

과산화수소 증기를 이용한 다양한 쿠폰 표면의 *Geobacillus Stearothermophilus* 아포 제독조건

Decontamination Condition of *Geobacillus Stearothermophilus* Spore on the Surface of Various Coupons using Hydrogen Peroxide Vapor

김 상 훈*

Sang Hoon Kim

정 경 화*

Kyoung Hwa Jung

김 세 계*

Se Kye Kim

채 영 규*

Young Gyu Chai

김 윤 기**

Yun Ki Kim

황 현 철**

Hyun Chul Hwang

김 민 철**

Min Cheol Kim

박 명 규***

Myung Kyu Park

류 삼 곤***

Sam Gon Ryu

ABSTRACT

Biological decontamination means the removal of microorganisms from the inanimate object such as building or equipment. In this study, hydrogen peroxide vapor efficacy test using VHP 1000ED system(Steris LifeSciences) were conducted for *G. stearothermophilus* spore with agent materials(aluminum, stainless steel, poly-carbonate, viton, silicone, kapton and glass). Total recovered spores exposed to hydrogen peroxide vapor(1.0 g/min) during 7, 15, 30, 60 min were calculated. As a result, all agent materials were totally decontaminated within 60 min at 1.0 g/min concentration with 35% hydrogen peroxide vapor. Finally, we could confirmed that hydrogen peroxide vapor possess sporicidal capacity of *G. stearothermophilus* and found the optimum decontamination conditions with VHP1000ED system.

Keywords : *Geobacillus Stearothermophilus*, Hydrogen Peroxide Vapor(과산화수소 증기), Decontamination(제독), Spore (아포)

1. 서론

생물학적 제독이란 장비나 건물과 같은 무생물인 대

상으로부터 미생물들을 제거하고, 이를 통해 그 대상을 다시 사용하거나 혹은 안전한 상태에서 폐기가 가능하게 하는 것을 말한다^[1]. 2001년 미국에서 일어난 탄저균 테러 이후로 많은 제독 방법들이 개발이 되어 왔고, 특히 오염된 시설 및 장비에 의한 2차 감염과 경제적 손실 등을 최소화하기 위한 높은 효율성을 가진 제독제를 위한 연구가 이루어지고 있다^[2]. 이미 공공기관과 병원, 실험실 등에서는 과산화수소, 포름알

† 2013년 5월 18일 접수~2013년 7월 26일 게재승인

* 한양대학교

** 삼양화학공업(주)

*** 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 채영규(ygchai@hanyang.ac.kr)

데하이드, 이산화염소 같은 화학적인 제독제들을 항상 구비하며 사용하고 있다^[3].

과산화수소 액체는 100년 전부터 그 제독제로서의 살균력이 입증되어 사용이 되어왔고, 물질이나 표면 등의 제독과 무균 포장을 하는 용도로서 사용이 되어왔다^[2]. 반면에 과산화수소 증기의 경우, 20여 년 전부터 연구가 시작 되었으며, 최근 들어 제독제로서의 높은 효율성이 인정받아 활발히 연구가 진행되고 있다^[2]. 과산화수소 증기는 건물과 같은 특정 지역을 제독할 수 있고^[4], 제독 후의 잔여물이 적어 제독 대상의 재사용에 대한 가능성도 확보할 수 있다는 장점이 있다^[5]. 게다가 과산화수소 증기는 아포, 성장세균, 곰팡이, 신종 동물 바이러스 등의 다양한 생물을 효과적으로 제독한다^[5,6,8]

미생물의 대한 제독은 이전부터 많은 연구가 되어왔고, 미생물 중에서 저항성이 가장 강하다고 알려진 세균의 아포가 주로 제독연구의 대상이 되고 있다. 이 중에서, *Geobacillus stearothermophilus*(*G. stearothermophilus*) 아포는 이전부터 널리 사용되고 있는 생물학적 지표(BI : Biological Indicator)이다^[10]. *G. stearothermophilus* 균주는 *Bacillus* class에 속하며 열수구 같은 환경에서 성장하며, 특히 고온에 저항성이 있는 효소를 분비하여 열이나 화학물질에 강한 저항성을 지니는 세균이다^[9].

생화학적 제독을 위해 많은 제독 기기들과 시스템들이 구축되고 연구되어 왔다. 초반에는 병원과 실험실 등에서 멸균을 위한 목적으로 사용되던 기기들이, 2001년 미국에서 발생한 탄저균 테러가 일어난 시기를 기점으로 제독이라는 개념 하에 새롭게 개발되기 시작했다^[12]. 따라서 제독 시스템의 대상이 빌딩이나 도로, 장비 등으로 확대 되었으며, 모든 조건을 만족하기위해 여러 재질의 쿠폰을 제작을 통한 표면 제독 연구가 현재까지 진행되고 있다^[2,5].

