

다양한 소독제에 의한 감염성 크립토스포리디움 불활성화율 평가

변승현[†] · 이목영 · 조은주 · 윤태호 · 김태호 · 한선희

서울특별시 상수도연구소

(2007년 3월 8일 접수, 2007년 4월 23일 채택)

Inactivation of Infectious *Cryptosporidium parvum* by Various Disinfectants

Seung-heon Byun[†] · Mok-young Lee · Eun-ju Cho · Tae-Ho Yoon · Tae-ho Kim · Sun-hee Han

Seoul waterworks Research Institute

ABSTRACT : Cell culture infectivity assay using HCT-8 cell was combined with most-probable-number technique to evaluate the inactivation of *Cryptosporidium parvum* by various disinfectants, including chlorine, ozone, and UV light. The assay was demonstrated to be as sensitive as animal infectivity assay, which has been considered the "gold standard" for assessing *Cryptosporidium* oocyst infectivity, and a valuable tool to evaluate inactivation of *C. parvum* by disinfectants. Bench-scale inactivation study showed that at the condition of 5°C and pH 7.0, CT value of 1,250 mg · min/L by chlorine and 16 mg · min/L by ozone were required to achieve approximately 1.0 log inactivation of *C. parvum*, suggesting that even ozone could not be sufficient to inactivate *C. parvum* at low temperature. Unlike chlorine and ozone, UV light is very effective to inactivate *C. parvum*, regardless of temperature. A UV light dose of 2 mJ/cm² provided at least 3 log inactivation of *C. parvum*.

Key Words : *Cryptosporidium parvum*, Cell Culture, Chlorine, Ozone, UV

요약 : 본 연구에서는 염소, 오존, UV에 의한 크립토스포리디움의 불활성화정도를 평가하기 위해 HCT-8세포를 사용하는 세포배양법과 최적학수기법을 결합하였다. 이 방법은 크립토스포리디움 감염성을 평가하는데 있어 "gold standard"라고 여겨지는 동물감염성 실험 만큼이나 민감하였고 소독제에 의한 크립토스포리디움의 불활성화를 측정할 수 있는 유용한 방법이었다. 실험실규모의 연구결과, 5°C, pH 7.0 조건에서 크립토스포리디움을 약 1 log 불활성화시키기 위한 염소와 오존 CT값은 각각 1,250 mg · min/L, 16 mg · min/L 이었다. 이는 오존을 사용하여 소독하였을 때 조차도 낮은 온도에서는 크립토스포리디움을 불활성화시키기 어렵다는 것을 보여주는 것이다. 염소와 오존과는 달리 UV는 온도에 상관없이 크립토스포리디움을 불활성화시키기에 매우 효과적이어서 UV가 2 mJ/cm² 조사되었을 때 크립토스포리디움이 3 log 이상 불활성화되었다.

주제어 : 크립토스포리디움, 세포배양, 염소, 오존, UV

1. 서 론

크립토스포리디움 파종(*Cryptosporidium parvum*)은 경구접촉시 설사, 복통 등을 일으키는 기생성 원충으로써 최근 미국, 영국 등에서 대규모 수인성 집단질병의 원인이 되어왔다. 크립토스포리디움이 다른 병원성 미생물과 크게 구별되는 점은 우선 염소내성이 매우 강하다는 데 있다. 크립토스포리디움의 환경배출형태인 오시스트(oocysts)는 pH 7.0, 수온 25°C, 염소농도 80 mg/L에 90분 동안 이상 노출되어야 99%가 불활성화되며¹⁾ pH 6.0, 수온 22°C, 염소농도 78.2 mg/L에서 120분 접촉시 99.9%가 불활성화되었다는 보고가 있었다.²⁾ 따라서 크립토스포리디움 오시스트는 상수처리에 사용되는 각종 소독제나 소독공정의 소독효율 평가에 있어 중요한 기준이라 하겠다.

크립토스포리디움 불활성화를 위한 소독실험에 있어 전제

되어야 할 것은 감염성(infectivity) 또는 활성(viability)을 가진 오시스트의 계수방법이다. 과거 가장 흔히 사용되던 생염색법(vital dye)과 탈낭법(in vitro excystation)은 오시스트 활성을 민감하게 반영하지 못할 뿐 아니라 감염성의 변화를 알 수 없어 소독실험에 적합하지 않다는 지적이 많았다.^{3,4)} 특히 UV에 의한 미생물 불활성화 메카니즘은 염소나 오존과는 달리 오시스트 내부의 RNA 또는 DNA를 손상시키므로 활성과 감염성에 대한 영향정도가 각기 다르게 결과될 수 있다는 점에서 감염성 측정법의 필요성이 더욱 높다고 하겠다. 그러나 감염성 측정법 중 "gold standard"로 여겨져 온 동물숙주 감염법은 많은 비용과 시간이 소요되고 동물 유지 등의 작업이 까다로우며 윤리적 문제도 일으킬 수 있어 활용분야가 크게 제한되는 실정이다. 이에 대한 대안으로 최근에는 실험실에서 배양된 세포에 크립토스포리디움을 감염시켜 PCR(polymerase chain reaction)이나 면역형광항체법으로 감염여부를 확인하는 시도들이 이루어져왔다.^{5,6)} 세포배양을 이용한 감염성 측정법은 동물숙주 감염법에 비해 간편하고 *Cryptosporidium hominis*도 검출할 수 있다는 장점이 있다.⁷⁾

