장균군을 규제하지 않았으나 국민의 보건향상 및 생태계보호 차원에서 방류수 수질기준에 대장균군 규제를 신설하고, 2003년부터 시행하여 상수원으로의 유입을 근원적으로 차단하고자 노력해오고 있다. 살균방법은 염소소독, 자외선 소독, 오존 살균 등에 국한되어 있다. 염소소독은 소독부산물인 트리할로메탄의 위해성과 수생생물에 대한 영향으로 반드시 탈염소설비 등의 대책을 강구해야 한다. 자외선 소독은 대규모 처리장에 설치 시 램프의 주기적인 교체가 필요하고 처리수 내 탁도나 색도 등이 존재할 경우 소독효율이 떨어지는 문제점이 있다(Kim *et al*. 2004). 따라서 2차 오염물의 발생이 없고, 유량변동에 쉽게 대처할 수 있는 효율적인 살균공정의 개발이 절실한 실정이다. 감마선을 이용한 살균기술은 박

* Corresponding author: O Mi Lee, Tel. +82-63-570-3356, Fax. +82-63-570-3348, E-mail. lomi@kaeri.re.kr

테리아, 바이러스, 기생충 등을 효과적으로 사멸시키기 위해 적용되었다(Farooq *et al*. 1999). 일반적으로 병원균을 완전 사멸시키거나 혹은 동물체에 질병을 유발하는 바이러스 등을 무능화시키기 위해서는 2～5 kGy의 흡수선량범위가 적합하고, 내생포자가 형성된 경우나, 알 등의 완전제거를 위해서는 10 kGy 가량의 흡수선량이 필요한 것으로 보고되고 있다. 전자선 조사를 통한 하수처리장 처리수의 대장균 제거는 브라질에서 기초연구로 효과를 보고한 바 있다. 연구결과에 따르면 처리하지 않은 생활수에 3～4 kGy의 전자선 조사로 초기 대장균군을 5 Log (99.999%)까지 감소시킬 수 있었고, 대상 생활하수를 임의성 라군에서 처리한 후 3 kGy의 전자선을 조사할 경우 용존산소의 농도가 높기 때문에 보다 효과적으로 대장균군의 양을 줄일 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 방사선의 일종인 감마선을 하수에 조사하여 수중에서 각종 라디컬을 생성시켜 미생물을 소독하는 방법으로 기존의 소독방법에 비해 높은 소독효과를 기대할 수 있다. Yoo et al. (1999)의 결과에 의하면 하수처리장의 유출수의 경우 0.5 kGy의 낮은 선량에서 미생물의 재증식 억제를 위한 완전사멸이 이루어졌으며, 감마선 단독조사 시보다는 감마선과 오존을 병행할 경우 라디컬 생성이 더욱 활성화되므로 방사선 조사량을 크게 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

최근 들어 토양 및 지하수의 오염물질을 처리하는 기술인 In Sith Chemical Oxidation (ISCO)의 적용성 연구가 많이 이루어지고 있다. ISCO에 사용되는 산화제로는 feton, permanganate, persulfate 등이 있으며, 이 중에서도 sodium persulfate를 이용한 persulfate 산화 공정은 오존 또는 과산화수소에 비해 지표 아래에서의 지속시간이 길기 때문에 기존의 산화제를 대체할 수 있을 것으로 연구되고 있다(Huang *et al*. 2005). Persulfate 산화 기법은 persulfate 음이온(S_2O^{2-})을 발생시켜 각종 유·무기물질들을 처리하는 기법이다. Persulfate 음이온은 물에 대한 용해도가 상당히 높고 넓은 pH 범위에 대해서도 적용이 가능하다(송 등 2009). 이런 산화제를 감마선과 병행하여 살균 처리 시 생성된 강력한 라디컬 생성에 의한 미생물의 핵산 구조의 변형을 유도함으로써 보다 향상된 살균효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 감마선의 가장 장점인 강력한 에너지에 의한 미생물의 살균 능력과 감마선 조사 전에 강력한 라디컬을 생성하는 persulfate를 사용하여 미생물의 살균효율을 조사하고자, 수처리에서 살균효율의 생물학적 지표미생물(Rincón and Pulgarin 2004)로 사용되는 *Escherichia coli* K12 (*E. Coli* K12)를 대상으로 살균효율을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주 및 배양

