

## 삼염화이소시아눌산, 브롬염화히단토인, 및 칼슘하이포클로라이트의 농도 및 접촉시간에 따른 미생물 사멸특성

오세현<sup>1</sup> · 유현덕<sup>1</sup> · 이한나<sup>2</sup> · 김응수<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>성원엔비켄(주) 연구개발부, <sup>2</sup>인하대학교 생명화학공학과

**Comparative Characterization on Bacterial Disinfection Using Trichloroisocyanuric Acid, Bromochlorodimethylhydantoin, and Calcium Hypochlorite.** Oh, Se-Hyun<sup>1</sup>, Hyun-Duk Yoo<sup>1</sup>, Han-Na Lee<sup>2</sup>, and Eung-Soo Kim<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>R&D Division, SongWon Envichem Inc., Gangnam-Gu, Seoul 135-010, Korea, <sup>2</sup>Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea - The disinfection effects of trichloroisocyanuric acid (TICA), calcium hypochlorite (CH), and Bromochlorodimethylhydantoin (BCDMH) on various bacteria in aqueous suspension were comparatively characterized at various concentrations and exposure times of each disinfectant. When various bacteria cells ( $10^8$  CFU/ml) including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Legionella pneumophila*, and *Staphylococcus aureus* were exposed with a solution containing 8 ppm each of TICA, a 99% of the initial cells were killed in 60 sec, 368 sec, 372 sec, 506 sec, 812 sec, and 909 sec, respectively. In addition, the minimum exposure time required to kill 99% of *E. coli* ( $10^8$  CFU/ml) with 8 ppm of each TICA, BCDMH and CH was measured at 60 sec, 114 sec, and 7,100 sec, respectively. These comparative studies demonstrate that disinfection efficacy is highly variable depending on microbial species as well as disinfectant type, concentration, and exposure time.

**Key words:** Disinfection, trichloroisocyanuric acid, bromochlorodimethylhydantoin

### 서 론

소독이란 각종 질병을 유발시킬 수 있는 미생물을 사멸하는 수단으로서, 다양한 종류의 박테리아, 바이러스, 세균, 원생동물, 기생충 등의 수인성 전염병으로부터 인간 및 가축을 보호하는데 그 목적이 있다[1]. 일반적으로 소독제의 효능은 소독제를 사용할 때의 조건(즉, 소독제의 종류 및 농도, 소독제와 미생물과의 접촉시간, 온도, pH)과 미생물의 상태(세포벽과 세포막의 조성, 균의 성장상태, 접액분비 여부, 콜로니와 생물막의 형성, 초기 미생물농도)에 따라 소독력의 차이가 나타난다고 보고되어 있다[5, 6, 9, 10]. 비록 소독제의 농도가 높을수록 미생물에 대한 소독효과는 높을 수 있으나, 소독제의 과다사용으로 인하여 사람이나 가축에게 피해를 줄 수 있고 또한 소독에 의한 2차 부산물의 생성 가능성도 높기 때문에, 적절한 소독제의 선택과 사용은 보건위생 및 환경적인 측면에서도 매우 중요하다고 사료된다[3].

