

재사용이 가능한 나노복합재료 Fe₃O₄-ACCS-Ag의 제조 및 항균 특성 평가

심재홍¹ · 김해원² · 김진원² · 서영석² · 오세강³ · 조 민² · 박정희^{2*} · 오병택^{2*}

¹네브라스카 주립대학 천연자원학부

²전북대학교 생명공학부

³한국광해관리공단

Investigation of Synthesis and Antibacterial Properties of a Magnetically Reusable Fe₃O₄-ACCS-Ag Nanocomposite

Jaehong Shim¹ · Hea-Won Kim² · Jin-Won Kim² · Young-Seok Seo²

Sae-Gang Oh³ · Min Cho² · Junghee Park^{2*} · Byung-Taek Oh^{2*}

¹School of Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, USA

²Division of Biotechnology, Collage of Environmental and Bioresource Science, Chonbuk National University, Iksan, South Korea

³Mine Reclamation Corp., Seoul, 110-727, South Korea

ABSTRACT

In this study, Fe₃O₄-ACCS-Ag nanoparticles (NPs) were successfully synthesized using silica extracted from corn cob ash. The synthesized Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs were characterized using X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX), transmission electron microscopy (TEM) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In addition, the potential application of Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs as an antibacterial material in water disinfection was investigated using *Escherichia coli* ATCC 8739 as model bacteria. The antibacterial activity of synthesized composite material showed 99.9% antibacterial effect within 20 min for the tested bacteria. From this experiment, the synthesized Fe₃O₄-ACCS-Ag nanocomposites also hold magnetic properties and could be easily recovered from the water solution for its reuse. The reused nanocomposites presented the decreasing antibacterial efficiencies with the reuse cycle but the composite used three times still killed 90% of bacteria in 20 min.

Key words : Fe₃O₄-ACCS-Ag nanoparticle, Antibacterial activity, *Escherichia coli*, Magnetic

1. 서 론

최근 의료, 축산 분야 등에서 항생제 남용에 따른 항생제 다제내성균(MDR; Mutidrug resistance)의 발생 우려가 증가하고 있다(Fan et al., 2013). 이러한 문제의 해결책으로 새로운 살균물질(Bactericider agents) 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 지하수 및 토양에 존재하는 병원성 미생물 제어방안으로 이전부터 은(Ag), 구리(Cu), 키토산(Chitosan) 등과 같은 물질들이 사용된바 있으며, 실제로 박테리아, 진균류, 바이러스 등에 대한 제어 효과 및 메커니즘이 잘 알려져 있다(Yoon et al.,

2007; Mpenyana-Monyatsi et al., 2012). 살균물질의 사용은 지나친 항생제 및 항균물질의 남용에 대한 효과적인 해결방안이 될 수 있다. 이러한 물질들 중 특히, 은의 경우 오래 전부터 강한 살균 효과와 다양한 종류의 미생물에 대한 제어 효과가 잘 알려져 있다(Kim et al., 2011).

일반적으로 미생물 불활성화에 사용되는 은의 형태는 은나노 입자(Ag NPs)와 은 이온(Ag⁺)이 있으며, 형태에 따른 미생물 불활성화 기작의 차이가 있다. 은나노 입자에 의한 미생물 불활성화는 미생물의 세포막에 손상을 입히며, 불활성화 효율은 입자의 크기와 형태에 크게 의존한다(Zhang et al., 2011a). 반면에 은 이온은 미생물로부터

*Corresponding authors : junghee.park@jbnu.ac.kr, btoh@jbnu.ac.kr

Received : 2014. 12. 29 Reviewed : 2015. 3. 27 Accepted : 2015. 4. 15

Discussion until : 2015. 8. 31

터 K^+ 의 방출을 야기하고 단백질의 thiol group과 DNA와 같은 미생물의 생체 분자(Biomolecules)들과 결합하여 세포분화의 저해 및 세포 외막에 손상을 주어 불활성화를 일으킨다(Kim et al., 2011). 또한, 이전의 연구에서 은나노 입자의 항균활성에 free-radical 형성이 관여한다고 보고된 바 있다. 은나노 입자에 의한 활성산소종(ROS; Reactive oxygen species)의 생성은 효과적인 미생물 불활성화를 일으킬 수 있음이 보고된 바 있다(Rai et al., 2012).

