

염소 또는 오존을 이용한 항생제 내성 유전오염물질 제어

김성표* / 유대환** / 오준식*** / 조윤철****

The Antibiotic Resistant Gene Pollutant Controls using Chlorine or Ozone disinfection

Sungpyo Kim** / Daewhan Rhu** / Junsik Oh*** / Yunchul Cho****

요약 : 본 연구의 목적은 다제 항생제 내성특성을 가진 pB10을 함유한 *Escherichia coli* DH 5 alpha(*E.coli* DH5a)를 대상 미생물로 하여 염소와 오존의 살균효율을 비교하는 것이다. 또한 다제 내성플라스미드 pB10에 대한 염소와 오존에 의한 제거율을 조사하였다. 주입농도 대비 오존살균이 염소살균에 비해 약 1.2~1.4 배 정도 효율이 높게 나타났다. 또한 다제 내성플라스미드 pB10에 대한 제거 실험에서 오존에 의한 제거율이 염소보다 약 2~4배 높게 나타났다. 오존살균에 의한 높은 pB10 제거효율은 오존 살균시 발생하는 OH· 라디칼에 의한 것으로 사료된다. 이러한 연구결과로부터 내성균 및 유전물질을 효과적으로 제어하기 위하여 기존 염소살균법에 오존 또는 광촉매산화와 같은 고급산화법을 연계처리에 대한 필요가 있을 것으로 판단된다.

핵심용어 : 염소살균, *Escherichia coli* DH 5 alpha(*E.coli* DH5a), OH·라디칼, 오존살균, pB10

Abstract : The aim of this study was to examine ozonation disinfection efficiency for *Escherichia coli* DH5alpha removal, containing the multi-resistance plasmid pB10 as well as chlorination disinfection efficiency. In addition, plasmid pB10 removal rates were estimated by ozonation and chlorination. The removal efficiency of pB10 via ozonation was about 2 to 4 times higher than chlorination. High removal efficiency of pB10 is likely due to OH· radical produced during ozonation. These results suggest that integration of advanced oxidation process such as ozonation (or photocatalytic oxidation) with conventional disinfection such as chlorination may be needed for effective control of antibiotic resistant bacteria and genetic materials.

Keywords : Chlorination, *Escherichia coli* DH 5 alpha(*E.coli* DH5a), OH Radical, Ozonation, pB10

1. 서 론

도시화는 전 세계적으로 인구증가와, 산업화를 촉진시켜 인간생활에 필요한 수자원의 사용량을 급격하게 증가 시키고 있다. 이는 국내에서도 마찬가지로, 2016년에는 약 10 억 톤의 물이 부족할 것으로 예상하고 있다(권오현, 2009). 따라서 도시 내에서 사용할 수 있는 대체용수 개발은 시

급한 현안 중 하나이다. 도시 내에서 발생하는 하수는 수자원으로 대체 하였을 경우 지속적이며 안정적인 수자원확보라는 측면에서 매력적이다. 이에 환경부에서도 하수 처리수를 도시 재이용수, 조경용수, 친수용수, 하천 유지용수, 농업용수, 습지용수, 지하수 충전 및 공업용수의 용도로 사용하도록 권장하고 이에 대한 수질권고 기준을 마련하였다(환경부 및 환경관리공단, 2009). 하지만,

+ Corresponding author : ub1905ub@korea.ac.kr
* 정희원 · 고려대학교 환경시스템공학과 · 교수, E-mail : ub1905ub@korea.ac.kr
** 비희원 · 부강테크 상무, E-mail : dhr@bkt21.com
*** 비희원 · 고려대학교 환경시스템공학과, E-mail : azimuth602@korea.ac.kr
**** 정희원 · 대전대학교 환경공학과·교수, E-mail : ycho@dju.kr

