Journal of the Korean Society of Water and Wastewater
Vol. 20, No. 5, pp. 755-761, 2006

상하수도학회지, 논문
20권 5호, pp. 755-761, 2006

저압 및 중압 자외선 조사에 의해 불활성화된 *Pseudomonas aeruginosa*의 광회복능 조사

Investigation of Potential Photoreactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after LP or MP UV Irradiation

문성민 · 조민 · 윤제용*

Mun, Sung-Min · Cho, Min · Yoon, Je-Yong*

서울대학교 화학생물공학부

(2006년 8월 17일 논문 접수; 2006년 10월 12일 최종 수정논문 채택)

Abstract

Recently, there is growing interest in ultraviolet (UV) irradiation as a disinfection technic in drinking water production due to its effectiveness to inactivate microorganisms such as *Crytosporidium parvum* without forming disinfection byproducts. However, UV disinfection is known for its drawback such as photoreactivation.

Despite many works concerning the photoreactivation, most of works were focused on indicator or non pathogenic microorganisms. The objective of this study is to examine the photoreactivation of *Pseudomonas aeruginosa* which is an opportunistic pathogen as UV radiation by LP and MP UV lamp was applied. The result showed that *P. aeruginosa* had high photo repair efficiency regardless of the type of UV irradiation. Both of the effective log repair values of LP and MP UV irradiation were found approximately 2.6 log. In addition, photo repaired *P. aeruginosa* was not significantly different in forming biofilm in comparison with non treated *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Ultraviolet (UV) irradiation, Low-Pressure (LP) UV irradiation, Medium-Pressure (MP) UV irradiation, Photoreactivation, Biofilm

주제어: 녹농균, 자외선조사, 저압자외선조사, 중압자외선조사, 광회복, 생물막

1. 서 론

국내 정수처리 공정에서는 미생물 소독을 위해 주로 염소 소독제를 사용해 왔으나, 염소는 THMs과 같은 소독부산물을 생성하고 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)과 같은 원생동물의 소독에 비효과적인 단점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 염소 소독

*Corresponding author Tel: +82-2-880-8927, FAX: +82-2-876-8911, E-mail: jeyong@snu.ac.kr (Yoon, J.Y.)

제를 대체할 소독제로 오존(ozone) 및 UV와 같은 강력한 소독능을 가진 소독법에 대한 관심이 증가되고 있으며, 특히 UV 소독은 잔류성이 없고 소독부산물 생성 위험이 없어 정수 및 하수처리 소독기술로 관심이 증대되고 있다(조, 2004).

그러나 UV 소독에 있어서는 미생물이 UV 소독 후 근자외선(near UV) 또는 가시광(visible) 영역의 빛에 노출되게 되면 UV에 의해 손상된 DNA가 회복되는 광회복(photoreactivation)을 일으킬 수 있다. 이러한 광회복 현상은 많은 연구자들에 의해 연구가 되었으며(Hanawalt, 1975; Harm, 1980; Lindenauer, 1994), 미생물의 광회복은 UV조사량, 광회복 빛에 대한 노출 시간(photoreactivating light), 미생물의 종류 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Karl, 1994; 윤, 2003). 또한, Oguma(2002)와 Zimmer(2002) 등은 254nm의 단일 파장을 방출하는 저압(low pressure; LP) UV 조사와 200~600nm 사이의 다파장을 방출하는 중압(medium pressure; MP) UV 조사에 따른 *E. coli*의 광회복 연구에서 UV 램프 종류에 따라 미생물의 광회복이 다를 수 있음을 보고하였다.