하지만 실제 살균제로 은나노 입자를 미생물 불활성화에 적용하기 위해서는 효율감소의 주요 원인인 은나노 입자의 응집을 해결해야 한다. 응집현상은 은나노 입자의 항균활성을 감소시킬 수 있다(Zhang et al., 2011a,b). 위와 같은 문제점에 대한 대안으로, 담체에 은나노 입자를 고정화함으로써 담체로부터 Ag(I)의 방출을 늦추고 장기간 항균활성을 가지게 하는 연구가 활발히 이루어졌다(Zhang et al., 2003). 은나노 입자를 TiO_2 , SiO_2 와 zeolite같은 담체에 코팅하여 항균활성에 관한 연구가 실시된 바 있다(Akhavan, 2009; Quang et al., 2011). 은나노 입자의 지지체로 농업 부산물을 이용함에 있어 장점은 구하기 용이하고 낮은 가격으로 사용이 가능하다는 점이며, 이전의 연구에서 은나노 입자의 지지체로 왕겨 실리카(RHS; Rice husk silica)와 같은 농업부산물 사용에 관한 연구가 이루어진 바 있다(He et al., 2013).

본 연구에서는 Zhang et al.(2011b)의 논문에서 언급한 합성 방법과 실험적 접근을 응용하였으며, 지지체로 사용한 corn cob silica(CCS)는 농업부산물인 옥수수속대(Corn cob)로부터 추출하였다. CCS에 amine group를 개질한 ACCS에 은과 Fe_3O_4 를 합성함으로써 최종적으로 Fe_3O_4 -ACCS-Ag nanoparticles(NPs)을 합성하였다. 이는 농업부산물을 이용한 Ag NPs의 지지체로의 가능성과 magnetics 성질을 부여함으로써 재사용 효율에 대한 실질적인 효율을 확인하고자 하였다. 이미 Zhang et al.(2011b) 보고한 논문에서 Tetraethyl orthosilicate(TEOS)에서 추출한 silica를 담체로 하여 은과 magnetics 성질을 부여한 매질의 특성과 불활성화 효율은 보고되어 졌다. 다만, 매질의 재사용에 따른 불활성화 효율 부분에 대한 미흡한 부분을 본 연구를 통하여 확인하고 silica source에서 추출한 CCS의 지지체로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 추후 연구 결과들 통하여 Ag NPs에 대한 지지체의 사용을 농업부산물에서 유래한 silica를 이용함으로써 폐자원의 자원재순화 가치와 재이용 효율을 높이고자 한다. 합성한 매질은 TEM, XRD, FTIR, SEM-EDX과 같은 기기적 방법의 물리·화학적 특성 분석을 통해 기존에 보고된 은

나노 입자의 합성물질과 특성을 비교하였다. 최종적으로 합성된 물질을 이용해 수처리 공정의 지표미생물로 잘 알려진 *Escherichia coli*(*E. coli*) ATCC 8739를 선정하여 불활성화 실험을 실시하였다. 또한, 불활성화에 사용된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs을 자석을 이용하여 회수하고 재사용 가능성을 확인하였다.

2. 실험방법

2.1. Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 합성

2.1.1. 옥수수속대로부터 실리카의 추출

본 연구에서 사용된 매질인 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 합성에 관한 일련의 과정들을 Fig. 1에 나타내었다. 본 모식도에서 제시된 합성단계 중 Fig. 1a는 옥수수속대로부터 식물성 천연 실리카의 추출 과정을 보여준다. Kalapathy et al.(2000)에서 제시한 sol-gel 추출 방법을 변형하여 옥수수속대로부터 천연 실리카 추출을 실시하였다. 옥수수속대를 가열하여 재를 회수하고 재 10 g과 증류수 60 mL을 혼합하였으며, HCl을 이용하여 혼합액의 pH를 3으로 조절한 후 2시간 진탕교반하였다. 2시간 후 Whatman 41필터를 이용하여 혼합액을 필터링 하였다.