본 연구에서 사용한 실험균주 *E. Coli* K12 (ATCC 23716)는 한국미생물 보존센터로부터 분양받아서 본 실험의 균주로 사용하였으며, 배양특성 및 배양조건은 다음과 같다. 사용된 *E. Coli* K12는 37°C에서 24 hr Nutrient agar (Difco REF 213000)에서 자란 single colony를 Nutrient broth (Difco REF 24000)에 접종하여 37°C에서 24 hr 동안 약 150 rpm으로 shaking incubation시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 감마선 조사장치

감마선 조사는 한국원자력연구원 내 방사능이 1.47×10^{17} Bq (397949 Ci)인 고준위 ^{60}CO source (MDS Nordion, Canada)를 이용하여 상온(20°C)에서 수행하였으며, 감마선 조사에 사용한 시료는 15 ml conical tube에 시료를 완전히 채운 후 흡수선량 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 kGy (1 kGy=1 kJ · kg^{-1})로 각각 달리하여 조사하였다.

3. Persulfate 제조

0.01 mM sodium persulfate ($Na_2S_2O_8$, 98% Aldrich Chemical Co., Ltd., USA)를 사용하였고, 모든 용액은 정제수 (Millipore Inc., USA)로 준비하였다.

4. 실험균주 분석

실험균주의 개체수 분석방법은 plate count method를 사용하였고, 사용한 배지는 Nutrient agar를 사용하였다. 감마선 조사 전 실험균주의 개체수는 약 10^7～10^8 CFU ml^{-1} 정도로 0.1 M phosphate-buffer를 이용하여 희석하여 사용하였으며, 처리수를 nutrient agar plate에 도말한 다음 37°C의 incubator에 24 hr 동안 배양하였다. 형성된 colony는 계수되고, 살균 전·후의 개체수를 비교하여 살균 장치에 의한 불활성화를 평가하였다.

5. 미생물 형태 관찰

살균 처리한 *E. Coli* K12를 8,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 pellet에 2.5% glutaraldehyde를 넣고 4°C에서 2시간 동안 고정한 후 멸균된 1 mM PBS로 3번 세척하였으며 여기에 세척된 균을 1% osmium tetroxide를 넣고 1시간 동안 4°C에서 보관한 후 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 다음 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%

ethanol (EtOH)을 이용하여 순차적으로 탈수시킨 후 isoamyl acetate : 100% EtOH=0.5 : 1.5, isoamyl acetate : 100% EtOH=1 : 1, isoamyl acetate : 100% EtOH=1.5 : 0.5 비율로 섞어 만든 용액에 순차적으로 넣고 각각 15분 동안 반응시킨 후, 마지막으로 100% isoamyl acetate에 처리한 뒤 24 hr 건조하고 gold 코팅을 한 뒤 주사전자현미경 (JSM-6390, JEOL., Japan)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 논의

1. Gamma radiation 조사 영향

Fig. 1은 다양한 감마선 흡수선량에 따른 *E. Coli* K12의 살균 효율결과이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 조사하기 전 *E. Coli* K12의 세균수는 3.27×10^{9} CFU ml^{-1}이었고, 흡수선량 0.2 kGy에서는 4.67×10^{8} CFU ml^{-1}로 살균 효율은 85.73% (0.85 log)로 나타났다. 이어서 흡수선량을 0.3 kGy에서 0.4 kGy, 0.5 kGy, 0.7 kGy로 증가시킴에 따라 살균효율은 각각 90.01% (1 log), 94.29% (1.24 log), 98.36% (1.78 log), 99.99% (4.89 log)로 각각 증가하였으며, 감마선만을 조사하여도 비교적 높은 살균 효율을 나타내어 감마선의 살균능력을 확인할 수 있었다. 일반적으로 정수처리 공정에서 요구하는 불활성화 목표기준이 3 log (99.99%) 이상인 점을 고려해 본다면 감마선만을 이용하여 *E. Coli* K12를 살균하고자 할 경우는 0.7 kGy 이상의 흡수선량이 필요함을 알 수 있다.