하수처리수가 안정적인 도시 내 대체수자원으로서의 여러 기능을 감당하기 위해서는 미래에는 하수처리수의 수질수준이 상수 원수 수준 또는 이상까지 도달할 필요가 있을 것으로 사료된다. 따라서, 하수처리수를 상수원수 수준의 고품질로 처리하기 위해서는 현재 집중하고 있는 유기물질 및 영양소(질소, 인) 제거 뿐만 아니라 하수 내에 포함되어 있는 다양한 미량오염물질의 제거가 특히 중요할 것으로 판단된다. 최근 10년 사이에 분석기술의 발달 및 물의 재이용관점에서 많은 관심을 받게 된 하수 내 미량 오염물질은, 하수 내 함유된 농도가 기존의 오염물질에 비해 매우 적은 농도임에도 불구하고 (ppb나 ppt) 생태계에 미치는 영향은 간과 할 수 없는 것으로 알려지고 있다 (Rosal et al., 2010). 현재 연구되어지고 있는 대부분의 미량 오염물질 연구는 화학적 오염물질에 초점이 많이 맞추어져 있으나, 하수에는 많은 항생제 내성을 함유한 병원균이 존재한다 (Auerbach et al., 2007; Iwane et al., 2001; Mezrioui and Baleux, 1994). 이러한 항생제 내성을 함유한 병원균은 하수처리장내에서 완전히 제거 되지 않고 수계로 빠져 나가고 있는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2010; Auerbach et al., 2007). 만약 이러한 항생제 내성물질이 플라스미드내에 존재하게 되면 문제는 더욱 복잡하게 된다. 왜냐 하면 플라스미드는 미생물간의 접촉을 통해 다른 미생물에게 전달될 수 있고, 궁극적으로 수계 내 환경 내에서의 항생제 내성 플라스미드를 가진 저항병원균이 증가되어 공공보건에 잠재적인 위협이 될 수 있기 때문이다. 그러나, 이러한 국내외 연구는 극히 제한적이다. 따라서, 하수내에 존재하는 항생제 내성 플라스미드 제어기법 연구는 향후 필요한 미량유해물질 제어연구 중 하나가 될 것이다.

수처리 공정에서 살균방법은 주로 염소, 오존, 및 자외선(Ultra Violet, UV)에서 선택 되어 왔다 (Gehr et al., 2003). 이중 하수처리수 내 병원성 미생물을 사멸하기 위해 가장 널리 사용되고 있는

방법은 염소살균법이다 (Macauley et al., 2006). 염소살균은 병원성 미생물에 대한 탁월한 제거 효율을 보이나, 다양한 위해한 살균부산물을 생성시킨다(Zhao et al., 2008; Richardson et al., 2007). 한편 오존은 강력한 산화력을 바탕으로, 살균뿐만 아니라 냄새, 맛, 색도 유발물질을 제거하는데도 탁월한 효율을 보이는 것으로 알려져 있다(von Gunten, 2003; Anderson et al., 1982). 이와 같이 살균관련 수많은 연구가 수행되었음에도 불구하고, 살균 공정시 항생제 내성유전물질과 내성 플라스미드에 제거에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 하수처리시설에서 많이 쓰이고 있는 염소 및 오존 살균 강도 변화에 따른 항생제 내성 미생물의 제어와 내성 유전자 제거 효율 특성을 알아보려 한다.

2. 연구방법

2.1 균주 및 플라스미드 선정

본 연구에서는 다제 항생제 내성특성을 가진 pB10을 함유한 *Escherichia coli* DH 5 alpha, (*E.coli* DH5a)를 연구대상 미생물로 선정하였다 (Shluter et al., 2003). pB10는 64kbp의 IncP-β의 플라스미드로 프랑스 하수처리장에서 처음 분리되었다. 이 항생제 내성 플라스미드는 Amoxicillin, Streptomycin, Sulfamethoxazole 과 Tetracycline 과 Mercury에 저항성을 가진다고 알려져 있으므로 내성균 및 내성유전자 연구를 위한 지표미생물로 적합할 것으로 판단된다.

2.2 염소 batch test

본 연구에서는 차아염소산나트륨을 이용하여 항생제 면역을 가지고 있는 pB10 plasmid의 살균 여부와 pB10의 제거 여부를 확인하는데 목적을 두고 진행하였다. 시료는 4개의 항생제(Tetracycline, Amoxicillin, Streptomycin, Sulfamethoxazole)에 대한 면역력이 있는 *E.coli* DH5a를 20°C에서 광학 밀도 (Optical Density; OD)값이 1.3이 될 때

까지 배양한다. 일정한 광학밀도값을 통해 *E.coli* DH5a의 자람을 최대한대로 일정하도록 조절한다. 배양 후에는 50 mL씩 centrifuge tube에 옮긴 다음 원심분리기를 이용하여 15분 동안 5000 rpm으로 고액분리 시킨 후 상정액을 완전히 제거하고 그 대신 phosphate buffer solution을 같은 양(50mL) 부어서 고액분리로 생성된 pellet과 섞어준다. 준비된 시료에 농도별(염소주입량 1, 2, 4, 5, 8, 10 mg/L)로 차아염소산 나트륨을 주입

