Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 6, 539-544 (1989)

Campylobacter jejuni 에 대한 염소 및 Monochloramine 의 살균효과

윤만석 · 오학식 · 김치경*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Disinfection Effects of Chlorine and Monochloramine on *Campylobacter jejuni*

Yun, Man-Seok, Hak-Shik Oh and Chi-Kyung Kim*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

***Campylobacter jejuni*, bacterial agent causing human diarrhea, were studied for their disinfection effects with chlorine and monochloramine. The cells treated with the chemical agents were observed by scanning electron microscopy to know their morphological and structural changes. The proteins and DNA in the chemical-treated cells were also examined by gel electrophoresis for structural changes. When *C. jejuni* were chlorinated at concentrations of 0.5 and 1.0 mg/*l* for 15 minutes, the organisms were disinfected by 4 and 6 log, respectively. Those disinfection effects were higher at acidic pH, while lowered at neutral and alkaline values of pH. The effects of monochloramine were lower than those of chlorine at the same concentration for the same period of reaction time. The shapes of *C. jejuni* cells treated with the agents appeared to be deformed from spiral rod into spherical forms, showing some destruction in surface structure of the cells. Some of the proteins and DNA of the chlorinated cells did not appear in the gel electrophoresis when the chlorination was at concentration of 10 mg/*l* or higher.**

Campylobacter jejuni 는 인체에 감염되었을 때 설사질환을 일으키는 병원성 세균이라는 것이 Butzler 등(1), Blaser 등(2)에 의하여 보고됨으로서 *Salmonella, Shigella* 와 함께 중요한 병원세균으로 주목받고 있다(3). 이 세균은 자연계에서 많은 야생조류와 포유동물의 장 내에 normal flora 로 서식하고 있는데, 그들의 분변물이 자연계에 배출될 때에는 수질 및 토질환경에 오염된다. 이와 같이 분변물로 오염되어 있는 지표수에서 *C. jejuni* 는 상당기간 생존하다가 인체에 전파될 수 있다고 Rollins 등(4)과 김 등(5)이 보고하였다. 또 *Campylobacter* 에 의한 설사질환은 이 세균이 오염된 음용수를 섭취함으로써 발병되었던 예들이 Blaser 등(2)에 의하여 보고된 바 있다. 그러므로 가정의 음용수로 사용하고 있는 상수 뿐 아니라 하수의 염소 살균처리의 중요성은 더욱 높아졌다.

세균에 대한 염소의 살균기작에 관한 연구는 1946년 Green 과 Stumpf(6)에 의하여 최초로 보고된 후, Knox 등(7)은 탄수화물 대사과정에서 중요한 enzyme 들을 산화시킨다고 보고하였다. 그 외에 염소의 살균작용에 관해서는 protein 의 합성저해(8), 아미노산을 oxidative decarboxylation(9) 시키거나 nucleic acid 와 반응하여 chromosome 을 파괴(10)한다는 등의 보고가 있었다. 그러나 *C. jejuni* 에 대해서는 Blaser 등(11)이 염소와 monochloramine 의 살균효과를 보고했을 뿐 그 살균기작에 관해서는 아직 보고된 바 없다.

그러므로 *C. jejuni* 에 대한 여러가지 살균제의 살균효과를 측정하고 세균에 대한 살균기작을 밝히는 것은 상하수의 보다 효율적인 처리와 함께 이 세균에 의한 설사질환을 예방하는데 필요한 과제라 생각된다. 본 연구에서는 상하수 처리과정에서 사용하는 대표적인 화학살균제인 염소와 monochloramine 에 의한 *C. jejuni* 의 살균효과를 측정하고, 세포의 형

Key words: Disinfection, *Campylobacter jejuni*, chlorine, monochloramine
*Corresponding author

태구조에 미치는 영향을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 또 이들의 살균기작을 이해하기 위하여 단백질 및 DNA의 변화를 gel electrophoresis 방법으로 비교 조사하였다.

재료 및 방법

시험세균의 준비 및 배지

본 실험에 사용한 *Campylobacter jejuni*는 닭 내장으로부터 분리하였으며, 이들의 분리 및 증식을 위해서는 Oxoid(12) 및 조 등(13)의 방법에 따라 Butzler's agar media를 사용하였다. 시험균주는 CO_2 incubator나 candle jar를 사용하여 42℃에서 24시간 배양한 후 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하여 3번 이상 세척한 후 10^7-10^8 cell/m*l*로 조정하여 실험에 사용하였다.