필터 후 잔류물을 회수하고 증류수로 3회 세척하였으며, 1 N NaOH 용액 60 mL을 첨가하고 hot plate를 사용하여 1시간 동안 $130^\circ C$ 에서 가열하였다. Whatman 41필터에 $100^\circ C$ 증류수와 함께 잔류물을 필터링하고 여과된 용액을 회수하였다. 1 N HCl로 회수된 용액을 pH 7로 조절하여 gel 상태로 제조하였고 18시간 동안 상온에 방치하였다. 18시간 후 증류수 100 mL 첨가하여 gel을 용해시키고 2,500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 용액의 상등액을 제거하였으며, 잔류물을 증류수로 3회 세척하고 2일간 드라이오븐에서 $80^\circ C$ 로 건조하여 정제된 옥수수속대 실리카(CCS; Corn cob silica)를 회수하였다.

2.1.2. ACCS-Ag NPs의 합성

Fig. 1b는 옥수수속대로부터 추출된 CCS에 효과적으로 은을 부착시키기 위한 전처리 과정으로 3-APTES(3-Aminopropyltriethoxysilane; ACROS organics, New Jersey, USA)를 이용하여 CCS표면에 amine group을 부착시켰다(Quang et al., 2011). CCS의 개질은 Quang et al. (2011)에서 사용된 방법과 동일하게 실시하였다. EtOH (Ethanol) 30 mL에 CCS(1 g)와 3-APTES(4 g)을 혼합하고 1 mL의 증류수를 첨가한 후 3시간 동안 초음파분산기

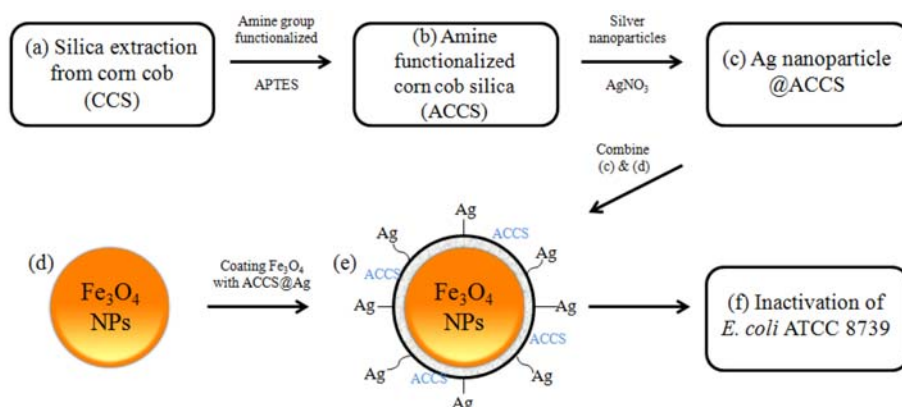


Fig. 1. Schematic of synthetic procedure of Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs.

(Sonicator)에서 효율적인 분산과 균질반응을 유도하였다. 실리카와 3-APTES가 충분하게 반응할 수 있도록 1일간 상온에 보관하였고, 이후 4,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 회수한 침전물은 마지막으로 1일간 건조하여 amine group으로 표면이 개질된 옥수수속대 실리카(ACCS; Amine immobilized on CCS(SiO₂))를 준비하였다.

Fig. 1c는 Fig. 1b에서 합성된 ACCS에 은 나노 입자를 담지하는 과정을 보여준다. 은 나노 입자의 합성을 위해 100 mM AgNO₃(Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Shiheung, Korea) 5 mL과 200 mM NaBH₄(Daejung) 10 mL을 혼합하고 2시간 동안 -4°C에 보관하였다. 2시간 후 혼합용액 5 mL에 ACCS(1 g)을 첨가하였고 3분간 소니케이션 처리후 2시간 동안 진탕교반하였다. 3 M HNO₃(Daejung)를 이용하여 용액의 pH를 3으로 조절하고 200 mM NaBH₄을 10 mL 첨가한후 1일 동안 진탕교반하였다. 해당 용액을 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 합성에 사용된 용매를 제거하고 드라이오븐에서 80°C로 건조하였다.