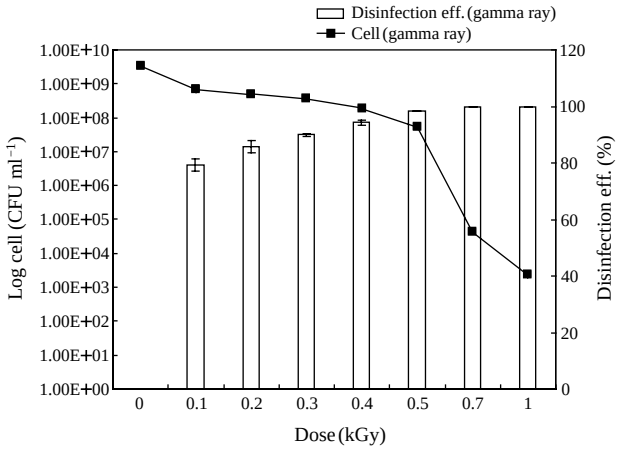

Fig. 1. The disinfection efficiencies of *E. Coli* K12 by gamma radiation.

2. Persulfate 첨가 영향

감마선 조사하기 전에 0.01 mM sodium persulfate를 첨가한 뒤 살균 효율을 조사한 결과, Fig. 2에서 보여지는 바와 같이 조사전 *E. Coli* K12의 세균수는 1.51×10^{9} CFU ml^{-1}이었고, 흡수선량 0.2 kGy에서 persulfate를 첨가한 경우, 1.13×10^{8} CFU ml^{-1}로 92.51% (1.13 log)였고, 0.4 kGy에서 99.78% (2.66 log), 0.5 kGy에서는 99.98% (3.71 log), 1 kGy에서는 99.99% (6.47 log)로 감마선만 조사한 경우보다 높은 살균효율을 나타내었다. 이와 같이 persulfate 첨가에 따라 살균효율이 증가되는 이유는 수용액 상태에서 sulfate 라디칼이 존재할 경우에는 다음과 같은 과정으로 hydroxyl 라디칼 (·OH)로 전환될 수 있으며, equation (1)은 모든 pH 영역에서, equation (2)는 알칼리 pH 영역에서 주로 일어나고 (Dogliotti *et al*. 1967; Pennington *et al*. 1968) 이러한 과정을 통해 생성된 sulfate 라디칼은 빠른 속도로 산화가 가능한 물질과 반응을 하게 된다.

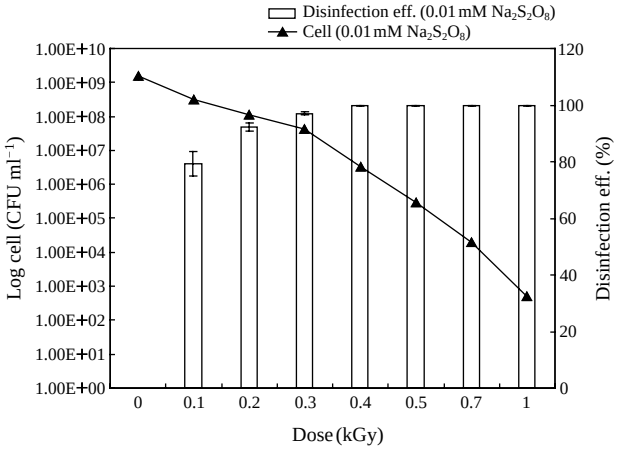

Fig. 2. The disinfection efficiencies of *E. Coli* K12 by gamma radiation with persulfate.

$$SO_4^{-}+H_2O\rightarrow SO_4^{2-}+\cdot OH+H^{+} \quad (1)$$

$$SO_4^{-}+OH^{-}\rightarrow SO_4^{2-}+\cdot OH \quad (2)$$

이렇게 생성된 sulfate 라디칼이 감마선에 의해 조사될 때 *E. Coli* K12의 살균은 감마선만 조사한 경우보다 persulfate에 의해 생성되는 ·OH 라디컬의 영향을 받아 낮은 선량에서도 살균 효율이 증가하는 것으로 사료되었다.