[†] Corresponding author
E-mail: bsheon71@naver.com
Tel: 02-2049-1084

Fax: 02-2049-1013

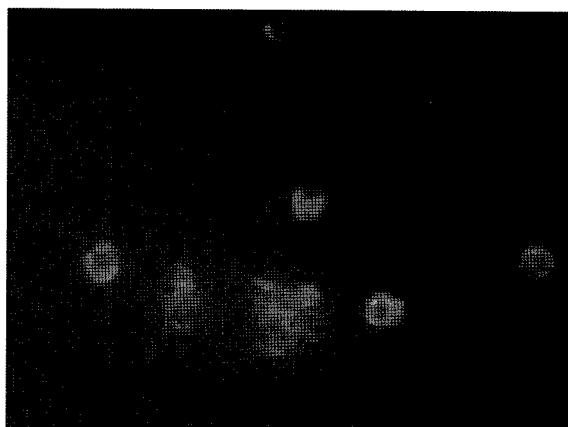


Fig. 1. Photomicrograph of many foci in HCT-8 cell for positive control test by Fluorescence microscope.

본 연구에서는 HCT-8 세포를 감염시킨 오시스트의 여러 종식단계(sporozoites, merozoites, meronts etc)를 형광항체염색법으로 검출하는 CC-IFA(Cell Culture-Immunofluorescence assay)⁸⁾에 최적 확수기법(Most-Probable Number technique)을 결합하여 감염성 오시스트를 정량 계수하고자 하였다. 아울러 이러한 감염성 정량방법을 적용해 염소, 오존, UV 등 다양한 소독제에 의한 크립토스포리디움 감염성 감소율을 측정함으로써 소독효율을 비교하고 특히 UV 조사의 경우에는 저압UV램프와 중압램프의 소독효율을 비교 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 준비

8개의 웰챔버(well chamber)를 가진 웰챔버슬라이드에 HCT-8(Human illocecal adenocarcinoma cell, ATCC CCL-224; American Type Culture Collection) monolayer를 형성시켰다(배양온도 37°C, 습도 100%, 5% CO₂). 세포 유지배지로는 5% Fetal Bovine Serum, 10% Opti-MEM, 1% 200 mM L-Glutamine, 2% 1M HEPES를 첨가한 RPMI-1640을 사용하였으며, 오시스트 감염시에는 Fetal Bovine Serum의 농도를 10%로 증가시킨 성장배지를 사용하였다.

2.2. 오시스트 준비

오시스트는 살아있는 *Cryptosporidium parvum* 오시스트(source : calf infected by Iowa strain, sterling parasitology Lab)를 구입하여 냉장 보관하였고 65일령 이내의 오시스트를 실험에 사용하였다. 구입한 오시스트는 미리 탈낭법(in vitro excystation)에 의해 활성을 측정하였고 매 감염시험마다 약 106개의 오시스트를 취해 hemacytometer로 농도를 결정한 후 세포 감염에 사용하였다.

2.3. 염소 소독실험

차아염소산나트륨용액(유효염소 약 13%)을 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 흐석한 후 1일 이상 교반시켜 chlorine-free

water를 만들어 약 1.2 mg/L의 염소수를 조제하였다. 유리 실린지에 염소수를 담고 약 10⁶개의 오시스트가 함유된 오시스트 혼탁액 10 μL를 주입한후 잔류염소를 측정하여 염소 초기농도로 하였다. 실린지 유출구를 클램프로 조여 밀봉한 후 5°C에서 교반하면서 일정시간동안 염소와 접촉시킨 다음 잔류염소를 측정하여 최종 농도로 하고 나머지를 모두 취해 3% 티오향산나트륨용액을 첨가하여 염소를 중화시켰다. 50 mL 원심분리관으로 옮겨 수차례의 원심분리(900×g, 20분)를 통해 농축한 후 최종 농축액을 1.5 mL 미세원심분리관으로 옮겼다. 옮겨진 시료는 원심분리(12,000 rpm, 4분)하여 농축 후 상등액을 제거하고 세포감염실험에 사용하였다. 염소와 접촉하지 않은 바탕시료도 불활성화율을 평가하기 위해 실험에 같이 사용하였다.