염소 및 monochloramine 용액

염소용액은 sodium hypochlorite 용액(Hayashi Pure Chemical Ind.)을 멸균된 CDF(chlorine demand free) water를 사용하여 실험 직전에 필요한 농도로 희석하여 사용하였고 monochloramine 용액은 Blaser 등(11)의 방법에 따라 준비하였다. 염소와 monochloramine의 농도는 Standard Method (14)의 N,N-diethyl-p-phenylenediamine(DPD) colorimetric method에 의하여 측정하였으며, 실험에 사용한 모든 유리기구들은 염소나 monochloramine의 요구물질을 완전히 제거하였다.

염소 및 monochloramine 처리

C. jejuni 현탁액을 Blaser 등(11)의 방법에 따라 염소 및 monochloramine 용액에 혼합하여 18-20℃에서 magnetic stirrer로 일정시간 반응시킨 후 잔존 염소의 작용을 중지시키기 위하여 멸균한 sodium thiosulfate를 0.1%로 혼합하였다. 염소 및 monochloramine에 의한 살균실험은 0.5 mg/*l*와 1.0 mg/*l*의 농도에서 실시하였으며 살균효과에 대한 pH의 영향은 pH가 4.5, 7.0, 10.0 되도록 조정된 1.0 mg/*l*의 염소용액에서 실험하였다.

생존 세균수 측정

염소 및 monochloramine으로 처리한 후 *C. jejuni*의 생존 세균수는 김 등(5)의 방법에 따라 시료를 채취하여 0.85% 생리식염수로 십진희석한 다음 Butzler's agar plate에 도말하여 42℃의 CO_2 incubator 또는 candle jar에서 72시간 배양하여 생성되는 colony를 계수하였다. 5회 반복한 실험결과를 log Nt/No의 수식으로 survival fraction을 계산하여 그래프에 표시하였다.

주사전자현미경 관찰

*C. jejuni*에 염소 및 monochloramine을 처리하였을 때 세포형태의 구조에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Ng 등(15)의 방법에 따라 *C. jejuni*를 Butzler's agar media(Oxoid)에 점 접종하여 36-48시간 배양하였다. 단일 colony를 agar block과 함께 0.5 cm 되도록 절단하여 0.2 M phosphate buffer로 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 6시간 전고정한 후 0.2 M phosphate buffer로 3번 세척하고 다시 0.2 M phosphate buffer로 만든 1% OsO_4 용액에서 12시간 후 고정하였다. 이를 25, 50, 75, 90, 95, 100%의 ehtanol에서 각각 20분씩 연속적으로 탈수시킨 후 시료를 critical point dryer(Hitachi, HCP-2)로 건조시켜 gold coating한 다음 주사전자현미경(Hitachi, model S-507)으로 관찰하였다.

단백질 및 DNA의 검사

*C. jejuni*의 구조단백질에 대한 염소 및 monochloramine의 영향을 연구하기 위하여 화학살균제로 처리된 *C. jejuni*와 처리되지 않은 *C. jejuni*의 단백질은 Silhavy 등(16)의 방법에 따라 추출하였다. 이 단백질 시료는 SDS-polyacrylamide gel(10%)을 사용하여 100 V로 12시간 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R250으로 30-60분간 염색하고 destaining solution으로 탈색하여 비교 관찰하였다.

또 염소 및 monochloramine의 살균기작을 규명하기 위해서 살균제가 처리된 *C. jejuni*의 DNA를 Barnes(17)의 방법에 따라 추출하여 전기영동법과 spectrophotometry 방법으로 분석하여 처리하지 않은 DNA와 비교하였다. *C. jejuni*를 cracking buffer(50 mM NaOH, 0.5% SDS, 5 mM EDTA와 0.025% bromocresol green)에 현탁하여 68℃에서 60분 동안 incubation한 후 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. DNA가 포함되어 있는 상층액을 채취하여 0.7% agarose gel에서 80 V, 40 mA로 전기영동한 후 transilluminator 하에서 DNA band를 비교 관찰하는 동시에 spectrophotometer(Beckman, DU-65)를 이용하여 220-360 nm의 파장에서 Hayatsu 등(18)의 방법을 약간 변형하여 그 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