정밀 전자/광학장비, 차량, 항공기 내부가 오염되었을 경우 기존 액상제독제는 부식성과 수분에 의해 손상이 될 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 정밀장비 또는 차량, 항공기 등을 구성하는 금속, 비금속, 코팅재료들로, 유리, 알루미늄 3종(일반, CARC, 애노다이징), 실리콘, 바이톤, 스테인레스 스틸, 폴리카보네이트, 캡톤 쿠폰을 사용하였다. *G. stearothermophilus* 아포와 과산화수소 증기를 주입할 수 있는 VHP1000ED 시스템을 이용, 9 종의 다양한 재질의 쿠폰을 대상으로 과산화수소 증기에 따른 아포의 최적 제독 조건을 확보

하고자 하였다.

2. 실험방법

가. 균주 및 쿠폰

본 실험에서는 40% 에탄올에 현탁된 *G. stearothermophilus*(ATCC 12980) 아포(1×10^8 Colony Forming Unit[CFU])를 MESA Labs(Colorado, USA)에서 구매하여 사용하였다. 쿠폰 재질로는 주변에서 흔히 볼 수 있는 재질로서 유리, 알루미늄 3종(일반, CARC, 애노다이징), 실리콘, 바이톤, 스테인레스 스틸, 폴리 카보네이트, 캡톤 쿠폰을 자체 제작하여 사용하였다 (Fig. 1).



Fig. 1. Biological Agent surrogate test coupons : 1.8 cm squares(S-Steel ; Stainless steel, PC ; Poly-Carbonate)

나. 과산화수소 증기 주입량에 따른 제독실험

VHP 1000ED 제독기를 이용하여 35%의 과산화수소를 기화시켜 과산화수소 증기로 만들어 본 제독실험의 제독제로 사용하였다. 이 과산화수소 증기를 992 × 587 × 698 cm로 제작된 챔버에 투입하였으며, 챔버 내 과산화수소 증기의 농도 분포의 변수를 고려하여 챔버의 정중앙부분에 1 × 10⁶ CFU의 *G. stearothermophilus* 아포가 접종된 유리 쿠폰을 놓았다.

제독 과정으로서, 먼저 과산화수소 증기의 주입을 위해 10분 동안 습도를 조절하고, 30분 동안 과산화수소 증기를 넣어 제독한 후 90분 동안 에어레이션을 통하여 챔버 내의 과산화수소 증기를 제거하였다. 과산화수소 증기의 주입량은 1.0 ~ 2.0 g/min까지 0.2 g/min 단위로 조절하여 실험하였고, 추가적으로 과산화수소의 증기 주입속도에 의한 차이를 확인하고자 주입 속도를 10 scfm(standard cubic feet per minute) 과 14 scfm으로 둘로 나뉘어서 진행하였다.

다. 쿠폰재질에 따른 아포의 회수실험

9종의 쿠폰에 1 × 10⁸ CFU의 *G. stearothermophilus* 아포가 현탁된 용액을 10 μl 접종하여, 5시간 동안 상온 건조 시켰다. 쿠폰 위의 *G. stearothermophilus* 아포 현탁액이 완전히 마른 뒤, 멸균된 완충액(PBS + 0.1% Triton X-100) 5 ml에 쿠폰을 넣고 10분간 초음파 분쇄(sonication)하였다. 이후, 2분간 와동(vortexing)하였고, 모든 거품이 제거 될 때까지 상온에 방치하였다. 거품이 제거 된 완충액으로부터 100 μl를 Bacto nutrient broth agar plate(Becton, New Jersey, USA)에 도말하였다. 도말한 배지를 55℃ 배양기에 넣어 하루 동안 배양한 뒤, 배양된 콜로니들을 계수하여, 회수된 *G. stearothermophilus* 아포 개수를 계수하였다.