UV소독법이 널리 보급되면서 인체에 질병을 일으킬 수 있는 병원성 미생물의 광회복능에 대한 관심이 커지면서 *E. coli* O157, *Legionella pneumophila* 등 일부 병원성 미생물의 광회복능에 대해서 조사가 되었으며, 질병과 관련이 많은 미생물 종에 대한 광회복능 조사가 중요함을 보고하였다(Tosa, 1999; Oguma, 2004). 한편, 최근 공공 수영장에서 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)을 가지고 있는 환자에게 치명적인 *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*) 검출이 보고 되었으며(Barben, 2005), *P. aeruginosa*는 생물막(biofilm)을 형성하는 주된 종으로 알려져 있어 기회감염균(opportunistic pathogen)인 *P. aeruginosa*에 대한 광회복을 확인하는 일이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 방출 파장이 서로 다른 LP와 MP UV를 이용하여 *P. aeruginosa*에 대한 광회복을 조사하였으며, 추가로 광회복된 *P. aeruginosa*가 생물막 형성에 기여하는지를 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미생물 배양 및 분석

본 연구에서 사용한 미생물는 *P. aeruginosa*(ATCC 700829) strain을 사용하였다. *P. aeruginosa*는 50mL tryptic soy broth(TSB, Difco 236950)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후에 원심분리를 통해 정제하였다. *P. aeruginosa*의 분석은 tryptic soy agar를 사용하여 도말평판법(spread plate method)를 통해 분석하였다.

2.2. UV 장치 및 실험

UV 소독 실험을 위해서 **Fig. 1(a)**의 collimated beam 장치를 사용하였다(조, 2004). 상부 램프로부터 반응기 사이에는 직경 10cm, 길이 38cm의 원통형 collimated tube를 사용하여 UV 램프로부터 수직으로 빛이 조사되게 하였으며, UV 강도는 램프와 반응기의 간격을 조절하여 사용하였다.

소독 실험에 사용된 UV 램프는 4 W LP 수은 램프(Philips, Holland)와 125W MP 램프(Helios italquartz,

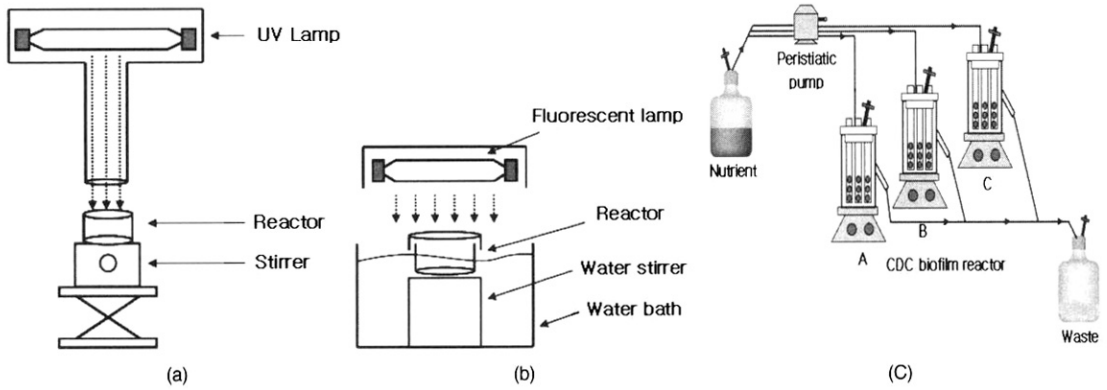

Fig. 1. Scheme of UV disinfection device (a), photoreactivation system (b), and biofilm reactor system (c)

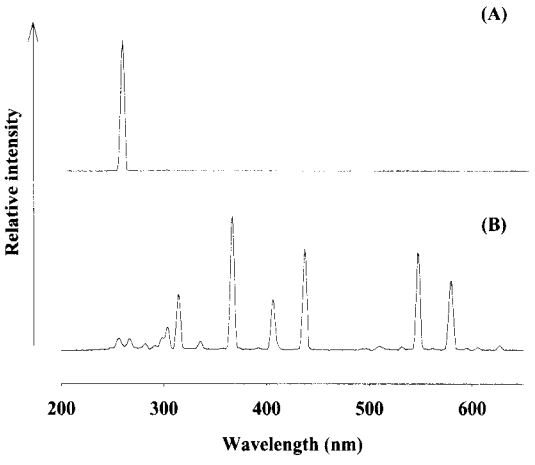

Fig. 2. Emission spectra of LP (A) and MP (B) UV lamp.