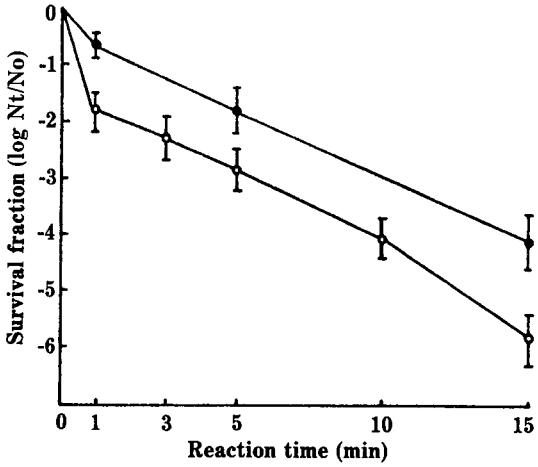

Fig. 1. Disinfection kinetics of *Campylobacter jejuni* by chlorination at the concentration of 0.5 mg/*l* (●) and 1.0 mg/*l* (○).

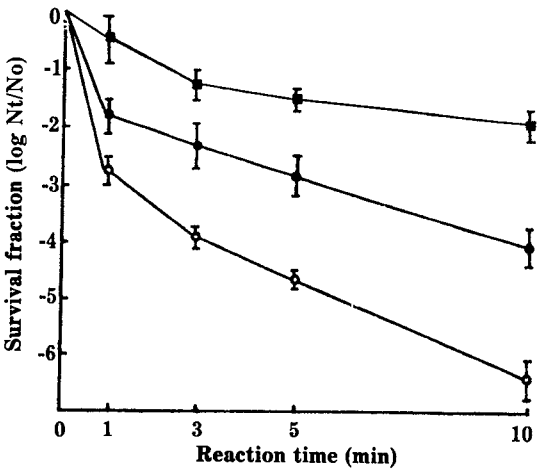

Fig. 2. Disinfection kinetics of *Campylobacter jejuni* by chlorination at the concentration of 1.0 mg/*l* and at pH 4.5 (○), 7.0 (●) and 10.0 (■).

염소 및 monochloramine의 살균효과

*Campylobacter jejuni*에 대한 염소의 살균효과를 0.5 mg/*l*와 1.0 mg/*l*의 염소용액(pH 7.0)에서 비교 실험하였다. 그 결과는 Fig.1에서와 같이 15분간 처리했을 때 10^7 cell/m*l* 중 각각 4, 6 log의 세균이 사멸되었다.

또한 pH에 따른 염소의 살균효과는 Fig.2에서와 같이 pH 4.5에서 10분간 처리했을 때 6 log 이상 사멸하였으나, pH 7.0과 10.0에서 10분간 처리했을 때에는 각각 1 log와 3 log가 사멸되어 pH 4.5에서보다 훨씬 낮은 살균효과를 나타냈다. 이 결과는 대부분 free chlorine이 산성의 염소용액에서는 hypochlorous acid(HOCl)로 존재하고 알칼리성에서는 hypochlorite ion(OCl^-)으로 존재하는데 세균에 대한 살균력은 hypochlorous acid가 hypochlorite ion보다 훨씬 높다는 일반적인 사실로 설명할 수 있다.

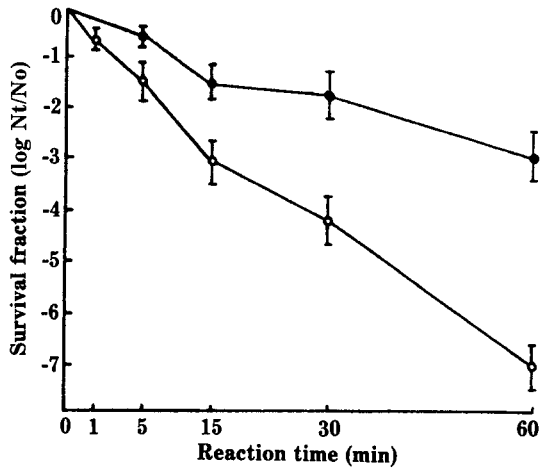

Fig. 3. Disinfection kinetics of *Campylobacter jejuni* by monochloramine at the concentration of 0.5 mg/*l* (●) and 1.0 mg/*l* (○).