라. 쿠폰재질에 따른 제독실험

과산화수소 증기의 주입량에 따른 실험과 동일한 제독 과정을 이용하여 9종의 쿠폰에 대한 제독 실험을 진행하였다. 과산화수소 증기의 주입량은 1.0 g/min으로 고정하였고, 주입 속도는 10 scfm으로 설정하였다. 9종의 쿠폰에 아포가 현탁된 용액을 접종하여 실험군으로 사용하였고, 7, 15, 30, 60분의 제독시간을 설정하여 재질별 최적 제독시간을 구하고자 하였다. 이를 통해 나온 결과는 아포 회수율을 기반으로 배양된 콜로니들을 계수하여 제독 여부를 측정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 실험 조건

아포의 생존력을 분석하는 실험으로써 아포의 개수는 이전에 연구된 결과들과 동일하게 1 × 10⁶ CFU로 결정하였다^[11,12]. 쿠폰 재질의 종류 또한 이전 연구들을 참조하여 제작하였으며 알루미늄 등 보다 한국에서 많이 발견할 수 있는 재질들을 위주로 제작하였다^[6,12].

분석 방법의 경우, 초음파 분쇄와 와동 시간에 따른 추출효율 실험을 자체적으로 진행하였고, 그 결과 초음파 분쇄 10분과 와동 시간 2분이 시간 대비 효율이 가장 좋게 나타났으며 이는 기존에 연구된 결과와 일치함을 확인하였다^[12](자료 미제시).

본 연구는 이전에 진행된 연구들에 비해 챔버 크기를 최소화한 축소형 연구이다^[2,7,12]. 이를 통해 과산화수소 증기의 밀집도의 차이를 줄여 외부 요인에 대한 가능성을 배제하고자 하였고, 사전 실험을 통해 일정한 농도가 측정되었던 챔버 내 정중앙에서 실험을 진행하였다(자료 미제시).

나. 과산화수소 주입량에 따른 제독 실험 결과

과산화수소 주입량에 따른 제독 실험은 쿠폰 재질별 실험을 진행하기 전 최적 기준을 설정하기 위한 실험이다. 아포 회수율이 가장 높게 나온 유리 쿠폰을 (6.9 × 10⁵ CFU/ml) 대표 쿠폰으로 사용하였으며, 증기의 유입속도에 따라 제독 결과가 달라진다는 선행연구의 결과에 근거하여, 주입 속도에 따른 제독능을 실험하였다^[12]. 그 결과 본 시스템에서의 주입 속도에 의한 차이는 관찰되지 않았지만, 이와 상관없이 최소 주입량 조건인 1.0 g/min에서 *G. stearothermophilus*의 아포가 제독이 가능하다는 결과를 얻었다(Table 1). 위의 주입량에 따른 제독실험은 과산화수소 주입량에 따라 챔버 내 농도가 올라가면서, 상대습도도 비례하게 변화하는 것을 동시에 확인하며 실험을 진행하였다. 또한 2.4 × 10⁶ CFU 개의 *G. stearothermophilus* 아포가 접종된 BI-Steel 쿠폰(Steris Life Sciences, Ohio, USA)을 통해 같은 조건에서 제독됨을 다시 한 번 검증 및 확인 하였다(Fig. 1).

다. 쿠폰재질에 따른 아포 회수실험 결과

쿠폰재질에 따른 아포 회수실험은 쿠폰 재질별 실험에 대한 분석에 대한 기초 실험이다. 전체 쿠폰들을 비교해본 결과, 유리 쿠폰(5.6 × 10⁵ CFU/ml)이 회수효

율이 높았으며, 반면에 바이톤 쿠폰(3.2×10^5 CFU/ml)의 경우는 회수효율이 낮았다(Fig. 2).

이것은 이전에 보고된 결과와는 상이한 결과이다^[13]. 이전 연구들을 통해, 상대적으로 낮은 회수 효율이 관찰되었던 실리콘, CARC 쿠폰으로부터 본 실험에서는 평균(4.3×10^5 CFU/ml)의 높은 회수 효율을 확인하였다. 반면, 높은 효율로 연구되었던 바이톤에서는 본 연구를 통해 3.2×10^5 CFU/ml로 낮은 회수 효율을 확인하였다. 이는 자체 제작을 하면서 생긴 차이로써, 같은 재질이라도 어떻게 제작하느냐에 따라 다른 회수율을 가진다는 것을 알 수 있다.

라. 쿠폰재질에 따른 제독실험 결과

쿠폰 재질별 최적 제독조건은 과산화수소 증기의 주입량 제독실험 결과를 바탕으로 진행하였다. 최소 주입량인 1.0 g/min, 주입 속도 10 scfm에서 쿠폰 재질별 실험을 진행하였고, 7분, 15분, 30분, 60분 동안 제독을 수행하였다. 이들 중 많은 연구자들이 평균적으로 사용하는 30분은 3번을 추가적으로 제독 실험을 수행하였다^[12-14]. 배양된 콜로니들을 통해 살아남은 아포의 개수를 측정하였고, 각 쿠폰별 아포의 회수율에 따라 결과물을 산출하였다.