삼염화이소시아눌산 (trichloroisocyanuric acid, TICA), 브

롬염화히단토인 (bromochlorodimethylhydantoin, BCDMH), 및 칼슘하이포클로라이트(calcium hypochlorite, CH)로 대표되는 고형(solid) 염소계 소독제는 물에 용해되었을 때 매우 효과적인 살균력을 가질 뿐만 아니라 값이 저렴하고 운반과 보관이 용이하다는 이점 때문에 현재 우리나라 하수처리장에서 미생물을 살균하기 위해 가장 광범위하게 사용되는 소독제들이다[2, 4, 12](Table 1). 비록 이들 소독제의 다양한 물리·화학적 특성은 잘 알려져 있으나, 동일한 조건하에서의 이들 소독제 상호간의 미생물 사멸특성 비교연구는 미비한 실정이다[8, 11, 13]. 본 연구진은 이전 연구에서 TICA와 CH 소독제의 농도 및 접촉시간에 따른 대장균 사멸특성을 비교함으로써, TICA가 CH보다 대장균에 대한 사멸률 및 소독 지속력이 모두 우수함을 증명하였고 동일한 소독효과를 얻기 위한 소독제 별 최적조건도 제시하였다[7]. 따라서 본 연구에서는 CH, TICA와 더불어 염기성 pH 범위에서도 소독력이 높은 차아브롬산(HOBr)을 생성하는 BCDMH[1, 4]의 농도 및 접촉시간에 따른 미생물 사멸특성 등을 대장균을 포함한 다양한 미생물에서 비교 규명함으로써, 보다 효율적인 소독제의 선별 및 환경친화적 사용에 관한 과학적 근거를 제시하고자 한다.

\*Corresponding author

Tel: 82-2-545-5900, Fax: 82-2-511-0197

E-mail: enviro@swt.co.kr

재료 및 방법

사용균주와 배양조건

소독력을 측정하기 위한 미생물로서 *Bacillus cereus* (ATCC29307), *Escherichia coli*(DH5 $\alpha$ ), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Legionella pneumophila*(kindly provided by Aju University Hospital), *Pseudomonas aeruginosa* (pRD1957), *Staphylococcus aureus*(ATCC6538)를 사용하였다. 각각의 균주들을 12시간 이상 전배양 한 다음, 1/200 부피(L-broth 25 ml)에 125  $\mu$ L의 전배양액 접종)으로 250 ml baffled 플라스크에 다시 접종하였다. 37°C shaker에서 4~5 hr 배양하여 지수성장기(OD<sub>600nm</sub> = 1)가 될 때까지 배양시켰다. 배양 시 사용한 배지(L-broth) 조성은 1L 증류수에 trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, glucose 0.5 g 를 혼합하였다. 단 *L. pneumophila*의 경우 배지의 조성이 달라서 레지오넬라 아가 배지에서 36 hr 배양한 후에 OD<sub>600nm</sub> = 1까지 성장시켰던 *E. coli*의 배양 상등액에 부유시켜 동일한 조건으로 실험을 수행하였다.

소독제 종류 및 소독력 측정

소독력을 비교할 소독제(Table 1)로는 유효염소함량 90%의 TICA(Neochlor 90, Shikoku Chemical Co. Japan), 유효염소함량 75%의 CH(Toyosoda Co. Japan), 유효염소함량 55%의 BCDMH(Lonza Chemical Co., USA)를 사용하였다. 소독제는 실험 직전에 증류수에 충분히 용해시킨 후 각각 농도 별로 증류수에 희석하여 소독력을 측정하였다. 대장균을 포함한 모든 미생물 부유액 100  $\mu$ L(10<sup>8</sup> CFU/ml)을 TICA, CH, 및 BCDMH 용액(4, 8, 12, 16 ppm) 10 ml에 접종시킨 후 즉시 vortex 시켜서 충분히 혼합시켰다. 각각의 접촉시간(30초~8분)에 따라 100  $\mu$ L를 취한 후 증류수 900  $\mu$ L에 희석하여 충분히 혼합시킨 후, 그 중 100  $\mu$ L를 L-agar

(agar 10 g, trypton 5 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, glucose 0.5 g in 1 L of distilled water) 배지에 도말하여 18 hr 동안 37°C에서 배양시킨 후 CFU (colony forming unit)에 근거한 멸균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

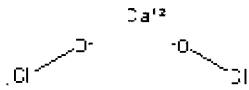
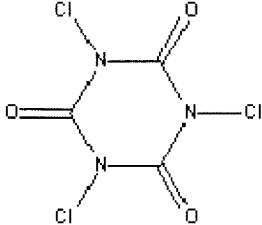
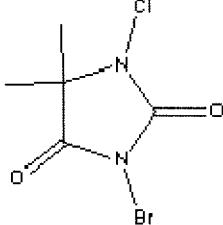
균주별 소독력 측정