후, 초기 pH를 7.6으로 맞추기 위해 염산(HCl 1+500)을 이용하였다(Table 1). 각 시료마다 접촉시간을 45분으로 하였으며 접촉시간동안에는 20°C Incubator에서 150rpm으로 지속적으로 shaking을 시켜주었다. 이후 LB+ Agar 배지에 살균된 시료를 spreading하여 colony 수를 파악하고, 시료의 50 mL에서 DNA를 추출하여 PCR과 qPCR을 통해 pB10의 살균여부를 확인하였다.

Table 1. Experimental condition for chlorination

Sample	Volume (mL)	O.D value (Abs)	phosphate buffer solution (mL)	NaOCL	Dose (mg/L)
DH5a (20°C incubation)	50	1.3	50	35% (Cl ₂ 14%)	1, 2, 4, 5, 8, 10

2.3 오존 batch test

본 연구의 오존 실험도 염소실험과 같이 4개의 항생제(Tetracycline, Amoxicillin, Streptomycin, Sulfamethoxazole)에 대한 면역력이 있는 *E.coli* DH5a를 20°C에서 배양시킨 시료(O.D 값 = 1.3)를 사용하였다. 배양 후에는 50 mL씩 centrifuge tube에 옮긴 후, 원심분리기를 이용하여 15분 동안 5000 rpm으로 고액분리를 하였다. 원심분리된 시료의 상정액을 완전히 제거한 후, 50 mL phosphate buffer solution (1: 1, v/v) 부어 원심분리로 생성된 pellet을 재 부유 시켰다. 살균효율을 비교하기 위해 염소 살균 실험시 사용하였던 염소 주입량에 상응한 오존 주입량으로 실험을 수행하였다. 회분식 실험에 사용된 오존용액은 LAB 2B 오존발생기 (오조니아코리아(주))을 사용하여 순산소로부터 오존을 발생시켰다. 순산소의 가스 유량은 4~5 L/min 으로, 10psi 가압상태로 60분 동안 오존을 발생시켰으며 이때 오존 농도는 10 mg/L였다. 준비된 10 mg/L의 오존 용액을 3차 증류수로 희석을 하여 다양한 오존 주입량(오존농

도 1, 2, 4, 5, 8, 10 mg/L)을 만들어 사용 하였다. 각 시료마다 접촉시간을 45분으로 하였고, 접촉시간동안에는 지속적으로 shaking을 시켜주었다. 이후 LB+ Agar 배지에 살균된 시료를 spreading하여 살균된 colony 수를 파악하고, 시료의 50 mL에서 DNA를 추출하여 PCR과 qPCR을 통해 pB10의 살균여부를 확인하였다. 추가적으로 오존의 경우 높은 반응성과 휘발에 의한 손실이 보정하기 위해 미생물 없는 시료를 준비하여 오존 잔류농도를 측정하였다. 수용액상의 오존의 농도 측정은 Indigo Method의 방법을 사용하였다(Bader and Higne, 1981). 인디고 표준용액은 0.77g Potassium Indigotrisulfonate에 1 mL 인산(H₃PO₄)을 주입 후 3차 증류수를 추가하여 최종 부피가 1000 mL되도록 준비하였다. 준비된 표준용액 100mL에 제일인산나트륨(Sodium Phosphate, monobasic, NaH₂PO₄) 10g 과 인산(H₃PO₄) 7mL을 추가한 후, 3차 증류수로 최종 부피 1000 mL가 되도록 하였다. 흡광도 분석을 위해 인디고 시액을 5 mL 씩 50 mL Conical tube에 각각 넣었다. 흡광도 기기는 DR2010

(HACH)를 이용하여 600nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 한편 3차 증류수만으로 50 mL 되도록 Conical tube를 채운 시료를 blank로 사용하였다.