그 결과, 알루미늄, 캡톤, 폴리-카보네이트, 유리가 15분에 제독이 되었으며 나머지 재질에서는 60분에 제독이 되는 것을 관찰하였다(Table 2). 특히 폴리카보네이트와 유리의 경우에선 최소 시간으로 잡았던 7분 제독에서도 모두 제독 되는 것을 관찰하였다. 바이톤의 경우, 선행 연구들의 60분에 제독되는 것과 마찬가지로 다른 쿠폰들에 비해 제독 시간이 길어 60분에 제독이 되는 것을 확인하였다^[12,13]. 그러나 상대적으로 짧은 시간(30분) 내에도 제독이 된다고 알려진 실리콘과 애노다이징에서는 본 실험을 통해 30분에도 살아남는 것을 확인하였으며 특히, 애노다이징에선 평균적으로 3.9×10^4 CFU/ml로 다수의 아포들이 살아남았다. 상대적으로 긴 시간(60분)의 제독이 필요하다고 알려진 CARC에서는 본 실험에서는 30분에 거의 제독이 되는 것을 관찰하였다^[12,13].

아포 회수율과 마찬가지로, 정밀장비 또는 차량, 항공기 등을 구성하는 금속, 비금속, 코팅재료에 따른 쿠폰 재질별 최적 제독조건은 쿠폰 재료에 따라 결과들이 다를 수 있다는 것을 알 수 있었고, 모든 다양한 재료들을 현 실험 조건으로 60분 동안 제독 하였을 경우, 완전 제독이 가능하다는 사실을 확인하였다.

Table 1. Decontamination efficacy of *G. stearothermophilus* spores(1.0×10^6 CFU) following hydrogen peroxide vapor exposure with 10 scfm and 14 scfm air flow. Hydrogen peroxide(1.0 ~ 2.0 g/min) were injected and *G. stearothermophilus* spores could not survived in whole conditions

Glass & Steel / Total spores recovered(CFU)						
Air flow (scfm ^{**})	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
10	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0

* CFU : colony forming unit
 ** scfm : standard cubic feet per minute

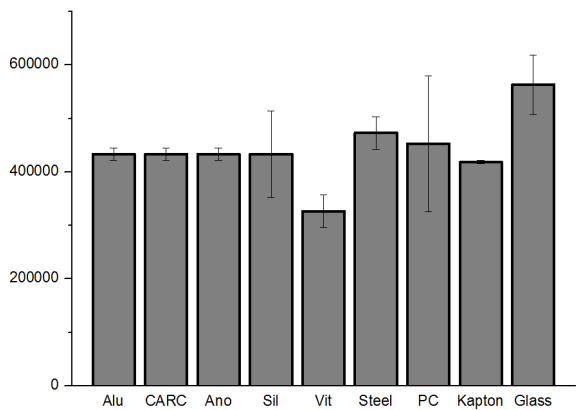


Fig. 2. Spore recovery results of test materials for *G. stearothermophilus* spore. This result showed that glass had the highest recovery efficiency, and viton the lowest(Alu ; Aluminum, Ano ; Anodizing, Sil ; Silicone, Vit ; Viton, Steel ; Stainless steel, PC ; Poly carbonate)

4. 결론

다양한 재질의 쿠폰들을 이용한 본 실험의 결과를 통해 992 × 587 × 698 cm 내의 공간에서 1.0×10^6 CFU/ml의 *G. stearothermophilus* 아포를 처리 할 경우, 1.0 g/min으로 주입되는 35 % 과산화수소 증기를 60분 동안 주입하여 제독 할 수 있다는 사실을 확인하였다.

Table 2. Hydrogen peroxide vapor efficacy test results for *G. stearothermophilus*. Total recovered spores were calculated from decontamination of hydrogen peroxide vapor(1.0 mg/min)

Test material / Total spores recovered(CFU)									
Time (min)	Alu*	CARC	Ano†	Sil‡	Vit§	Kap	Steel¶	PC#	Glass
7	5,500	1,000	270,000	8,033	15,300	333	3,566	0	0
15	0	33	220,000	3,867	6,200	0	533	0	0
30	0	50	101,667	0	1,800	0	217	0	0
30	0	0	24,667	733	683	0	0	0	0
30	0	0	533	500	3,950	0	0	0	0
30	0	0	27,450	17	267	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Aluminum, † Anodizing, ‡ Silicone, § Viton, || Kapton, ¶ Stainless steel, # Poly-carbonate

후 기

본 연구는 방위사업청과 국방과학연구소 건식제독 기술사업의 지원을 받아 수행하였으며, 이에 감사드립니다(UC100046ID).