2.4. 오존 소독실험

염소소독시험과 동일한 방법으로 수행하되, 오존은 오존발생장치(Ozonica CFS-1)에서 발생된 오존을 정제수에 포화시킨 다음 흐석하여 사용하였으며, 초기 오존농도가 약 1~6 mg/L가 되도록 준비하였다. 실험은 5°C에서 수행되었으며, 오존 측정에는 Indigo Colorimetric Method(Standard Method 4500-O3 B.)을 사용하였다.

2.5. UV 조사실험

UV소독장치는 중압(1 kW) 및 저압(10 W) UV lamp를 교체 장착할 수 있는 RAYOX Advanced Ozidation System (CALGON社)을 사용하였다. UV는 광원으로부터 collimated beam tube를 통해 시료에 수직으로 조사되도록 조절되었으며 시료부의 광도는 표준 광도계로 측정하였다. UV조사 직전, 일정량의 오시스트를 여과지 유출수(0.1 NTU, pH 7.2, 4°C)에 부유시켜 혼합시킨 후 교반자석이 들어있는 페트리 접시에 10 mL씩 분주하고 교반시키면서 UV에 의한 불활성화 실험을 수행하였다. 소독시험시 크립토스포리디움 오시스트 농도는 1.5×10⁶ 오시스트/mL이었으며, 조사량은 일정한 광량에 조사시간을 변화시킴으로써 결정하였는데 조사시간은 UV shutter를 열고 닫아 조절하였다. UV조사량은 식 (1)과 같이 계산될 수 있다.

$$\text{UV dose}(\text{mJ/cm}^2 = \text{watt} \cdot \text{s/cm}^2) = \text{UV intensity}(\text{mW/cm}^2) \times \text{time(sec)} \quad (1)$$

UV를 조사한 후 페트리접시에 있는 시료를 15 mL 원심분리관으로 옮기고 원심분리(1,050×g, 15분)하여 농축 후 상등액을 제거하고 농축액을 1.5 mL 원심분리관에 옮겼다. 옮겨진 시료는 원심분리(1,200 rpm, 4분)하여 농축 후 상등액을 제거하고 세포감염실험에 사용하였다. UV가 조사되지 않은 바탕시료도 불활성화율을 평가하기 위해 실험에 같이 사용하였다.

1차 실험시에는 저압, 중압 UV 각각 5, 10, 20, 40, 60 mJ/cm²을 조사하였으며 2차 실험시에는 1, 2, 3, 4 mJ/cm²을

조사하였다.

UV소독실험시 감염성평가와 비교하기위해 활성측정방법인 탈낭실험을 추가로 실시하였다. 저압 UV램프를 사용하여 실험하였으며 조사량은 감염성평가를 위한 실험과 동일한 조건에서 실시하였다. UV를 조사한 후 페트리접시에 있는 시료를 15 mL 원심분리관으로 옮기고 1,050 ×g에서 15분 동안 원심분리한 다음 상동액을 제거하였다. 1.5 mL 미세원심분리관으로 옮긴후 12,000 rpm에서 4분 동안 원심분리하고 상동액을 제거하였다. pH 2.75인 acified Hank's balanced salt solution를 1 mL 넣고 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Hank's balanced salt solution으로 3번 셋어낸 후 1% 담즙 200 μL과 0.44% 탄산수소나트륨 50 μL을 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양한뒤 탈낭되지 않은 오시스트 수(IO), 부분탈낭된 오시스트 수(PO), 속빈 오시스트 수(EO)를 계수하였다. 탈낭율은 식 (2)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{탈낭율} = [\text{EO} + \text{PO} - (\text{탈낭실험전 탈낭된 수})] / \text{계수된 총 오시스트수} \times 100 \quad (2)$$

2.6. 세포 감염, 염색 및 검출

소독실험 후 농축과정을 거쳐 탈낭을 용이하게 하고 방해물질을 제거하기 위해 차아염소산나트륨 처리(7분)한 후 PBS로 3회 세척하고 원심분리(1,200 rpm, 4분)하여 상동액을 제거하였다. 세포성장배지를 넣어 1 mL 만든 후 세포성장배지를 사용해 1/5 회석을 단계적으로 여섯번 반복하여 6개의 튜브를 준비하였다. 각 회석단계별로 준비된 6개의 시료마다 8개의 웰 챔버에 나누어 감염시키고 37°C, 습도 100%, 5% CO₂의 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후 슬라이드를 배양기에서 꺼내 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 100% 메탄올을 첨가해 10분간 고정시킨 다음 챔버를 제거하였다. 슬라이드를 blocking buffer(PBS 10 mL, goat serum 0.2 mL, 0.002% tween 20)에 담그고 30분간 실온에서 정지하였다가 buffer를 흡인 제거하였다. 슬라이드를 1차 항체(polygonal rat anti-sporozoite and -merozoite antiserum, A600FLR, Waterborne)용액에 담그어 1시간 동안, 2차 항체(FITC-conjugated goat anti-rat antibody, sigma F6258)용액에 담그어 다시 1시간 동안 염색하였다. PBS로 4회 반복 세정한 후 커버슬립을 덮고 밀봉하였다. 400배율 이상의 형광DIC현미경으로 슬라이드의 각 웰을 관찰하여 형광점(foci)의 무리(cluster)에 초록형광점이 적어도 3개 이상 있으면 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