흡광도를 측정한 후 수용액상의 오존농도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{오존함량 (mg/L)} = \tag{1}$$

$$50\text{mL} \times \frac{[\text{Sample (Abs)} - \text{Blank (Abs)}]}{\text{액층의 길이 (1cm)} \times \text{검체의 채취량 (10mL)} \times \text{오존의 흡광계수 (0.42cm}^{-1}\text{)}}$$

3. 결과 및 고찰

3.1 살균 효율

각각 살균이 끝난 culture를 LB plate에 16시간동안 배양 하여 살아남은 colony를 계산하였다 (Fig 1). 미생물의 사멸정도를 비교해 보면 오존이 염소에 비해 살균효율이 다소 높았고, 주입농도대비 오존의 살균효율이 약 120~140% 정도였

다. 일반적으로 오존은 강력한 산화제이며 다양한 종류의 미생물에 대해 살균효율이 높다고 알려져 있고(Driedger et al., 2000), 염소에 비해 월등한 살균효율을 나타낸다고 여러 연구에서 보고되고 있다(WHO, 2008; Hunt and Marinas, 1997). 하지만 본 연구에서 사용한 항생제 내성 *E.coli* DH5a에 대해서 염소에 비해 월등한 살균효율을 보이지는 못하였다.

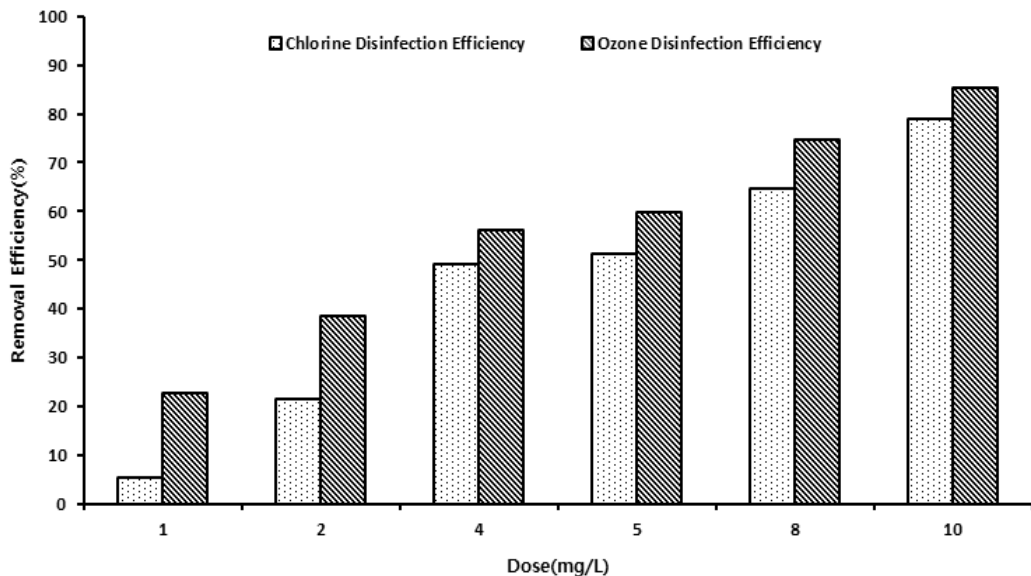
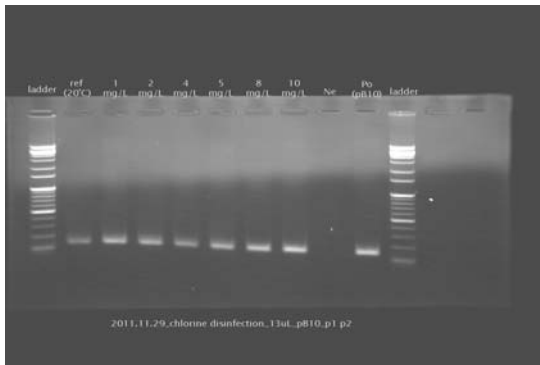


Fig. 1 Comparison of chlorination and ozonation colony removal efficiency

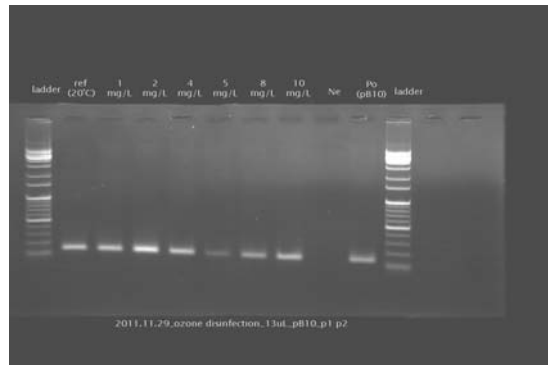
3.2 PCR/qPCR

살균 후 6가지 다른 농도의 시료를 이용하여

pB10에 대한 PCR를 해 본 결과 6가지 농도 모두에서 pB10의 완전 제어(PCR product가 사라지는 현상)를 확인할 수는 없었다(Fig 2).