Scarpino 등(19)은 *E. coli*에서 hypochlorous acid가 hypochlorite ion보다 살균력이 높다고 보고하였는데, 본 실험에서 *C. jejuni*는 그만한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 hypochlorous acid가 hypochlorite ion의 살균력 차이는 세균 strain과 시험 세균수 그리고 환경요인에 따라 차이가 있다고 한 Wang 등(20)의 보고로 해석할 수 있다.

염소처리 후 사용한 0.1% sodium thiosulfate는 염소용액에 1 : 1의 용량으로 첨가했을 때, free chlorine의 작용을 완전히 중지시킬 수 있었지만 *C. jejuni*에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

Monochloramine을 pH 7.0에서 0.5 또는 1.0 mg/*l*로 60분간 처리했을 때 *C. jejuni*의 살균효과는 Fig.3에서와 같이 각각 2, 7 log 정도였으며, 이 살균효과는 염소의 살균효과에 비하면 매우 낮은 것이다. 이와 같은 결과는 0.1 mg/*l*의 염소로 5분 동안 처리했을 때의 사멸효과가 1.0 mg/*l*의 monochloramine으로 15분간 처리했을 때의 사멸효과와 비슷하였다는 Blaser 등(11)의 보고에 의하여 긍정적으로 뒷받침된다.

*Campylobacter jejuni*의 형태 및 구조변화

정상적인 *C. jejuni*와 염소 및 monochloramine으로 처리된 *C. jejuni*의 형태를 주사전자현미경으로 비교 관찰해본 결과는 Fig.4와 같다. 정상세포

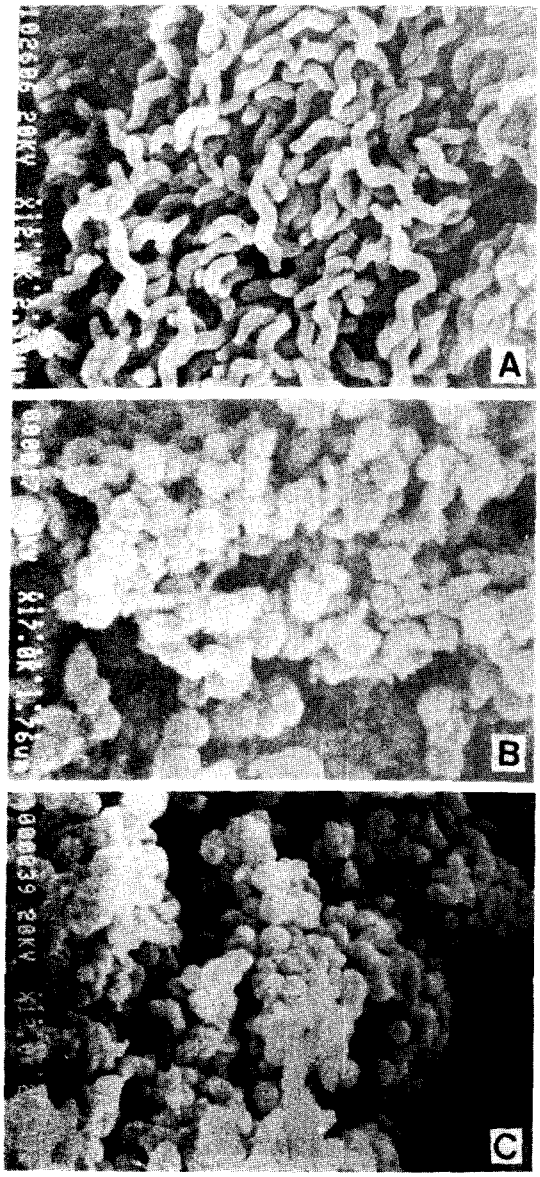

Fig. 4. Scanning electron micrographs of *Campylobacter jejuni* cells (A) in the intact colony grown for 36 hrs, *C. jejuni* cells (B) treated with 10 mg/*l* chlorine at pH 7.2 for 30 min, and *C. jejuni* cells (C) treated with 10 mg/*l* monochloramine at pH 7.2 for 30 min.