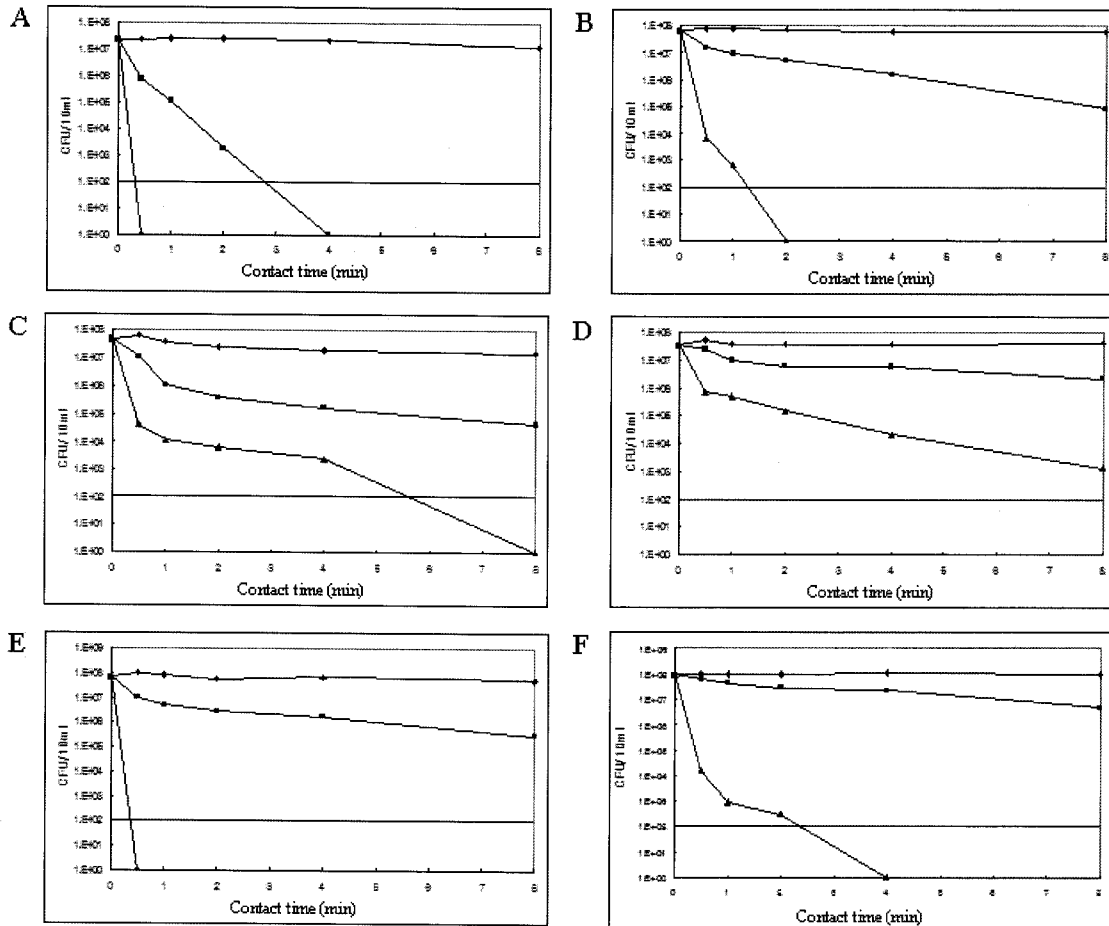
증류수에서의 다양한 농도의 TICA에 의한 각 균주의 사멸측정 결과 8 ppm에서 30초 동안 접촉시켰을 때 *E. coli*는 90.0%가 사멸하였다(Fig. 1A). 하지만 *E. faecalis*와 *P. aeruginosa*는 30.6%, *B. cereus*는 24.2%가 사멸하였고 *L. pneumophila*와 *S. aureus*는 14.5%만이 사멸하였다(Fig. 1B-1F). 소독제의 농도를 12 ppm으로 증가시켜 사멸실험을 수행한 결과, *E. coli*와 *B. cereus*는 30초 만에 완전히 사멸 (below detectable range)하였지만 *E. faecalis*는 30초 동안 접촉시켰을 때 99.7%가 사멸하였고 *L. pneumophila*는 93.7%, *P. aeruginosa*는 60%, *S. aureus*는 단지 36.9%만이 사멸하였다(Fig. 1B-1F). 이와 같은 결과는, 미생물의 종류에 따라서 소독에 대한 저항성이 매우 다르게 나타남을 나타내고 있으며, 특히 소독제의 농도가 높아질수록 그에 대한 저항성이 미생물별로 다르게 나타남을 제시하고 있다. 예를 들어 *B. cereus*의 경우 TICA 8ppm에서는 *E. coli*보다 소독에 대한 내성이 훨씬 높았지만 12ppm에서는 *E. coli*와 같은 소독력이 보였다. TICA에 의한 각 미생물이 99% 사멸하는데 걸리는 시간을 Table 2에 나타내었다.