(a) pB10 product after chlorination (1,11 lane: ladder, 2 lane: control, 3~8 lane: samples, 9 lane: negative, 10 lane: positive)



(b) pB10 product after ozonation (1,11 lane: ladder, 2 lane: control, 3~8 lane: samples, 9 lane: negative, 10 lane: positive)

Fig. 2 PCR after chlorination(a) and PCR after ozonation(b)

이에 qPCR(quantative PCR)을 실시하여, 살균 실시하지 않은 샘플 대비 pB10 제거율을 산정하였다. 이에 따르면, 오존살균을 통한 pB10 제거

비율은 염소살균에 비해 약 200~400%정도 높았다(Fig 3).

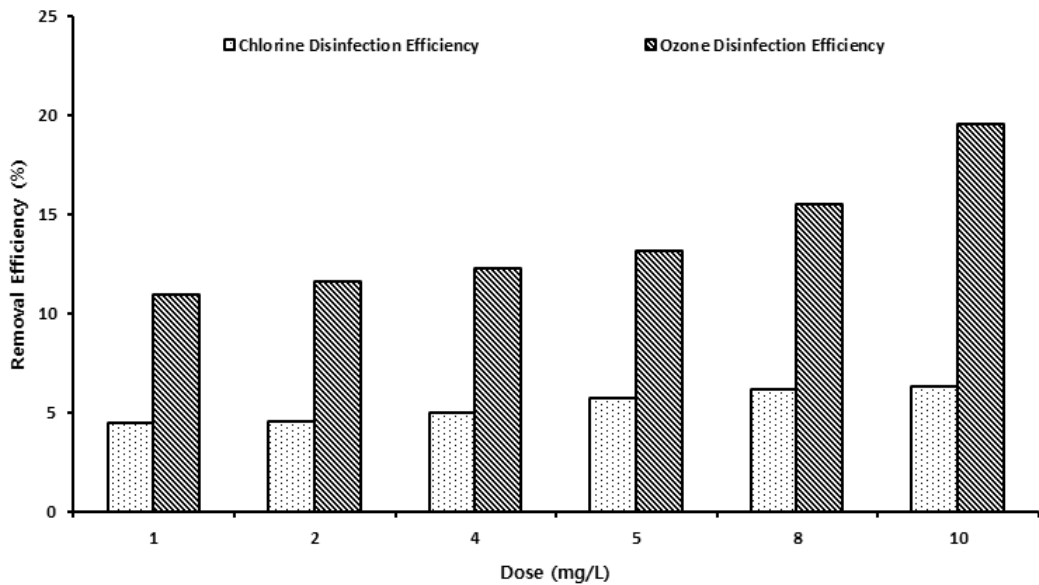


Fig. 3 pB10 removal efficiency after chlorination and ozonation

그리고 이러한 pB10 제거율은 오존의 투입농도가 높을수록 염소에 비해 제거율의 차가 급격해지는 것으로 나타났다. 이는 오존분해(ozone

decomposition)로 인해 생성된 OH· 라디칼이 pB10 분해에 오존 보다 더 중요한 역할을 한 것으로 추정된다. 왜냐 하면, 플라스미드는 복잡한

유전 물질로 비 선택적인 OH· 라디칼이 선택적이며 반응속도가 낮은 오존 보다 (Gehr et al., 2003) 제어에 보다 유리하다고 판단된다.

3.3 염소살균과 오존 살균비교

전체적으로 항생제 내성균 제어와 유전물질 제어는, 오존의 살균력이 염소 살균력보다 높은 것으로 나타났다. 특히, pB10 유전자 제거에는 훨씬 더 좋은 제거 효율(200~400%)을 보였으나, colony 수 감소에는 그리 큰 감소 효율(120~140%)을 보이지는 아니하였다. 이는 예상과는 다른 결과 이다. 왜냐하면 유전물질(pB10)은 미생물 내부에 있는 물질로, 이를 제거하기 위해서는 기본적으로 미생물 살균이 선행되어야 하기 때문이다. 따라서, 오존산화력이 염소산화력보다 높기에 항생제 내성균 제어율 증가가 pB10 제거율보다 같거나 클 것으로 예상하였다. 보통 살균력은 보통 세포막의 형태 및 조성, 염소이온에