(Fig.4A)는 전형적인 나선간균이었으나 염소처리된 세포(Fig.4B)들은 나선형을 찾아볼 수 없이 모두 구형으로 변하였으며 세포 표면이 파괴되어 많은 포상구조를 나타냈고 또 서로 엉켜져 있는 예가 많았다.

Monochloramine으로 처리된 세포(Fig.4C)들은 부분적으로 나선형태를 유지하는 세포도 발견되었지만 대부분의 세포들은 구형 또는 부정형으로 변하였다. 세포 표면은 비교적 매끈하게 보여 염소처리된 세포에서와 같은 심한 표면구조의 파괴는 관찰되지 않았다. 이와 같이 염소처리에 의하여 세포 표면이 파괴된 것은 Foegeding 등(21)의 보고에서도 지적된 바 있다.

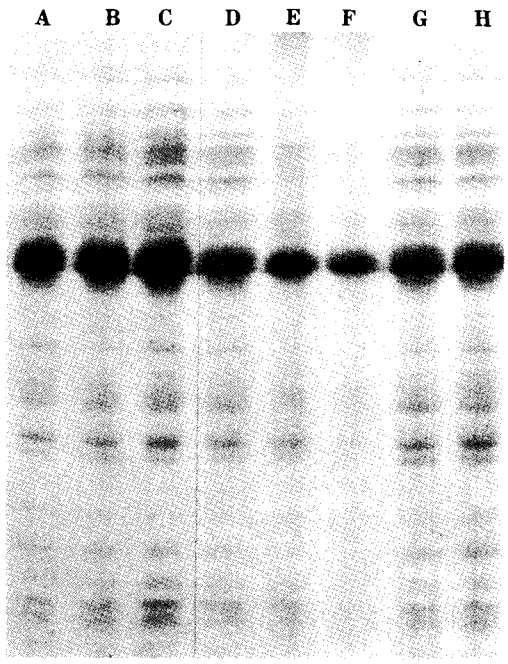

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the proteins isolated from normal and disinfected *Campylobacter jejuni*.
Lane A, control; Lanes D, E, F chlorine-treated cells at the concentration of 5.0 mg/*l*, 10.0 mg/*l* and 20.0 mg/*l* for 30 min; Lane G, H, monochloramine-treated cells at the concentration of 10.0 mg/*l* and 20.0 mg/*l* for 30 min. The arrow indicates the size of 66 kD.

단백질에 대한 영향

정상적인 *C. jejuni*와 살균제로 처리된 *C. jejuni*의 단백질을 분리하여 전기영동방법으로 검사한 결과는 Fig.5에서와 같이 정상세포의 단백질에 비하여 염소처리한 세포에서는 대부분의 단백질이 검출되지 않았는데 그 정도는 염소용액의 농도에 비례하였다. 5 mg/*l*에서 30분간 처리한 세포에서 추출한 단백질 band(lane D)는 정상적인 *C. jejuni*에서 추출한 단백질 band(lane A)와 별 차이가 없었지만 20 mg/*l*로 30분간 처리한 *C. jejuni*에서 추출한 시료에서는 (lane F) 거의 모든 단백질 band가 나타나지 않았다. 이것은 염소처리에 의해서 구조단백질이 파괴되