Germany)를 사용하였으며, LP와 MP UV 램프의 방출 파장은 Spectrapro-500 spectrometer(Acton Research Co., USA)로 측정하였다(**Fig. 2**). 반응기는 직경 8cm, 높이 4cm의 유리 petri-dish를 사용하였다.

UV 소독 실험은 멸균된 glass petri-dish에 50mL 반응용액을 넣어 25°C에서 수행하였으며, 반응용액은 pH 7.2로 유지하기 위해 멸균된 증류수에 0.5M 인산완충 용액을 사용하였고, *P. aeruginosa* 초기 농도는 약 5×10^5 CFU/mL로 하였다. *P. aeruginosa* 불활성화는 실험 시간 동안 살아남은 비율을 $\log_{10}$로 표현하였다.

2.3. 광회복 실험

광회복 실험을 위해 **Fig. 1(b)**의 광회복 시스템을 제작하여 사용하였다. 광회복 실험에는 18W 형광 램프(Philips daylight, Holland)를 사용하였으며, 램프와 반응기 사이의 거리를 조절하여 0.05mW/cm^{2}의 빛의 세기로 실험 하였으며 형광 램프의 강도는 radiometer (UVP radiometer, UVX-36, USA)를 사용하여 측정하였다. 형광 램프에서 발생하는 열의 영향을 방지하기 위하여 항온조를 이용하여 20°C로 유지하였으며, 실험 동안 수증기 증발 및 오염 방지를 위해 petri-dish 커버를 덮어 수행하였으며 커버에 의한 빛 세기 변화는 무시할 수 있는 수준이었다.

광회복 실험은 위의 UV 소독 실험으로 *P. aeruginosa*를 불활성화 시킨 후 반응기를 그대로 **Fig. 1(b)**의 광회복 시스템으로 옮겨 형광을 조사하였다. 형광 조사 시간은 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180분에서 측정하였다. UV 조사량에 따른 광회복능 실험은 약 10^6 CFU/mL의 초기농도를 LP와 MP UV 조사시간을 달리하여 조사한 후 위의 광회복 실험 조건에서 동일하게 형광 90분 조사 후에 광회복능을 확인하였다.

UV 살균 후 광회복 정도의 표기는 연구자들에 따라 조금씩 다르게 사용되어 왔으며(윤, 2003), 본 연구에서는 형광 조사 후 되살아난 *P. aeruginosa*의 비율을 survival ratio(Tosa, 1999; Oguma, 2004)로 나타내었으며, UV 조사시간에 따른 광회복능은 log increase(Karl, 1994)를 사용하여 나타내었다(식 1, 2).

$$\text{Survival ratio} = N_t/N_0 \qquad \text{식 1}$$

where, N_t = number of organisms at the time t

N_0 = number of organisms before UV irradiation

$$\text{Log increase} = \log(N_{pr}/N) \qquad \text{식 2}$$

where, N = number of organisms prior to UV irradiation

N_{pr} = number of organisms after photoreactivation

2.4. 생물막 실험

실험에 사용된 생물막 시스템은 **Fig. 1(c)**과 같으며, 반응기는 CDC(centers for disease control) 생물막 반응기(BioSurface Technologies Co., MT. USA)를 사용하였으며, 투명한 유리 재질로 부피는 350mL이고, 반응기 내부에는 샘플링을 위해 8개의 polypropylene 막대가 있으며, 각 막대에는 3개의 쿠폰이 설치되어 있다. *P. aeruginosa* 약 4×10^6 CFU/mL의 초기 농도를 LP, MP UV 램프로 약 3 log 불활성화 시켜 약 4×10^3 CFU/mL로 만들었으며(A, B), 대조군으로는 UV 처리를 하지 않은 *P. aeruginosa* 4×10^3 CFU/mL를 준비하였다(C). 준비된 각각의 실험용액을 300mL 1/500 TSB 희석액이 담겨 있는 CDC 생물막 반응기에 넣어 교반하여 모두 약 6×10^2 CFU/mL의 초기 농도가 되게 준비하였다. 광회복 조건에서는 형광 램프 3개를 각 생물막 반응기에 90분 동안 조사하였으며, 암조건에서는 형광 램프 조사 없이 알루미늄