대한 저항성, 주입농도에 따라 상의한 결과를 나타낼 수 있는데(Cho et al, 2010), 본 실험에서는 기본적으로 *E. coli*를 사용했기에 위의 원인이 미치는 영향은 그리 크지 않다고 판단된다. 따라서, 본 실험에서는 살균강도의 지속여부에 좀 더 초점을 맞추었다. 살균강도는 적정 산화력에 접촉시간을 곱한 CT (product of concentration and contact time)값에 따라 변하게 된다. 일반적으로 오존은 염소와 달리 살균력이 오래되지 않고 쉽게 분해 될 수 있기에 지속되는 살균강도의 변화는 염소살균에 비해 크게 다를 수 있다. 따라서, 오존과 염소의 증류수에서의 시간별 농도변화를 측정해 보았다. 이를 측정해 본 결과 오존의 경우 약 10분경과 후 초기 주입량의 약 70%가 소멸됨을 알 수 있었고, 20분 경과후 거의 남아 있는 오존이 없음을 알 수 있었다. 그러나, 염소의 경우 40분까지 처음농도의 약 91%가 유지되는 것으로 나타났다 (Fig 4).

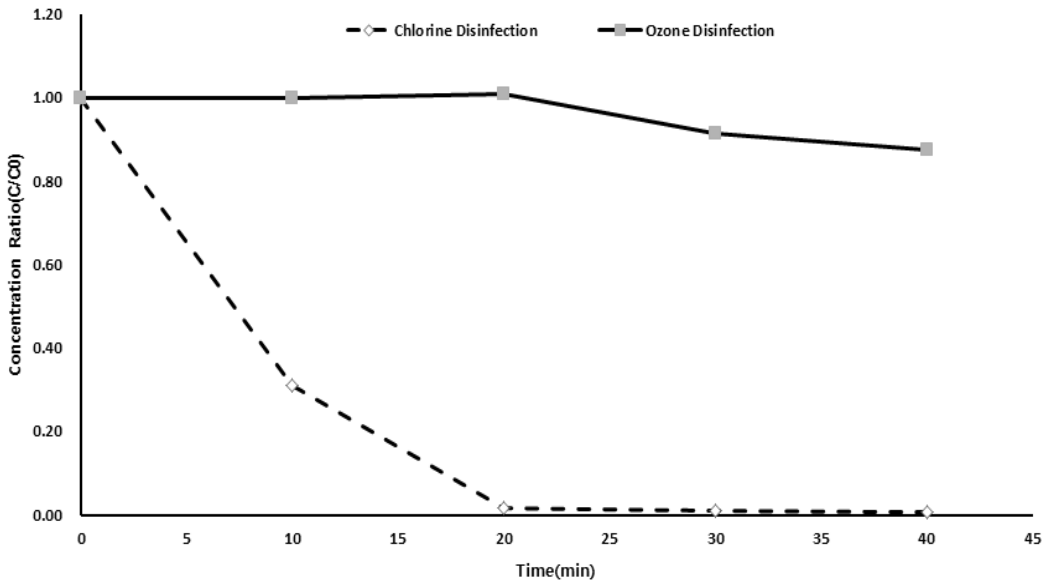


Fig. 4 The time series of chlorination and ozonation residues in batch reactors

따라서, 오존의 산화력은 20분 후에는 거의 없을 것으로 예상되었다. 이를 뒷받침하기 위해, 추

가 실험으로, 10 mg/L의 오존을 이용한 접촉 시간 변화별 colony 살균효율을 산정하였다 (Fig.

5). 그림에서 보여지는 바와 같이 처음 20분에 제어효율 (85%)과 40분의 제어효율(87%)가 거의

없음을 확인 할 수 있었고 약 87%의 효율은 처음 실험값과 유사함을 알 수 있었다 (Fig 3).