3. 살균처리 후 *E.Coli* K12의 형태적 변화

살균공정에 의해 미생물이 불활성화 되는 데 있어 가장 중요한 미생물의 구조적 특성은 미생물의 내·외부 구조와 관련이 있다. 이에 각각의 살균처리 후 *E. Coli* K12의 변화를 주사전자현미경 (SEM)으로 촬영한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 확인할 수 있듯이 감마선을

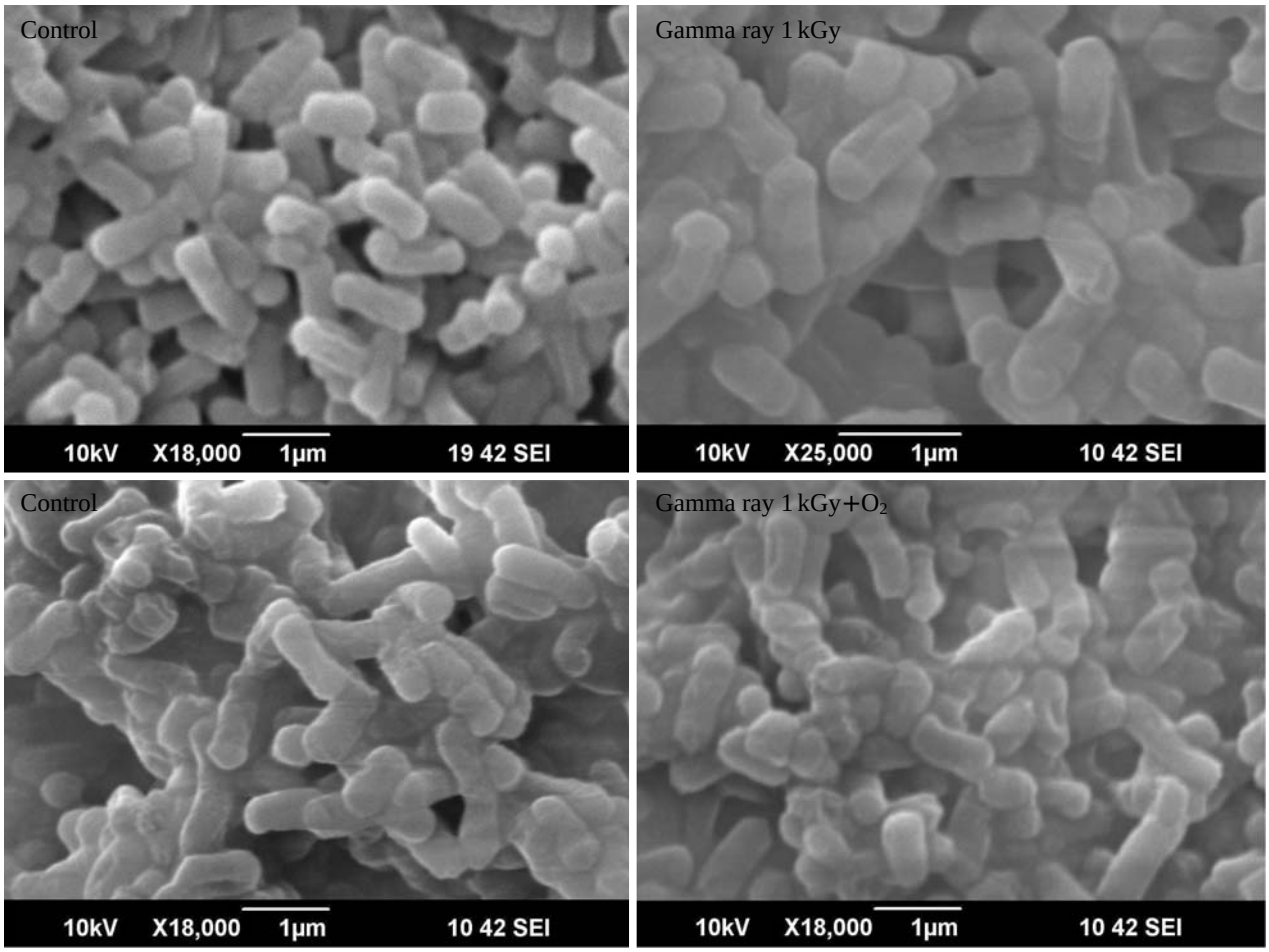

Fig. 3. Comparison of *E. Coli* K12 cell destruction with SEM (Scanning Electron Micrographs) results by irradiation.