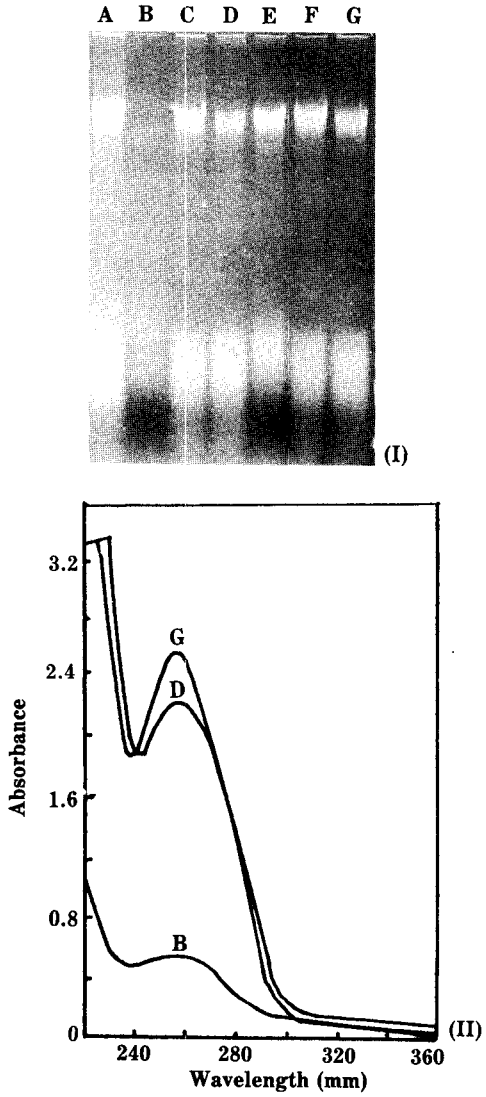

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis (I) and spectrophotogram (II) of the DNA isolated from the *Campylobacter jejuni* cells treated with chlorine and monochloramine.

Lanes A and B, DNA isolated from the chlorine treated cells at 0.5 mg/*l* and 20.0 mg/*l* for 30 min; Lanes C and D, DNA isolated from the monochloramine-treated cells at 5.0 mg/*l* and 20.0 mg/*l* for 30 min; Lane E, chlorine-treated naked DNA at 20.0 mg/*l* for 30 min; Lane F, monochloramine-treated naked DNA at 20.0 mg/*l* for 30 min; Lane G, DNA isolated from the untreated normal cells.

었다는 Foegeding 등(21)의 보고와 일치한다. 그러나 20 mg/*l* 에서 30분 동안 monochloramine으로 처리된 세포(Fig.4H)에서는 살균처리하지 않은 세포의 단백질 band와 큰 차이가 없었다.

DNA에 대한 영향

정상적인 *C. jejuni*와 살균제로 처리한 *C. jejuni*에서 추출한 DNA를 전기영동 방법으로 비교 관찰한 결과는 Fig.6 I과 같다. 염소 5 mg/*l*의 농도로 처리된 세포에서 추출한 DNA는 정상적인 *C. jejuni*의 DNA에 비하여 gel상의 차이를 발견할 수 없었지만, 20 mg/*l*로 처리된 *C. jejuni*에서 추출한 DNA는 모두 파괴되어 gel상에서는 나타나지 않았다. Fig.6 I의 하단에 있는 bnad들은 시료에 RNase를 처리하지 않았기 때문에 나타난 RNA들이다. 이들의 DNA 시료를 spectrophotometer를 이용하여 그 흡광도를 측정한 결과(Fig.6 II), 정상적인 세포에서 추출한 DNA(G)는 260 nm에서 2.6을 나타냈으나 20 mg/*l* 염소로 처리된 시료(B)에서는 그 흡광도가 0.5로 감소하였다. Hayatsu(18)는 sodium hypochlorite로 처리한 후 yeast의 transfer RNA와 calf thymus DNA는 모두 UV-absorbace가 급격히 감소하였다고 보고한 바 있으나, gel상에서의 비교는 하지않았다. 그런데 20 mg/*l*의 monochloramine으로 처리된 세포에서 추출한 DNA(D)는 정상세포의 DNA에 비하여 차이를 발견할 수 없었지만, 260 nm에서의 흡광도는 정상적인 세포의 DNA에 비하여 다소 떨어졌다. 또한 정상적인 세포에서 추출한 DNA에 염소나 monochloramine을 *in vitro* 처리했을 때에는 처리하지 않은 세포에서 추출한 DNA band와 비교하여 큰 차이가 나타나지 않았다(Fig.6 I, E와 F).

Shih(22)는 *Bacillus subtilis*의 DNA에 *in vivo*와 *in vitro* 방법으로 chloramine을 처리했을 때 DNA-transforming activity가 상실되었으며 DNA-single strand의 파괴는 *in vivo*보다 *in vitro*에서 3배 이상 높았다고 보고하였다. 그는 또 chloramine을 처리한 bacteria에서는 endonuclease activity가 감소되었으며 chloramine을 처리한 세포로부터 DNA를 추출하는 과정에서 많은 DNA가 degadation이 유발된다고 보고한 바 있으나 본 연구에서는 이들 효소의 작용을 조사하지 못하였다.