소독제별 소독력 측정

증류수에서 각각 다른 농도의 TICA, CH, BCDMH에 의한 *E. coli*의 사멸측정 결과, TICA의 경우 8ppm에서 1분 동안 접촉시킨 결과 99%가 사멸하였다. 반면 CH 8 ppm에

Table 1. Characteristics of CH, TICA and BCDMH

	CH	TICA	BCDMH
Available Chlorine Contents	75%	90%	55% (without Br)
Molecular Formula	Ca(OCl) <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Chemical Structure			
Stability	Moisture contents increase during long-term storage	Stable during long-term storage	Stable during long-term storage
Solubility (at 25)	High (21 g/100 ml)	Low (0.2 g/100 ml)	Low (0.25 g/100 ml)
Melting Point (°C)	Decomposes at 100	249-251	158-165
pH (at 16 ppm)	pH 7.9	pH 5.0	pH 5.5



**Fig. 1.** Disinfection effect of TICA on *E. coli* DH5α (A), *Enterococcus faecalis* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Staphylococcus aureus* (D), *Bacillus cereus* (E), and *Legionella pneumophila* (F) cells in aqueous suspension phase. The concentrations of disinfectant (ppm) : -◆- 4, -■- 8, -▲- 12, — Non-detectable range. The CFU value of each time point was the average colony numbers of two independent plates spreaded by the same sample.

**Table 2.** Calculated times (seconds) for 99% inactivation of various microorganisms (99% killing time) at several concentrations of TICA.

Bacterial species	4 (ppm)	8 (ppm)	12 (ppm)
<i>Escherichia</i>	3438	60	8 >
<i>Pseudomonas</i>	1709	368	153
<i>Enterococcus</i>	9022	371	24
<i>Bacillus</i>	5504	506	8 >
<i>Staphylococcus</i>	NE <sup>a</sup>	909	263
<i>Legionella</i>	NE <sup>a</sup>	812	48