2.1.3. Fe₃O₄ NPs 합성 및 ACCS-Ag NPs 코팅

Fig. 1d는 Fe₃O₄ NPs의 합성과정을 보여준다. Fe₃O₄ (Magnetic)의 합성은 Liria et al.(2014)에서 제시한 방법을 이용하였으며, Fe₃O₄ NPs의 합성을 위해 질소로 포화시킨 증류수를 사용하였다. Fe₃O₄ NPs의 합성은 질소가스를 폭기시킨 용액을 사용하였으며, 2.0 M FeCl₂(Daejung) 2.5 mL(HCl 2.0 M)과 1 M FeCl₃(Daejung) 10 mL을 혼합하고 0.7 M NH₄OH(Daejung) 250 mL을 첨가한 후 10분간 1,000 rpm으로 진탕교반하였다. 10분 후 증류수로 5회 세척하고 드라이오븐에서 45°C 건조하여 실험에 사용하였다.

Fig. 1e는 합성된 Fe₃O₄ NPs에 ACCS-Ag NPs를 코팅하는 과정을 보여준다. ACCS-Ag NPs 코팅을 위한 방법은 이전에 Zhang et al.(2011b)과 Deng et al.(2005)에서 보고된 합성방법을 참고하였다. 합성을 하기전에 100 mM의 AgNO₃ 5 mL과 200 mM의 NaBH₄ 10 mL을 2시간 동안 저온 상태로 유지하였으며, ACCS 1.0 g에 AgNO₃ 5 mL을 첨가하였다. 이후 3분 동안 sonication과 2시간 동안 교반 하였다. 3 M의 HNO₃로 pH 3.0으로 후 200 mM의 NaBH₄ 10 mL 넣고 질은 갈색으로 변할 때까지 교반 하였다. 마지막으로 용매의 세척 과정을 위해 매질을 원심분리(2,000 rpm, 5 min, 5회) 후, 드라이오븐(80°C)으로 건조하였다. 다음과 같이, 합성된 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs를 사용하여 불활성화 실험에 사용하였다.

2.2. 분석학적 방법

합성된 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 형태 및 표면에 존재하는 원소 특성을 확인하기 위하여 transmission electron microscope(TEM, JEM-2010, JEOL, Tokyo, Japan)과 scanning electron microscope-energy dispersive X-ray spectroscopy(SEM-EDX, SM-6400, JEOL, Tokyo, Japan) 분석을 실시하였다. 또한, 결정상의 정성분석을 위해 X-ray diffractometer(XRD, X'pert Powder, PANalytical, Netherlands) 분석을 실시하였다. 합성된 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs 표면의 작용기를 확인하기 위해서 fourier transform infrared spectroscopy(FTIR, Spectrum GX, Perkin Elmer, California, USA) 분석을 실시하였다.

2.3. Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 항균활성 및 재사용 확인

Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs에 의한 미생물의 불활성화 효율을 확인하기 위해서 american type culture collection

(ATCC)으로부터 *E. coli* ATCC 8739 균주를 분양 받아 불활성화 실험에 사용하였다. 균주의 배양은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 합성한 매질을 이용한 불활성화 실험은 다음과 같다. 먼저, Tryptic Soy Broth에 *E. coli* ATCC 8739 균주를 37°C에서 18시간 배양하고 배양 현탁액을 1,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 제거하고 미생물 cell만 회수하여 phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)로 3회 세척한 후 cell stock solution을 얻었다. 자세한 실험법은 Cho et al. (2004)의 방법을 따랐다.

불활성화 실험을 위해 10 mM phosphate buffer(pH 7.1) 40 mL에 *E. coli* ATCC 8739 현탁액의 농도를 1×10^5 CFU/mL(Colony forming unit)로 조절하고 2 mg의 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs를 첨가하였다. 미생물 현탁액을 각각 10분, 20분 반응시키고, 불활성화 정도에 따라 1/1, 1/10과 1/100로 희석한 후, 평판도말법을 이용하여 미생물의 불활성화 효율을 확인하였다. 샘플링 후 용액에 남아 있는 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs에 의한 미생물의 불활성화를 방지하기 위하여 Landeen et al.(1989)에서 제시한 중화(Neutralization) 시약을 사용하였다. 중화 시약을 제조하기 위해 14.6%의 $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (Sigma Aldrich, Germany)와 10%의 $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{SNa}$ (Sigma Aldrich, Germany)농도의 혼합액을 제조하고 1.0 mL의 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs 반응용액에 10 μL 의 중화 시약을 첨가하였다.