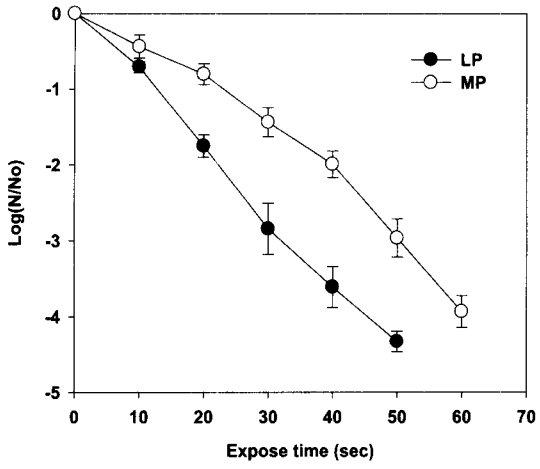

Fig. 3. Inactivation of *P. aeruginosa* by LP and MP UV expose time.

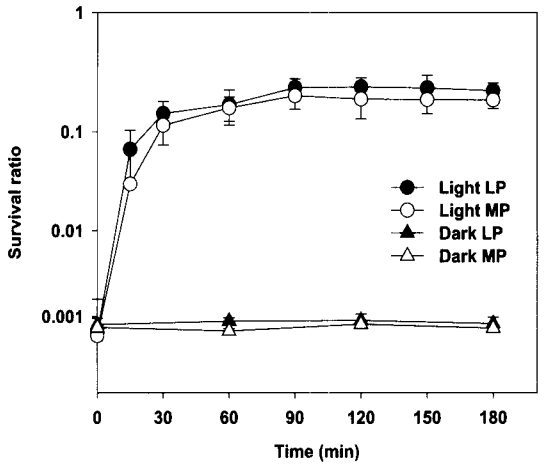

Fig. 4. Survival ratio of *P. aeruginosa* during fluorescent light exposure after inactivation by LP or MP UV irradiation.

호일로 덮어 두었다. 이후 1/500 TSB 희석액을 3.2mL/min 유속으로 3일간 연속적으로 주입하였으며, 8시간 간격으로 생물막 형성을 모니터링 하였다. 모든 반응기는 실내 형광등에 의한 영향을 배제하기 위하여 알루미늄 호일로 덮어 두었다.

생물막 분석은 0.2% Tween® 20(Aldrich Co., USA)을 첨가한 5mL phosphate buffer solution에 생물막 쿠폰을 넣고 1분간 2회에 걸쳐 sonication(60Hz, Hwashin tech, Korea)을 한 후 vortex(Vortex genie 2, scientific industries, USA)로 충분히 섞어준 뒤에 시료를 희석하여 도말평판법을 이용하여 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LP와 MP UV 조사에 의한 *P. aeruginosa*의 불활성화

Fig. 3은 LP와 MP UV 조사에 의한 *P. aeruginosa*의 불활성화 결과로 실험조건에서 *P. aeruginosa* 3 log 불활성화에 필요한 시간은 LP와 MP UV 각각 약 32, 50초였다. **Fig. 3**에서 LP UV가 MP UV보다 *P. aeruginosa*의 불활성화가 좋은 것으로 보이나 이는 동일한 UV 조사량으로 나타낸 결과가 아니며, 시간에 따라서 표현한 것으로 실제 MP UV 조사량에 대해서 계산되어 지면 LP UV와 거의 유사한 비율로 불활성화 곡선이 나타날 것으로 예상된다(Zimmer, 2002).

일반적으로 소독제에 의한 미생물의 소독능은 소독제 농도(C) × 접촉시간(T)으로 표현하나 UV 소독에서는 소독제 농도 대신 자외선 세기(UV Intensity, mW/cm^2)와 접촉시간(sec)의 곱인 IT 개념으로 표현하며, 단위는 자외선 조사량(UV Dose, mWs/cm^2 또는 mJ/cm^2)으로 나타낸다.