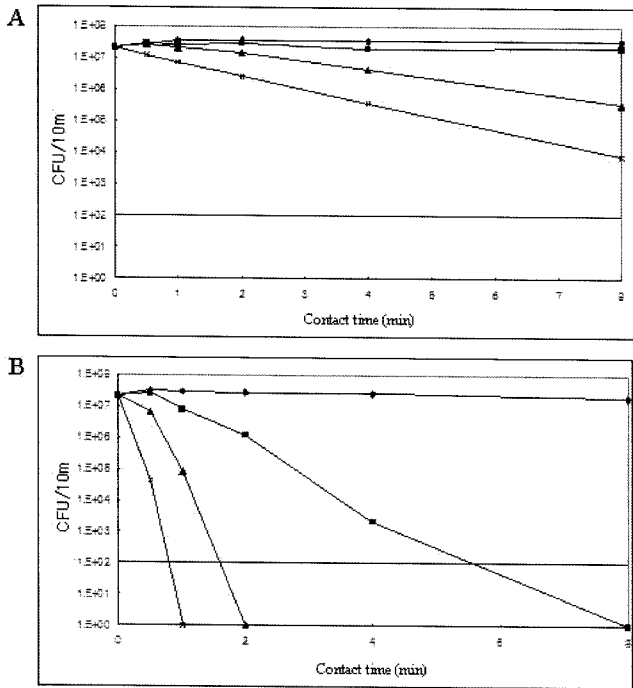
<sup>a</sup>NE : no effect

서는 8분 동안 접촉시켜도 단지 25.9%만이 사멸하였고 BCDMH는 8 ppm에서 114초 동안 접촉시켜야 99%가 사멸하였다(Fig 1A, 2). 소독제의 농도를 12 ppm으로 높여서 실험한 결과, TICA의 경우 30초 만에 완전히 사멸(below detectable range) 하였다(Fig. 1A). 하지만 CH는 30초 동안

접촉시켜도 단지 16%만이, 또한 BCDMH는 93.9%가 사멸하는 효과를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 소독제의 농도를 16 ppm으로 더욱 높여서 실험한 결과 TICA는 12 ppm의 경우와 마찬가지로 30초 만에 완전히 사멸하였고 BCDMH는 99.8%가 사멸하였다(Fig. 1A, 2B). 반면 CH는 8분 동안 접촉시켜야 99.9%가 사멸하였고 이것은 TICA 8 ppm에서 2분 동안 접촉시켰을 때의 사멸효과와 비슷하였다(Fig. 1A). CH 4 ppm에서는 8분까지 접촉시켜도 어떠한 사멸효과가 보이지 않았다(Fig. 2A). 각 소독제의 농도에서 다양한 미생물들이 99% 사멸하는데 걸리는 시간을 Table 3에 나타내었다.

**소독제 종류에 따른 균주 사멸특성**

일반적으로 소독제의 효과는 Ct로 표현되며, C는 소독제의 농도, t는 주어진 환경(pH와 온도)에서 일정량의 미생물을 사멸시키기 위한 소요시간으로 나타낸다. 소독제의 농도와 접촉시간과의 관계는  $K=C^n$ 로 나타내며, 여기서 K는 주어진 조건에서 소독제에 노출된 미생물에 따른 상수, C는 소



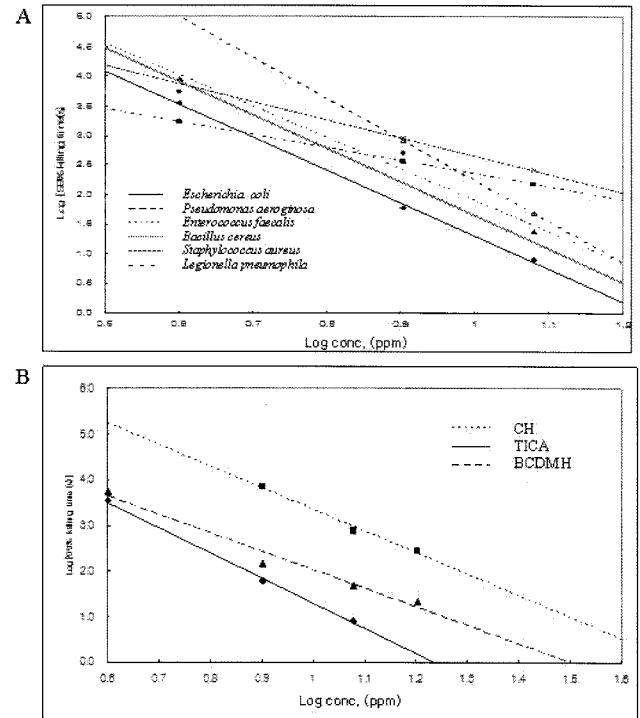
**Fig. 2.** Disinfection effect of calcium hypochlorite (A) and BCDMH (B) on *E. coli* DH5 $\alpha$  cells in aqueous suspension phase. The concentrations of disinfectant (ppm) : -◆- 4, -■- 8, -▲- 12, -×- 16, — Non-detectable range. The CFU value of each time point was the average colony numbers of two independent plates spreaded by the same sample.