2.7. 계수 및 해석

감염성 오시스트의 MPN값은 미국 ICR(Information Collection Rule)용 MPN calculator program을 사용하여 결정하였다. 프로그램에 회석단계수, 반복접종횟수, 적용된 시료량 등을 입력하여 MPN값을 도출하고 이로부터 퍼센트 감염력(Percent Infectivity)을 구하였으며 그 식 (3)은 다음과 같다.

$$\text{Percent Infectivity} = (\text{MPN per mL} / \text{oocyst counts per mL by hemacytometer}) \times 100 \quad (3)$$

또한 8개의 웰 중 50%를 감염시키는데 필요한 오시스트량(ID₅₀)도 구하였는데 logistic regression에 입각한 식 (4)에 의해 각 주입농도별 response logits을 구해 양반응곡선(dose-response curve)를 그린 후 response logit = 0이 되는 주입농도(dose)를 ID₅₀으로 하였다. ID₅₀은 마우스감염 등 감염시험에서 감염력을 나타내는데 널리 사용되며 소독시험에서 감염력을 비교하는데도 적절히 사용될 수 있다.

$$\text{Response logit} = \log_e [P_{inf} / (1-P_{inf})] \quad (4)$$

(P_{inf} : the proportion of cell culture wells infected at each dose of oocysts)

염소, 오존, UV에 의한 불활성화율은 log 불활성화율로 구하였는데 식 (5)와 같이 계산된다.

$$\text{Log inactivation} = -\log_{10}[P / P_i] \quad (5)$$

P : Percent infectivity after exposure to disinfectant

P_i : Percent infectivity prior to exposure to disinfectant

3. 결과 및 고찰

3.1. 감염성 크립토스포리디움 정량

크립토스포리디움 감염을 확정하기 위해서는 2가지 요건 즉 세포침입과 세포내에서 증식에 대한 확인이 필요하다. HCT-8 세포를 감염시킨 크립토스포리디움 파종이 탈낭 후 보이는 다양한 증식단계(sporozoites, trophozoites, type I/II, meronts, merozoites, macrogametocyte, microgametocyte)는 FITC로 표지된 anti-sporozoite and merozoite antibody와 결합하여 형광DIC현미경 하에서 2~5 μm 크기의 크고 작은 초록색 형광점의 무리(cluster, 이하 클러스터)로 관찰할 수 있는데 한 개의 클러스터에 3개 이상의 형광점이 발견되면 DIC에 의한 확인을 거쳐 양성으로 판정하였다(Fig. 1~2).

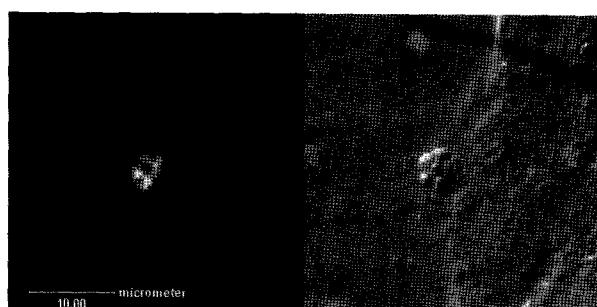


Fig. 2. Epifluorescence and DIC photo-micrograph of a meront in HCT-8 cells.

Table 1. ID₅₀ and percent infectivity of oocysts with various lot numbers and storage ages

Exp. no.	Initial conc. of oocysts per mL by hemacytomer count	MPN of Infectious oocysts per mL by CC-IFA	Percent Infectivity(%) of oocysts	ID ₅₀ of oocysts	oocysts age (day)	Lot no. of oocysts
#1	1.1 × 10 ⁶	25,654	2.4	28	17	30
	1.1 × 10 ⁶	37,353	3.6	6		
#2	1.2 × 10 ⁶	79,575	6.7	7	15	37
	1.2 × 10 ⁶	40,318	3.4	22		
#3		1.3 × 10 ⁶	20,030	1.6	45	44
#4		1.2 × 10 ⁶	20,450	1.8	38	92
#5	1.0 × 10 ⁶	11,065	1.1	32		47
	1.0 × 10 ⁶	9,623	1.0	73	53	
#6	1.1 × 10 ⁶	8,315	0.8	105		61
	1.0 × 10 ⁶	7,144	0.7	100	103	
#7	1.5 × 10 ⁶	100,953	6.6	13		65
	1.0 × 10 ⁶	62,460	6.1	12	13	
#8	1.1 × 10 ⁶	15,710	1.5	64		128
#9	1.1 × 10 ⁶	24,819	2.1	59		135
#10	1.2 × 10 ⁶	11,484	1.0	79		142