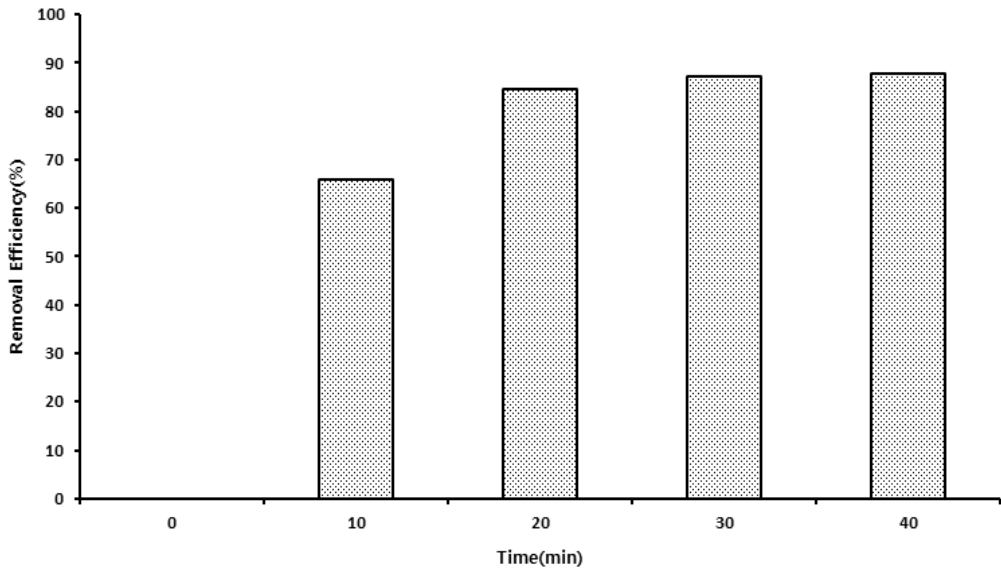


Fig. 5 The colony removal efficiency as function of time at 10 mg/L of ozone.

pB10 제거 효율도 처음 20분의 제거효율 (15.3%)과 40분의 제거효율(18.4%)가 그리 다르지 않음을 알 수 있었고(Fig 6), 최종 pB10 제거

율은 마찬가지로 처음 실험값과 유사함을 알 수 있었다(Fig 3).

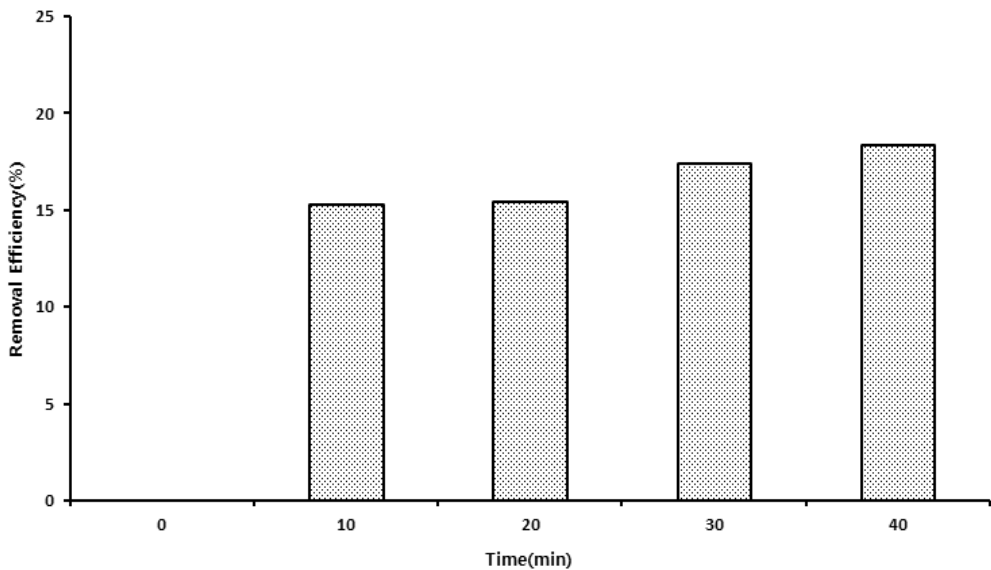


Fig. 6 The pB10 removal efficiency as function of time at 10 mg/L of ozone.