**Table 3.** Calculated times for 99% inactivation of *E. coli* cells (99% killing time) at several concentrations of TICA, CH, and BCDMH.

Disinfectant Conc. (ppm)	99% killing time(s)		
	TICA	CH	BCDMH
4	3438	NE <sup>a</sup>	5882
8	60	7100	114
12	8 >	780	49
16	8 >	279	22

<sup>a</sup>NE : no effect

독제의 농도(ppm), 는 목표량의 미생물 살균에 소요되는 시간(min), n은 회석상수를 나타낸다[1]. 일반적으로 시간 t와 농도 C의 관계를 Log-Log 그래프 상에 나타내었을 때 직선과 같은 형태로 나타난다[1]. TICA의 농도 Log 값에 따른 각 미생물의 99% killing time은 직선 형태로 주어지며(Fig. 3A), 그래프에서 위쪽으로 올라갈수록 소독제에 대한 저항성이 높고 아래쪽으로 내려갈수록 소독제에 대해 민감함을 알 수 있다. 낮은 농도에서는 *L. pneumophila*가 소독에 대한 내성이 높고 그 다음이 *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* 순으로 소독에 대한 내성이 떨어지지만, 높은 농도에서는 이와 달리 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*의 순으로 소독



**Fig. 3.** (A) Disinfection effect on the 99% killing time of various microorganisms in TICA: *E. coli* (◆), *Pseudomonas* (■), *Enterococcus* (▲), *Bacillus* (●), *Staphylococcus* (×), *Legionella* (△); (B) Disinfection effect on the 99% killing time of *E. coli* DH5 $\alpha$  cells in TICA (◆), calcium hypochlorite (■) and BCDMH (▲).

력이 나타났다. 또한 TICA, CH, BCDMH의 농도에 따른 *E. coli*의 99% killing time을 그래프로 나타낸 결과(Fig. 3B), 같은 10 ppm의 농도로 주입시킨다면 TICA는 20초 만에 99%가 사멸되는 반면 BCDMH는 106초, CH는 698초가 소요된다. 또한 10초 동안 접촉시켰을 때 99%가 사멸되는 농도가 TICA의 경우 약 11.4 ppm인 반면 BCDMH는 17.9 ppm, CH는 31.6 ppm이다. 본 연구결과는 같은 농도의 소독제를 미생물과 접촉시켜도 상대적으로 염소농도가 높은 TICA가 BCDMH, CH보다 훨씬 짧은 시간 내에 대부분의 미생물을 사멸시키고 비교적 낮은 농도의 TICA를 사용하더라도 고농도의 BCDMH, CH와 유사한 사멸효과를 얻을 수 있다는 결론을 제시하고 있다. 뿐만 아니라, 본 연구결과는 소독제의 염소함량에 따라 모든 미생물에 대한 소독력이 단순히 비례하는 것이 아니라, 소독제의 화학적 특성과 미생물의 종류에 따라서 특정 미생물에 대한 사멸특성이 매우 다르다는 사실을 구체적인 실험결과로 제시하였다는 데 의미가 있다고 확신하며, TICA, CH, BCDMH의 최소의 농도로 특정 미생물의 사멸을 극대화시킬 수 있는 환경친화적 소독제 선별에 매우 중요한 기초자료로 활용될 수 있으리라 사료된다.