로트번호가 다른 오시스트 3종에 대해 다단계 1/5 희석에 의해 감염성 오시스트의 MPN값을 구하고 이로부터 퍼센트 감염력 및 ID₅₀을 측정한 결과는 Table 1과 같다. In vitro excystation에서 모두 95% 이상의 탈낭율을 보인 오시스트이었지만, 세포감염시 퍼센트감염력은 0.7~6.3%로 결과되었고 50% 세포 감염에 필요한 주입량(ID₅₀)은 13~103이었는데, 세포감염법을 적용한 Slifko 등⁹⁾의 5~50과 유사하고 마우스감염에서의 ID₅₀ 15~377 보다는 다소 작았다. 이러한 결과는 세포배양법과 마우스감염법간에 강한 상관성이 있으므로 세포배양법이 마우스감염법을 대체하는 효과적인 감염성 측정법이라 할 수 있다. ID₅₀은 사용된 오시스트의 로트번호나 일령(age)에 따라 다소 차이를 보였으나, 경우에 따라 동일 조건의 2회 반복시험(#1, #2, #5)에서도 차이를 나타내 희석(dilution), 분주(dispersal)과정에서도 편차가 발생될 수 있으므로, 반복시험 후 통계학적인 해석이 필요할 것으로 판단되었다.

3.2. 염소에 의한 감염성 감소

세포배양법을 염소 소독된 시료에 적용한 결과는 Fig. 3과 같다. 초기 염소농도는 1.14~1.21 mg/L로써 염소 소독을 하는 정수장에서 정수지 유출수의 통상적인 잔류염소농도인 약 1 mg/L에서의 크립토스포리디움 제거율을 측정하는데 적합하였으며 960~5,400분의 접촉시간 후 최종 잔류 염소농도는 0.67~0.84 mg/L로 접촉시간에 따라 염소감소량이 다소 달랐다. CT값 계산시 소독중 염소농도 감소를 고려치 않고 최종잔류염소를 기준으로 계산하였다.

시험 결과, 접촉시간 증가 즉 CT값 상승에 따라 크립토스포리디움의 ID₅₀은 증가하고 퍼센트 감염력은 감소하였다. 그러나 176~520 mg · min/L에서의 ID₅₀은 오히려 1,138 mg · min/L의 ID₅₀보다 컸는데, 이는 스폴로조이트 탈낭에 필요한

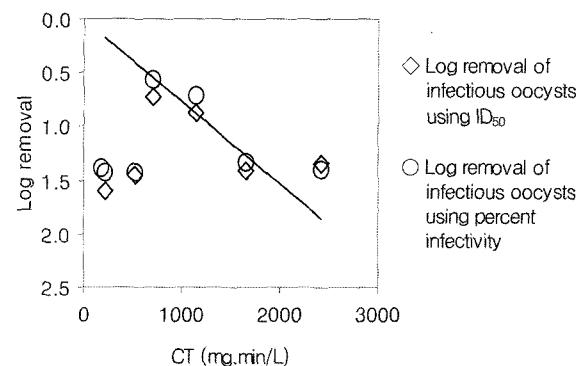


Fig. 3. Chlorine inactivation(5°C, pH 7.0) of *C. parvum* oocysts assessed by cell culture.

충분한 CT값이 확보되지 못해 탈낭이 충분히 일어나지 못했기 때문이라 여겨진다. 176~520 mg · min/L를 제외할 경우, 소독처리하지 않은 시료의 ID₅₀ 또는 퍼센트 감염력과 비교하여 계산된 log제거율은 CT값과 상관성을 가졌다($r = 0.8316$, $p = 0.0046$). 이 때 소독 전후의 감염성 오시스트량을 ID₅₀으로 비교한 결과는 퍼센트 감염력으로 비교한 것과 거의 유사하였다.