LP UV 조사에 의한 *P. aeruginosa* 3 log 불활성화 UV 조사량은 약 1.6mJ/cm^{2}으로 조사되었으며, 문헌상의 *E. coli* 3 log 불활성화 UV조사량 3.5~7.3 mJ/cm^2(Harris, 1987; Chang, 1985)과 비교하여 UV 저항성이 매우 약한 것을 알 수 있었다. 한편, Hassen (2000)의 연구에서 사용된 *P. aeruginosa*(ATCC 15442) 균주(strain)의 경우 UV 저항성이 매우 강한 것으로 보고 한데 반하여 본 실험에서 사용된 *P. aeruginosa*는 *P. aeruginosa* 균주 중에서도 상대적으로 UV 저항성이 약한 것으로 나타났다.

3.2. LP와 MP UV 조사에 의해 불활성화된 *P. aeruginosa*의 광회복

Fig. 4는 *P. aeruginosa*의 광회복을 보여주는 그림으로 LP와 MP UV 조사로 약 3 log 불활성화 시킨 후 형광을 조사하여 광회복능을 확인한 결과이다. LP와 MP UV 모두에서 형광 조사 후 15분 내에 약 2 log 정도의 급속한 광회복 후 90분까지 완만하게 광회복되었으며, 광회복 경향 및 크기 차이는 거의 없었다. 본 실험에서 *P. aeruginosa*의 최대 광회복능은 형광 조사 90분 후로 LP와 MP UV 각각 약 2.6, 2.5 log로

상하수도학회지, 논문
20권 5호, pp. 755-761, 2006

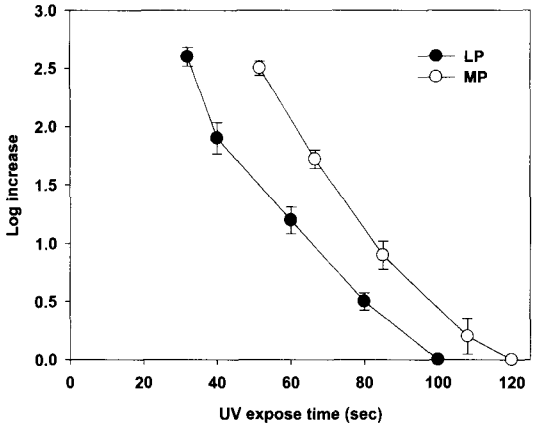

Fig. 5. Log increase due to photoreactivation as a function of LP and MP UV expose time.

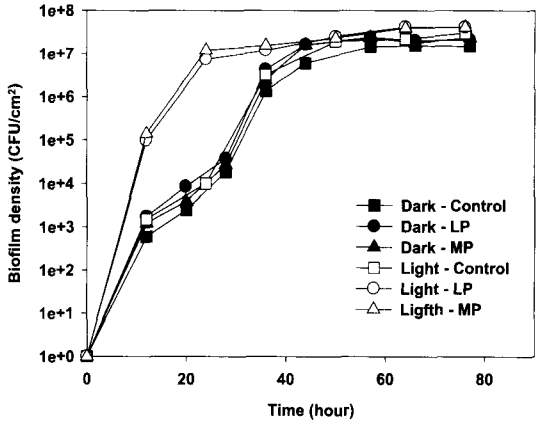

Fig. 6. Biofilm growth of P. aeruginosa treated by LP and MP UV irradiation under light and dark condition.