## 요 약

유기 염소계 소독제인 삼염화이소시아눌산(trichloroisocyanuric acid)에 의한 다양한 미생물의 사멸특성을 규명하기 위하여, 대장균, 고초균, 포도상구균, 레지오넬라균, 수도모나스균 등을 각각 증류수에 부유시킨 후, 접촉시간과 소독제의 농도를 변화시키면서 사멸률을 측정하였다. 삼염화이소시아눌산 8 ppm 수용액 하에서 미생물 99%의 사멸률에 도달하는 시간은 대장균 60초, 수도모나스균 368초, 포도상구균 372초, 고초균 506초, 레지오넬라균 812초 순으로 측정되었다. 특히 대장균 사멸률 99%에 도달하기 위한 같은 농도(8 ppm) 세 종류의 소독제 접촉시간은 삼염화이소시아눌산 60초, 단토티브롬(BCDMH, Bromochlorodimethylhydantoin) 114초, 칼슘하이포(calcium hypochlorite) 7,100초 순으로, 대장균에 대한 삼염화이소시아눌산의 소독력이 가장 우수하게 측정되었다. 본 연구결과는 염소계 소독제에 의한 사멸특성이 미생물 종 특이적이며 또한 소독제의 종류, 농도, 접촉시간에 따라서 매우 다양하게 측정됨을 제시하고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 환경부 차세대핵심환경기술개발사업 지원으로 수행되었으며, 실험지도 및 결과분석에 도움을 준 한국외국어대학교 환경과학연구소에 감사 드립니다.

## REFERENCES

1. Bitton, G. 1996. *Wastewater microbiology*, John Wiley & Sons, New York, NY., USA
2. Hiegel, G. A. 2001. Trichloroisocyanuric Acid in Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley & Sons: New York.
3. Hua G, and D.A. Reckhow. 2007. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Res.* **41**: 1667-1678.
4. Jolles, Z. E. 1966. Bromine and its Compounds. Orlando, Z. E. Academic Press. **407**: 393-394.
5. Junli, H., W. Li, R. Nanqi, L.X. Li, S.R. Fun, and Y. Guanle, Y. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Res.* **31**: 455-460.
6. Junli, H., W. Li, R. Nanqi, M. Fang, and Juli. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.* **31**: 607-613.
7. Kang, J. K., H. J. Park, and E. S. Kim. 2002. Disinfection effect of trichloroisocyanuric acid and calcium hypochlorite on *Escherichia coli* in water. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 324-326.
8. Loughney E, and J. Harrison. 1998. Irritant contact dermatitis due to 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin in a hydrotherapy pool. Risk assessments: the need for continuous evidence-based assessments. *Occup. Med. (Lond).* **48**: 461-463.
9. McFeters, G.A., F.P. Yu, B.H. Pyle, and P.S. Stewart. 1995. Physiological methods to study biofilm disinfection. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 333-338.
10. Roberto F., N. Ilaria, M. Antonella, and G. Antonerita. 1998. Bactericidal activity of chlorine dioxide against *Escherichia coli* in water and on hard surfaces. *J. Food. Prot.* **61**: 668-672.
11. Tachikawa M, C. Sayama, K. Saita, M. Tezuka, and R. Sawamura. 2002. Effects of isocyanuric acid on the monochlorodimedone chlorinating rates with free chlorine and ammonia chloramine in water. *Water Res.* **36**: 2547-2554.
12. Wagner, E. C. and M. Baizer. 1955. 5,5-dimethylhydantoin. *Org. Synth. Coll.* **3**: 323-324.
13. Wang M, P.H. Yin, L. Zhao, A.H. Hong, S.H. Lu, and Y.Z. Qi. 2006. Sodium dichlorinated isocyanuric acid and trichloroisocyanuric acid for removing cells of *Phaeochystis globosa*. *Huan Jing Ke Xue.* **27**: 956-959.

(Received Aug. 14, 2007/Accepted Oct. 10, 2007)