조사하였을 때, 대조군에 비해 세포의 표면과 외벽층에 손상을 입은 것을 관찰할 수 있었다. 이와 동일한 조건에서 산소를 주입한 뒤 감마선을 조사한 경우, ·OH 라디컬이 많이 생성되는 것은 이미 알려져 있다(Hoffmann *et al*. 1999). 수용액 상태에서 산소는 ·OH 라디컬을 생성하여 세균의 DNA, 세포벽에 손상을 준다고 보고된(Anzai *et al*. 1999; Ksibi 2006) 바와 같이, 이러한 사항을 미생물 세포벽 손상 측면에 적용하여 볼 때, 산소의 존재는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 세포 표면과 외벽층에 훨씬 많이 손상을 주는 것으로 확인되었고, 이는 persulfate 첨가 후 감마선 조사에 의해 생성된 다량의 ·OH 라디컬도 영향을 받았을 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 persulfate의 첨가는 equation (1), (2)에서 얻어지는 ·OH 라디컬이 증가되어 미생물의 살균과 세포벽의 파괴에 영향을 주어 세포가 손상되어 대사활동 등의 세포 고유의 기능에 손상을 일으켜 사멸되는 것으로 판단되었다.

결 론

본 연구에서는 수처리에서 살균효율의 생물학적 지표 미생물로 사용되는 *E. Coli* K12 (Rincón and Pulgarin 2004)를 대상으로 감마선 및 persulfate를 이용하여 살균실험을 비교 분석한 결과, 감마선 단독으로 살균 처리를 하는 것보다 persulfate를 첨가하여 감마선을 조사하였을 때, 살균 효율이 1.78 log에서 3.71 log까지 증가하는 것이 확인되었고, 이는 정수처리 공정에서의 불활성화 목표기준인 3 log (99.99%) 이상 불활성화 되는 기준에 적합하다고 사료된다. 따라서 persulfate를 감마선과 병용하여 살균 처리 시 생성되는 다량의 라디컬 생성에 의해 한층 향상된 살균효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 앞으로 낮은 감마선 선량에서 3 log 이상의 살균효율을 얻기 위해서 persulfate의 농도를 높여서 실험이 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 원자력중장기 연구개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

송경호, 도시현, 이홍균, 조영훈, 공성호. 2009. 과황산 산화반응을 이용한 염소계 화합물(TCE, PCE) 분해에 관한연구. 대한환경공학회지. **31**(7):549-556.

Anzai K, Kunitaka O, Goto Y, Yamamoto H and Ozawa T. 1999. Oxidation dependent changes in the stablility and permeability of lipid bilayers. *Aantioxid. Redox Signal.* **1**(3):339-347.

Chick H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *J. Hygiene.* **8**:92-158.

Dogliotti L and Hayon E. 1967. Flash photolysis of persulfate ions in aqueous solutions. Study of the sulfate and ozonide radal anions. *J. Phys. Chem*. **71**:2511-2516.

Farooq S, Krurucz CN, Waite TD and Cooper WJ. 1999. Disinfection of wastewater: High-energy electron vs gama irradiation. *Wat. Res.* **27**(7):1177-1184.

Hoffmann MR, Martin ST, Choi WY and Bahnemann DW. 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev*. **95**:69-96.

Huang KC, Zhao Z, Hoag GE, Dahmani A and Block PA. 2005. Degradation of volatile organic compounds with thermally activated persulfate oxidation. *Chemosphere* **61**:551-560.

Ksibi M. 2006. Chemical oxidation with hydrogen peroxide for domestic waterwater treatment. *J. Chem. Eng*. **119**:161-165.

Oyane I, Furuta M, Stavrache CE, Hashiba K, Mukai S, Nakanishi M, Kimata I and Maeda Y. 2005. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* by ultrasonic irradiation. *Envrion. Sci. Technol.* **39**:7294-7298.

Pennington DE and Haim A. 1968. Stoichiometry and mecahnisms of the chromium(II) peroxydissulfate reaction. *J. Am. Chem. Soc*. **90**:3700-3704.

Rincón A-G, Pulgarin C. 2004. Field solar *E. Coli* inactivation in the absence and presence of TiO_2: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection. *Solar Energy* **77**:635-648.

Yoo DH, Park SW, Jung YD, Kim JB, Lee MJ and Kang JW. 1999. Disinfection study of bacteria in sewage by γ-ray and ozone/γ-ray irradiation. *J. of KSEE*. **21**(4):635-641.

Yoon TH, Lee YJ, Rhee OJ, Lee EK, Kim H, Lee DC and Nam SH. 2002. Heterotrophic bacteria in terms of free chlorine residuals in water distribution systems. *Kor. J. Environ. Healt.* **28**(3):9-18.

Manuscript Received: February 24, 2011
Revision Accepted: February 28, 2011