References

- [1] M. W. Calfee, S. P. Ryan, J. P. Wood, L. Mickelsen, C. Kempter, L. Miller, M. Colby, A. Touati, M. Clayton, N. Griffin-Gatchalian, S. McDonald, and R. Delafield, "Laboratory Evaluation of Large-Scale Decontamination Approaches", *J Appl Microbiol*, Vol. 112, pp. 874~882, 2012.
- [2] N. A. Klapes, and D. Vesley, "Vapor-Phase Hydrogen Peroxide as a Surface Decontaminant and Sterilant", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 56, pp. 503~506, 1990.
- [3] T. L. Buhr, A. A. Young, Z. A. Minter, C. M. Wells, D. C. McPherson, C. L. Hooban, C. A. Johnson, E. J. Prokop, and J. R. Crigler, "Test Method Development to Evaluate Hot, Humid Air Decontamination of Materials Contaminated with *Bacillus Anthracis* Sterne and *B. Thuringiensis* Al Hakam Spores", *J Appl Microbiol*, Vol. 113, pp. 1037~1051, 2012.
- [4] C. Franco, and N. Bouri, "Environmental Decontamination Following a Large-Scale Bioterrorism Attack : Federal Progress and Remaining Gaps", *Biosecure Bioterror*, Vol. 8, pp. 107~117, 2010.
- [5] G. S. Graham, and J. R. Rickloff, "Development of VHP Sterilization Technology", *J Healthc Mater Manage*, Vol. 10, No. 54, pp. 56~58, 1992.
- [6] R. A. Heckert, M. Best, L. T. Jordan, G. C. Dulac, D. L. Eddington, and W. G. Sterritt, "Efficacy of Vaporized Hydrogen Peroxide against Exotic Animal Viruses", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 63, pp. 3916~3918, 1997.
- [7] J. W. Johnson, J. F. Arnold, S. L. Nail, and E. Renzi, "Vaporized Hydrogen Peroxide Sterilization of Freeze Dryers", *J Parenter Sci Technol*, Vol. 46, pp. 215~225, 1992.
- [8] M. Kokubo, T. Inoue, and J. Akers, "Resistance of Common Environmental Spores of the Genus *Bacillus* to Vapor Hydrogen Peroxide", *PDA J Pharm Sci Technol*, Vol. 52, pp. 228~231, 1998.
- [9] J. Krause, G. McDonnell, and H. Riedesel, "Biodecontamination of Animal Rooms and Heat-Sensitive Equipment with Vaporized Hydrogen Peroxide", *Contemp Top Lab Anim Sci*, Vol. 40, pp.

- 18~21, 2001.
- [10] J. A. Otter, and S. Yezli, "Are Commercially Available *Geobacillus Stearothermophilus* Biological Indicators an Appropriate Standard for Hydrogen Peroxide Vapour Systems in Hospitals?", *J Hosp Infect*, Vol. 80, pp. 272~273, 2012.
- [11] J. V. Rogers, C. L. Sabourin, Y. W. Choi, W. R. Richter, D. C. Rudnicki, K. B. Riggs, M. L. Taylor, and J. Chang, "Decontamination Assessment of *Bacillus Anthracis*, *Bacillus Subtilis*, and *Geobacillus Stearothermophilus* Spores on Indoor Surfaces Using a Hydrogen Peroxide Gas Generator", *J Appl Microbiol*, Vol. 99, pp. 739~748, 2005.
- [12] L. Teri, D. B. Mark, P. Jerry, "Biological-warfare Agent Decontamination Efficacy Testing : Large-scale Chamber mVHP Decontamination System Evaluation for Biological Contamination", Edgewood Chemical Biological Center, No. ECBC-TR-521, 2007.
- [13] L. Teri, D. B. Mark, P. Jerry, "Evaluation of the STERIS Sensitive Equipment Decontamination (SED) Apparatus on a 463L Pallet", Edgewood Chemical Biological Center, No. ECBC-TR-526, 2007.
- [14] K. R. Vipin, W. Lalena, S. S. Lisa, P. Jerry, "Surface Sampling-based Decontamination Studies and Protocol for Determining Sporicidal Efficacy of Gaseous Fumigants on Military-relevant Surfaces", Edgewood Chemical Biological Center, No. ECBC-TR-595, 2008.