잔류염소농도를 기준으로 계산할 때 수온 5°C, pH 7.0에서 크립토스포리디움 1 log 불활성화에는 1,250 mg · min/L가 필요한 것으로 나타났다. 志村有通 등³⁾은 마우스감염법을 사용한 연구에서 잔류염소 0.94 mg/L(수온 20°C, pH 7.0) 일 때 크립토스포리디움 1 log 불활성화에 필요한 CT값이 790 mg · min/L였다고 보고한 바 있다. 마우스감염법에 의해 측정된 ID₅₀이 세포감염법보다 다소 크며, 수온이 낮을수록 소독효과가 감소되는 특성을 고려한다면 두 연구결과는 비교 가능하다고 여겨진다. 한편 志村有通 등³⁾은 잔류염소농도 100 mg/L에서 크립토스포리디움 1 log 불활성화에

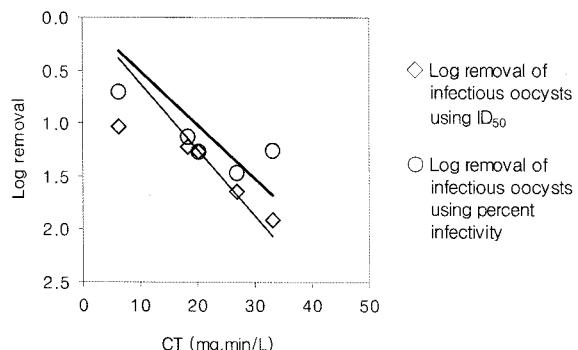


Fig. 4. Ozone inactivation(5°C , pH 7.0) of *C. parvum* oocysts assessed by cell culture.

필요한 CT값은 $2,910\text{ mg/L}$ 로, 염소농도가 높을수록 소독 효율이 저하됨을 지적한 바 있다.

3.3. 오존에 의한 감염성 감소

세포배양법을 오존소독된 시료에 적용한 결과는 Fig. 4와 같다. 시험시 초기오존농도는 $0.91\sim6.00\text{ mg/L}$ 이었으나, $10\sim44$ 분의 접촉시간 경과 후 잔류오존농도는 $0.17\sim3.31\text{ mg/L}$ 로 감소량이 다양하였다.

시험 결과, 소독중 오존농도 감소에 대해 고려하지 않고 잔류오존농도에 기초하여 CT값을 계산할 경우, CT값 상승에 따라 크립토스포리디움의 ID₅₀은 증가하고 퍼센트 감염력은 감소하였다.

즉 소독처리하지 않은 시료의 ID₅₀과 비교하여 계산된 log 제거율은 CT값과 상관성을 가졌으며($r=0.8550$, $p=0.0007$), 퍼센트감염력으로 비교될 경우에도 log 제거율과 CT값은 관련성을 나타내었다($r=0.7756$, $p=0.0015$).

잔류오존농도를 기준으로 계산할 때 수온 5°C , pH 7.0에서 크립토스포리디움 1 log 불활성화에는 $16\text{ mg} \cdot \text{min/L}$ 가 필요한 것으로 나타났다. 이러한 본 연구결과는 미국 EPA의 장기 2단계강화 지표수처리법(Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule)¹⁰⁾의 CT table에서 수온 5°C 일 때 크립토스포리디움 1 log 불활성화에 필요한 CT값 $16\text{ mg} \cdot \text{min/L}$ 과 동일한 것이다. 또한 in vitro excystation을 사용한 Rennec-ker 등¹¹⁾은 1 log 불활성화에 $18.4\text{ mg} \cdot \text{min/L}$ (수온 5°C)가, 마우스감염법을 사용한 Finch 등¹²⁾은 2 log 불활성화에 $7\text{ mg} \cdot \text{min/L}$ (수온 7°C)가 필요하다는 연구보고도 있었다.

3.4. UV 조사에 의한 감염성 감소

Table 2는 저압 및 중압 UV에서의 조사량에 따른 크립토스포리디움 감염성의 감소율을 나타낸 것이다. 크립토스포리디움 파리는 낮은 UV조사량에서도 매우 민감하게 감염성을 잃어 2 mJ/cm^2 의 저압 또는 중압 UV램프 조사시 각각 3.2 log , 3.1 log 불활성화율을 보였다. 또한 3 mJ/cm^2 이상 조사될 경우 형광점(foci)의 무리(cluster)가 전혀 발견되지 않아 약 4 log 이상 불활성화됨을 확인할 수 있었다. 이는 동물감염법을 사용한 Clancy 등¹³⁾이 2 mJ/cm^2 조사시 3.2 log , 4 mJ/cm^2 조사시 4.1 log 불활성화되었다는 결과와 유사하였다.