조사되었다. 또한, LP와 MP UV 조사에 의해 불활성화된 *P. aeruginosa*는 **Fig. 4**에서 볼 수 있듯이 암회복은 관찰되지 않았다. Karl(1994)은 UV에 불활성화된 미생물의 광회복 및 암회복은 미생물의 종(species)와 동일 종에서도 균주에 따라 차이가 날 수 있다고 보고하고 있어 이러한 원인에 기인한 것으로 판단된다. 한편, Oguma(2002) 연구에서는 *E. coli*의 경우 LP UV 조사에 의해 3 log 불활성화된 후 형광 조사 60분까지 약 2 log 정도 광회복 되지만, MP UV 조사에 의해 3 log 불활성화 후에는 약 0.5 log 정도 광회복이 일어나 LP와 MP UV조사에 의한 *E. coli*의 광회복에 뚜렷한 차이가 있음을 보고하였으며, 이러한 이유로 LP UV 조사에 의해서는 주로 254nm 파장에 의한 *E. coli*의 DNA에 직접적인 불활성화를 입히지만, MP에 의해서는 254nm 파장 외에 220~300nm 파장 영역에 의해 *E. coli*의 DNA에 직접적인 불활성화 뿐만 아니라 광회복을 수행하는 효소들까지 영향을 주어 광회복능이 떨어진 것으로 설명하였다. 그러나, 본 연구에 사용된 *P. aeruginosa*의 경우는 *E. coli*와 달리 LP와 MP UV 조사 모두에서 광회복이 잘 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 그 이유에 대해서는 명확히 알 수는 없으나 미생물 종류에 따라서 LP와 MP UV 조사에 대한 영향이 달리 나타나는 것으로 판단된다.

3.3. UV 조사량에 따른 광회복

Fig. 5는 LP와 MP UV 조사 시간에 따른 *P. aeruginosa*의 광회복을 살펴본 결과로 LP와 MP UV 모두에서 UV 조사 시간 증가에 따라 광회복이 줄어들며, LP와 MP UV 각각 약 100, 120초 이상 노출되면 더 이상 광회복이 일어나지 않는 것으로 조사되었다. 이는 미생물이 일정량 이상의 UV 조사량에 노출되면 더 이상 광회복을 할 수 없는 것으로 알려져 있어(Karl, 1994) LP와 MP UV 조사 시간 증가에 따라 *P. aeruginosa* DNA dimmer의 양이 광회복을 일으킬 수 있는 수준 이상으로 증가하였기 때문으로 판단된다.

3.4. 광회복된 *P. aeruginosa*의 생물막 형성

Fig. 6은 LP와 MP UV 조사 후 광회복이 일어나는 조건이 주어졌을 때 생물막 생성 속도 차이를 암조건 및 UV처리를 하지 않은 대조군과 함께 비교한 결과이다. *P. aeruginosa*에 의한 생물막은 일정 농도 이상이 되면 더 이상 급격한 생물막 농도 증가가 없게 되는 안정기(steady-state)에 도달하게 되는데(Peyton, 1996), 본 연구에서 *P. aeruginosa* 생물막 안정기의 농도는 10^7-10^8 CFU/cm^{2}이었다. **Fig. 6**에서 보이는 바와 같이 LP와 MP UV 조사 후 광 조건에서는 생물막 형성이 빠르게 진행되어 24시간 후에 안정기에 도달한 반면, 암조건 및 대조군에서는 이보다 오래 걸려 40시간 이후에 안정기에 도달 하였다. 이는 광 조건에서 광회복된 *P. aeruginosa*에 의해 초기 농도가 증가된 결과로 *P. aeruginosa*는 UV 소독 후에 광회복 조건이 주어지면 빠르게 광회복되며, 광회복된 *P. aeruginosa*는 생물막 형성에 기여한다는 것을 확인 할

수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 LP와 MP UV 조사에 의해 불활성화된 *P. aeruginosa*의 광회복능 및 생물막 형성 영향을 조사하였으며 그 결과는 요약하면 다음과 같다.

1. LP와 MP UV 조사에 의한 *P. aeruginosa* 3 log 불활성화에 필요한 UV 조사 시간은 LP와 MP UV 0.05, 0.06mW/cm^2 세기에서 각각 약 32, 50초로 조사되었으며, *E. coli*보다 상대적으로 UV 저항성이 약한 것으로 나타났다.

2. LP와 MP UV 조사에 의해 3 log 불활성화된 *P. aeruginosa*는 형광 조사 30분 내에 LP와 MP UV 모두에서 2 log 이상 빠른 광회복을 보였으며 30분 후부터는 서서히 광회복이 진행되어, 90분 후에 LP와 MP UV 각각 약 2.6, 2.5 log의 최대 광회복을 보였다. 반면, LP와 MP UV 모두에서 광회복은 관찰되지 않았다.