Fe_3O_4 -ACCS 담체에 은나노 입자의 고정화 시 Ag(I) 입자의 방출 효율과 장기간 사용 가능성을 확인하기 위해 재사용 한 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 미생물의 불활성화 효율 변화를 확인하였다. 본 실험을 위해서 불활성화 실험 후 자석을 이용하여 상등액에 포함된 미생물을 제거하고 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs를 회수하였다. Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs를 10 mM PBS로 3회 세척하고 건조 후 동일한

방법으로 불활성화 실험을 추가로 실시 하였다. 미생물의 불활성화 효율은 반응시간이 지남에 따른 $\log N/N_0$ (N: 반응 시간이 지남에 따른 살아있는 미생물의 개체수(CFU/mL), N_0 : 반응하기 전의 초기 미생물의 개체수(CFU/mL))으로 나타냈다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 분석학적 특성

3.1.1. SEM 및 EDX 분석

합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 형태 및 원소 특성을 확인하고자 TEM과 SEM-EDX 분석을 실시하였으며, 결과를 각각 Fig. 2a와 2b에 나타내었다. TEM 분석결과는 합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 형태적 특성(Fig. 2a), SEM-EDX는 합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs에 포함된 원소의 특성을 보여준다(Fig. 2b). TEM 분석결과는 은나노 입자가 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs 표면에 균일하게 합성된 것을 보여준다. 이전에 보고된 연구에서 균일한 형태의 silica로 코팅된 Fe_3O_4 를 얻기 위해서 은나노 입자 코팅에 사용된 Ag의 농도가 중요함이 보고된 바 있다(Liu et al., 2007; Amarjargal et al., 2013). 이러한 과정은 과도한 양의 Ag 농도로 합성된 매질에서 응집현상의 유도되는 것을 방지하고 용액내에서 silica 입자들을 분산시켜 Fe_3O_4 표면에 코팅이 균일하게 이루어지게 하며, 최종적으로 합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs로부터 Fe_3O_4 가 용액에 용해되거나 산화되는 것을 방지하여 불활성화 효율을 증대 될 수 있음이 보고된 바 있다(Zhang et al., 2011b). SEM-EDX 결과는 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 주요 구성 원소가 O, Fe, Si, Ag임을 보여주며, 이러한 결과는 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs가 성공적으로 합성 되었음을 보여준다.

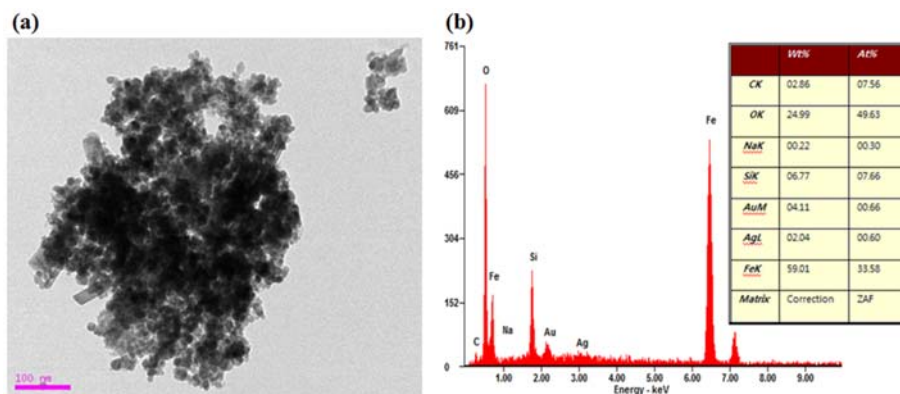


Fig. 2. The TEM micrographs (a) and SEM-EDX image (b) of synthesized Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs, the bar is 100 nm.