Table 2. Log Reduction on the infectivity of *Cryptosporidium* by UV

UV dose	Log Reduction of Infectious oocysts	
	Low pressure UV lamp	Medium pressure UV Lamp
1 mJ/cm^2	1.3	0.9
2 mJ/cm^2	3.2	3.1
3 mJ/cm^2	> 4.0	> 3.9
4 mJ/cm^2	> 3.9	> 3.9
5 mJ/cm^2	> 4.7	> 3.8
10 mJ/cm^2	> 5.4	> 4.6
20 mJ/cm^2	> 5.4	> 4.4
40 mJ/cm^2	> 5.4	> 4.3
60 mJ/cm^2	> 4.9	> 4.4

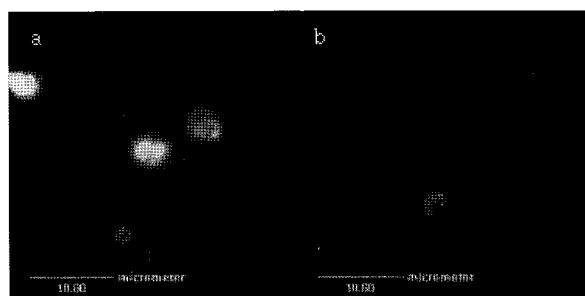


Fig. 5. Epifluorescence photograph of HCT-cell infected by UV-irradiated oocysts with UV dose of 1 mJ/cm^2 (a) and 60 mJ/cm^2 (b).

UV 조사가 4°C 조건에서 수행되었다는 점을 고려할 때 기존의 염소 및 오존소독과는 달리 저온에서도 UV에 민감하게 반응한다는 것을 보여주었다.

저압 UV램프와 중압 UV램프를 비교한 결과, 1 mJ/cm^2 과 2 mJ/cm^2 의 조사량에서 모두 각각 약 1 log 과 3 log 의 매우 비슷한 제거율을 얻었다. 즉 사용된 UV램프에 상관없이 낮은 조사량에서도 만족할 만한 불활성화율을 얻을 수 있었으며, 램프에 따른 불활성화율 차이는 크지 않다고 볼 수 있다. 따라서 정수장에서 UV소독공정 도입시 UV램프에 의한 크립토스포리디움 불활성화율 차이 보다는 경제성, 안전성, 설치·운전 편리성 등이 중요하게 고려되어야 할 것으로 생각된다.

UV 조사된 오시스트가 접종된 세포에서는 다소 흥미로운 형광염색 결과가 관찰되었는데, UV를 조사하지 않았거나 조사량이 1 mJ/cm^2 일 경우에는 다양한 중식단계가 여러개의 형광점 클러스터로 관찰되었으나(Fig. 5(a)), $3\sim60\text{ mJ/cm}^2$ 조사시에는 meront 이상의 중식단계를 포함한 클러스터는 전혀 관찰되지 않고 세포 침입 초기 단계인 trophozoite만이 발견되었다(Fig. 5(b))). 이러한 결과에 기초할 때, 일정수준 이상의 UV 조사는 오시스트의 감염성은 감소시키지만 활성이나 세포침입능력에는 거의 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 따라서 세포배양 후 감염성여부를 분자생물학적 방법으로 검출할 경우 오양성이 가능성이 존재하여 불활성화율이

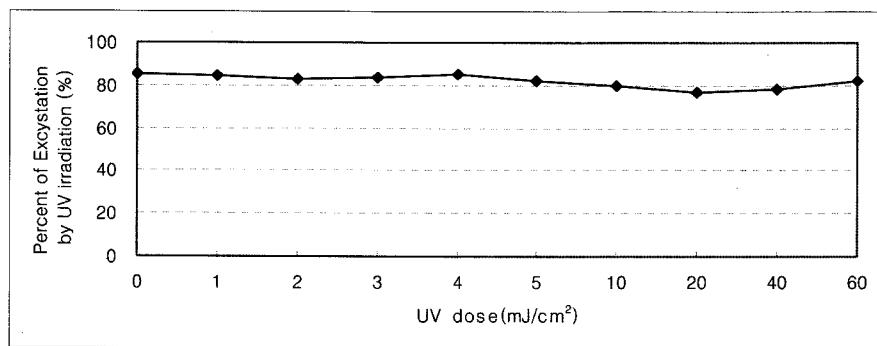


Fig. 6. In Vitro Excystation of *Cryptosporidium parvum* by UV irradiation.

과소평가될 수 있다고 판단된다. 실제로 Keegan 등¹⁴⁾의 연구결과를 보면 세포배양 후 real-time PCR을 통해 감염량을 정량하였는데 20 mJ/cm²에서 약 2 log 정도 제거되었다고 보고하고 있다.

Fig. 6은 저압 UV램프를 사용하여 빛을 조사하였을 때 조사량 변화에 따른 탈낭율을 나타내었다. UV조사 직전의 탈낭율은 85.6%였고 UV조사 후 탈낭율은 조사량이 1 mJ/cm²에서 60 mJ/cm²로 증가하여도 76.5~84.5%로 거의 일정하였다. 이러한 탈낭실험과 앞서의 세포배양 결과에 기초할 때, UV 조사가 크립토스포리디움의 활성(viability)에는 큰 영향을 주지 못해 UV 조사 후에도 여전히 탈낭과 세포 침입이 일어나지만, 오시스트의 감염성은 상실된다는 점을 알 수 있다.