요 약

인체에 설사질환을 일으키는 *Campylobacter jejuni*에 대하여 염소 및 monochloramine의 살균효과를 측정하고 세포의 구조형태 및 단백질과 DNA에 대한 영향을 주사전자현미경과 전기영동방법으로 비교 관찰하였다. 0.5 mg/*l*의 염소용액에서 15분간 처리했을 때에는 쉽게 6 log가 사멸되었다. 그리고

염소용액의 pH가 4.5에서 7.0, 10.0으로 높아짐에 따라 *C. jejuni*에 대한 염소의 살균효과는 점점 떨어졌다. 또한 monochloramine의 경우 0.5와 1.0 mg/*l*에서 60분간 처리했을 경우 각각 2와 7 log의 세균이 사멸되었다. 살균제로 처리된 *C. jejuni*들은 나선간균의 형태가 모두 구형으로 변하면서 세포표면의 파괴와 용균현상이 일어났고 서로 엉켜져 있는 예가 많았다. 그 효과는 사멸효과의 경우에서와 같이 monochloramine보다 염소처리군에서 더 심하였다. 살균제로 처리된 *C. jejuni*의 단백질과 DNA는 정상세포의 것에 비하여 전기영동상에서 차이가 나타났으며 260 nm에서의 흡광도도 감소하였다. 특히 염소처리된 세포의 단백질과 DNA는 처리한 염소농도에 비례하여 큰 차이를 나타냈다.

사 사

본 연구는 1987-1989년 한국과학재단의 연구비에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Butzler, J.P. and M.B. Skirrow: *Clin. Gastroenteriol.*, **8,** 737 (979).
2. Blaser, M.J., D.N. Taylor and R.A. Feldman: *Epidemiol. Rev.* **5,** 157 (1983).
3. Blaser, M.J.: *Food Technol.*, **36,** 89 (1982).
4. Rollins, D.M., J.C. and R.R. Cowell: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52,** 531 (1986).
5. 김치경, 오학식, 염곤, 조민기 : 한국육수학회지, **19,** 39(1986).
6. Green, D.E. and P.K. Stumpf: *J. Am. Water Works Associ.*, **38,** 1301 (1946).
7. Knox, W.E., P.K. Stumpf, D.E. Green and Y.H. Auerbach: *J. Bacteriol.*, **55,** 451 (1948).
8. Bernade, M., W.B. Snow, V.P. Olivier and B. Davidson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **15,** 257 (1967).
9. Pereira, W.E., Y. Hoyano, R.E. Summons, V.A. Bacon and A.M. Duffield: *Biochem. Biophys. Acta.*, **313,** 170 (1973).
10. Ingols, R.S.: *Public Health Works,* **89,** 105 (1985).
11. Blaser, M.J., P.F. Smith, W.-L.L. Wang and J.C. Hoff: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51,** 307 (1986).
12. Oxoid Ltd: Oxoid mannual of culture media, ingredients and other laboratory services, 5th ed., Oxoid, Hampshire, United Kingdom, 84 (1982).
13. 조민기, 전대엽, 염곤, 정연명, 이용우, 이명원, 이복권, 박미연, 오경수, 주영란, 성원근, 김기상, 신석우, 이주원 : 국립보건원 연구보고서, **20,** 15(1983).
14. American Public Health Association: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th., American Public Health Association, Washington, D.C. (1985).
15. Ng, L.-K., R. Sherburne., D.E. Taylor and M.E. Stiles: *J. Bacteriol.*, **164,** 338 (1985).
16. Silhavy, T.T., M.L. Berman and L.M. Equist: Cold Spring Harbor, New York, p.208 (1984).
17. Barnes, W.M.: *Science.*, **195,** 393 (1977).
18. Hayatsu, H., S. Pan and T. Ukita: *Chem. Pharm. Bull. Jpn.*, **19,** 2189 (1971).
19. Scarpino, P.V., G. Berg, S.L. Chand, D. Dhling and M. Lucas: *Water Res.*, **36,** 959 (1972).
20. Wang, W.-L.L., B.W. Powers, N.W. Luechtefeld and M.J. Blaser: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45,** 1202 (1983).
21. Foegeding, P.M. and F.F. Busta: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45,** 1374 (1983).
22. Shih, K.L. and J. Lederberg: *J. Bacteriol.*, **125,** 934 (1976).

(Received July 28, 1989)