실험 결과에 따르면, 오존은 산화력자체(C)는 염소보다 강력하나 유효접촉 시간(T)은 염소만큼 유지 될 수 없다. 따라서, 오존은 일단 살균된 미생물은 그 속의 유전물질까지 강력하게 산화 시키나 (염소보다 200~400%이상의 pB10 제어율) 상대적으로 염소보다 짧은 미생물 유효 노출 시간 때문에 미생물 살균효율은 pB10만큼 높지는 않은 (염소보다 120~140%이상의 colony 제어율)결과치를 보인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 미량 오염물질 및 미생물살균을 오존을 이용하여 할 경우, 반응기내에서의 유효접촉시간, 즉 소독의 지속성을 늘리는 방안이 중요할 것으로 판단된다. 따라서, 효과적인 미량 유전 오염물질 제어를 위해서는 연속적인 오존 주입 시스템, 오존 버블사이클을 줄이는 등의 오염물질과 접촉시간을 늘리는 반응기를 고안하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

4. 결 론

- 1) *E.coli* DH5a에 대한 염소와 오존의 살균 살균율을 batch 실험으로 비교해 본 결과, 오존의 살균효율이 약 120~140% 정도 높았다.
- 2) 유전전염물질인 pB10에 대한 PCR와 qPCR을 이용하여 제거 효율을 살펴 본 결과, 오존이 염소살균에 비해 약 200~400% 정도 높은 산화력을 보여주었다. 따라서 내성유전자 물질을 제거하기 위해 오존이 보다 효과적인 산화제이라 판단된다.
- 3) 오존을 이용하여 효과적으로 항생제 내성균 및 유전자를 제어하기 위해서는 반응기내에서 유효한 오존접촉 시간을 늘려 주는 것이 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 “글로벌탑 환경기술개발사업” 으로 지원받은 과제임(과제번호: GT-11-B-01-005-1)

참 고 문 헌

권오현. 2009. 4대강 살리기 사업의 추진 필요성과 해외 사례 벤치마킹, 한국 건설산업 연구원.

환경부 및 환경관리공단. 2009. 하수처리수 재이용 가이드북.

Anderson, A.C., Reimers, R.S., Dekernion, P. 1982. A brief review of the current status of alternatives to chlorine disinfection of water. Public Health Briefs 72(11): 1290-1293.

Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D. 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Research 41(5): 1143-1151.

Bader, H. and Hoigne, J.. 1981. Determination of ozone in water by the Indigo Method, Water Research 15: 449-456.

Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon J., Kim J-H. 2010. Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. Water Research 44(1): 3410-3418.

Driedger, A.M., Rennecker, J.L., Mariñas, B.J. 2000. Sequential inactivation of *Cryptosporidium Parvum* oocysts with ozone and free chlorine, Water Research 34(14): 3591-3597.

Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P., Payment, P. 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water Research 37: 4573-4586.

Hunt, N.K., Marinas, B.J. 1997. Kinetics of *Escherichia Coli* inactivation with ozone. Water Research 31(6): 1355-1362.

Iwane, T., Urase, T., Yamamoto, K. 2001. Possible impact of treated wastewater

- discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Sci. Technol.*, 43(2): 91-99.
- Kim, S., Park, H., Chandran, K. 2010. Propensity of activated sludge to amplify or attenuate tetracycline resistance genes and tetracycline resistant bacteria: A mathematical modeling approach. *Chemosphere*, 78(9): 1071-1077.
- Macauley, J.J., Qiang, Z., Craig D. Adams, C.D., Surampalli, R., Mormile M.R. 2006. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Research*, 40: 2017-2026.
- Mezrioui, N., and Baleux, B. 1994. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Research* 28(11): 2399-2406.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., DeMarini, D.M. 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection byproducts in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 636(1-3): 178-242.
- Rosal, R., Rodriguez, A., Perdigon-Melon J.A., Petre, A., Garcia-Calvoa, E., Gomez, M.J., Aguera, A., Fernandez-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research* 44: 578-588.
- Schluter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L. J., Thomas, C.M., Puhler, A., Top, E.M. 2003. The 64 508 bp IncP-1b antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a wastewater treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1b group. *Microbiology* 149: 3139-3153.
- von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinkingwater: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* 37: 1469-1487.
- WHO. 2008. Guidelines for drinking water quality.
- Zhao, Y.-Y., Boyd, J.M., Woodbeck, M., Andrews, R.C., Qin, F., Hrudey, S.E., Li, X.-F. 2008. Formation of N-nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters. *Environmental Science & Technology* 42 (13): 4857-4862.

- 논문접수일 : 2011년 10월 12일
- 심사의뢰일 : 2011년 10월 14일
- 심사완료일 : 2011년 12월 27일