4. 결 론

1) 소독제의 소독효율이나 소독제 성능을 평가하는데 있어 가장 민감한 지표는 감염성(infectivity)이다. 본 연구에서는 세포배양법에 최적화수기법을 결합, 적용하여 감염성 크립토스포리디움 오시스트를 정량하였으며, 그 민감도는 마우스감염법 만큼 민감하였으나, 사용된 오시스트 일령, 로트번호, 희석조작의 숙련도, 배양세포 계대번호 등이 감염성 측정결과에 영향을 줄 수 있으므로 이에 대한 신중한 고려가 필요할 것으로 판단되었다.

2) 이러한 측정방법을 실험실차원의 염소 및 오존실험에 적용한 결과, 수온 5°C, pH 7.0 조건에서 PBS 중 감염성 오시스트 1 log 불활성화에 필요한 CT값은 염소의 경우 1,250 mg · min/L, 오존의 경우 16 mg · min/L 수준으로 나타났다.

3) UV조사실험의 경우 UV가 크립토스포리디움의 활성에는 거의 영향을 주지 못했지만 세포배양 결과 살아있는 크립토스포리디움이 세포내 침투후 증식단계를 갖지 못하고 trophozoite까지만 진행되어 감염성이 현저히 감소되는 것이 발견되었다. 저압 및 중압 UV 모두 2 mJ/cm²의 조사량에서 크립토스포리디움이 3 log 이상 불활성화되어 크립토스포리디움 제거에 낮은 조사량에도 매우 효과적인 것으로 나타났으며, UV램프간의 불활성화율 차이는 볼 수 없었다.

참 고 문 헌

- Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., and Sterling, C. R., "Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(5), 1423~1428(1990).
- Gyurek, L. L., Finch, G. R., and Belosevic, M., "Modeling chlorine inactivation requirements of *Cryptosporidium parvum* oocysts," *Journal of Environmental Engineering*, **123**(9), 865~875(1997).
- 志村有通, 竹馬大介, 森田重光, 平田強, 鹽素の*Cryptosporidium parvum* オーシスト 不活化効果とその濃度依存性, 日本水道協会雑誌, **70**(1), 26~33(2001).
- Clancy, J. L., Hargy, T. M., Marshall, M. M., Dyksen, J. E., "UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts," *J. of AWWA*, **90**(9), 92~102(1998).
- Slifko, T. R., Friedman, D., Rose, J. B., "An In Vitro Method for Detecting Infectious *Cryptosporidium* Oocysts with Cell Culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3669~3675(1997).
- Rochelle, P. A., Marshall, M. M., Mead, J. R., Johnson, A. M., Korich, D. G., Rosen, J. S., Leon, R. D., "Comparison of In Vitro Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(8), 3809~3817(2002).
- Jonson, A. M., Linden, K., Ciociola, K. M., Leon, R. D., Widmer, G., Rochelle, P. A., "UV Inactivation of *Cryptosporidium hominis* as Measured in Cell Culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(5), 2800~2802(2005).
- 이목영, 조은주, 변승현, 김태호, 오세종, 세포배양기법을 이용한 수중 크립토스포리디움 감염성 평가, 2004년 대한상하수도학회 · 한국물환경학회 공동춘계학술대회(2004).
- Slifko, T. R., Huffman, C. A., Dussert, B., Owens, J. H., Jakubowski, W., Hass, C. N., Rose, J. B., "Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection," *Experimental Parasitology*, **101**, pp. 97~106(2002).

10. USEPA, National Primary Drinking Water Regulations : Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule ; Proposed Rule, Federal Register, **68**(154), (2003.8.11).
11. Rennecker, J. L., Marinas, B. J., Owens, J. H., Rice, E. W., "Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with Ozone," *Water Res.*, **33**(11), 2481~2488(1999).
12. Finch, G. R., Black, E. K., Gyurek, L., Belosevic, M., "Ozone Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Demand-Free Phosphate buffer Determined by In vitro Excystation and Animal Infectivity," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(12), 4203~4210(1993).
13. Clancy, J. L., Marshall, M. M., Hargy, T. M., Korich, D. G., "Susceptibility of five strains of *Cryptosporidium parvum* oocysts to UV light," *J. of AWWA*, **96**(3), 84~93(2004).
14. Keegan, Alexandra R., Fanok, Stella, Monis, Paul T., Saint, Christopher P., Cell Culture-Tagman PCR Assay for Evaluation of *Cryptosporidium parvum* Disinfection, *Appl. Env. Microbiol.*, **69**(5), 2505~2511(2003).