3. *P. aeruginosa* 약 10^6 CFU/ml의 초기 농도에 LP와 MP UV로 각각 약 100, 120초 이상의 UV를 조사하면 더 이상 광회복이 일어나지 않았으며, 일정 수준 이상의 UV조사량에 노출되게 되면 광회복이 더 이상 일어나지 않는 것을 알 수 있었다.

4. LP와 MP UV 조사에 의해 불활성화된 *P. aeruginosa*를 광회복 조건과 그렇지 않은 대조군 및 암회복 조건에서 생물막 형성을 비교한 결과 광회복 조건에서는 24시간 후에 생물막 안정기 농도에 도달 한 반면 대조군 및 암회복 조건에서는 40시간 이후에 도달하였다.

이상의 결과에서 *P. aeruginosa*는 낮은 LP와 MP UV 조사량에서 광회복 잠재력이 매우 큰 것으로 나타났으며, 광회복 된 *P. aeruginosa*는 생물막 형성에 기여한다는 사실을 확인 할 수 있었다. 따라서 UV 소독 시 미생물의 광회복 문제를 최소화 하기 위해서는 불활성화 대상이 되는 미생물의 UV 불활성화 및 광회복을 조사하여 광회복이 일어나지 않는 UV 조사량 이상으로 처리 하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 또한, 미생물 별로 광회복능에 차이가 있기 때문에 병원성 및 기회감염 미생물에 대한 광회복능 평가는 보건상의 문제와 관련되어 매우 중요한 일로 여겨진다.

감사의 글

연구는 2006년 두뇌한국 21사업 및 환경부 Eco-STAR Project인 수처리선진화사업단(과제번호: I2WATERTECH 04-3)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 윤춘경, 황하선, 정광욱, 함종화 (2003) 2차처리수의 농업용수로 재이용을 위한 UV 처리 후 지표미생물의 회복조사, *한국물환경학회지*, **19**, pp.533-542.
2. 조민, 김지연, 윤제용 (2004) UV 조사(Ultraviolet irradiation)에 의한 미생물의 불활성화, *첨단환경기술*, **2**, pp.5-18.
3. Barben, J., Hafen, G., Schmid, J. (2005) Pseudomonas aeruginosa in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, **4**, pp.227-231.
4. Chang, J.C. H., Osoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G., and Johnson, J.D. (1985) UV inactivation of pathogenic and indicator microorganism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, pp. 1361-1365
5. Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A., Damelincourt, J.J. (2000) UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device, *Bioresource Technology*, **74**, pp.141-150.
6. Harris, G.D., Adams, V.D., Sorensen, D.L., Curtis, M.S. (1987) Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria, *Wat. Res.* **21**, pp.687-692.
7. Harm, W. (1980) *Biological Effects of Ultraviolet Radiation*, Cambridge University Press. New York.
8. Hanawalt, P.C. and Setlow, R.B. (1975) *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*. p.3-12, Plenum Press, New York.
9. Lindenauer, K. G., and Darby, J. L. (1994) Ultraviolet disinfection of wastewater: Effect of dose on subsequent photoreactivation, *Wat. Res.*, **28**, pp.805-817.
10. Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. (2004) Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp, *Wat. Res.*, **38**, pp.2757-2763.

11. Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. (2002) Photoreactivation of *Escherichia coli* after Low- or Medium-Pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site sssay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp.6029-6035.
12. Peyton, B. M. (1996) Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density, *Wat. Res.*, **30**, pp. 29-36.
13. Tosa, K., and Hirata, T. (1999) Photoreactivation of Enterohemorrhagic Escherichia coli following UV Disinfection, *Wat. Res.*, **33**, pp.361-366.
14. Zimmer, J.L., and Slawson, R.M. (2002) Potential repair of Escherichia coli DNA following exposure to UV radiation from both Medium- and Low-Pressure UV sources used in drinking water treatment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp.3293-3299.