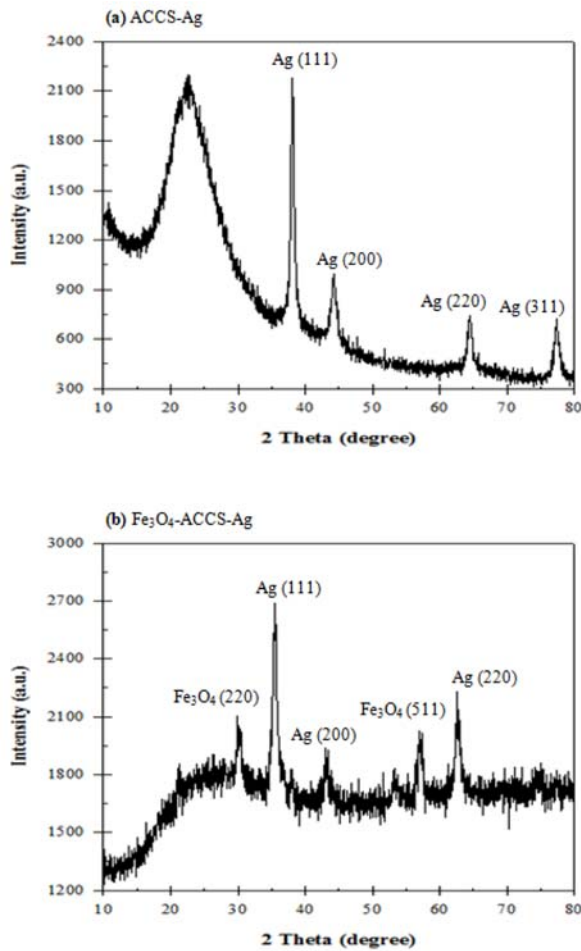


Fig. 3. The XRD spectrum of ACCS-Ag (a) and Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs (b).

3.1.2. XRD 분석

ACCS-Ag와 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 XRD 분석 결과는 합성된 매질에 존재하는 Ag와 Fe₃O₄의 결정학적 특성을 보여준다(Fig. 3a,b). 분석결과 Fig. 3a와 Fig. 3b에서 22.7° 부근의 넓은 회절 피크를 확인 할 수 있는데, 이것은 Quang et al.(2011)에 따르면 합성된 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs이 비결정형(Amorphous) 형태의 실리카(SiO₂)를 포함하고 있음을 보여준다.

ACCS-Ag NPs의 XRD 분석에서 2 theta의 35.5°, 43.4°, 62.7°에서 이전에 Jeon et al.(2003)와 Naik et al. (2011)에서 보고하였던 (111), (200), (220), (311)의 Ag NPs에 해당하는 피크 결과를 확인하였다(Fig. 3a). 이전의 연구 결과들에서 회절 피크의 강도는 은 입자의 크기와 혼합된 양과 관련되어있음을 고려하면 많은 양의 은 입자가 합성된 매질에 부착되어 있음을 확인할 수 있다(Wang et al., 2006; Quang et al., 2011). 또한 Jeon et al.

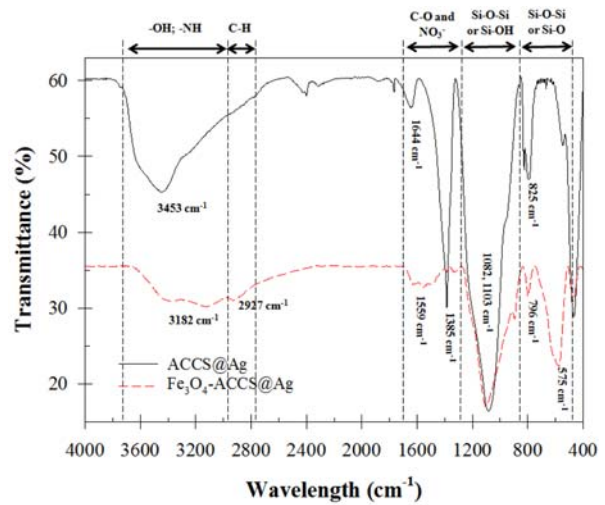


Fig. 4. The FTIR spectrum of ACCS-Ag and Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs.

(2003)과 Wang et al.(2006)의 보고에 따르면 매질의 가열 온도에 따라서 은 이온은 피크가 증가하거나 줄어드는 것을 확인할 수 있는데, 이것은 매질내 은 입자의 크기가 증가하거나 다공성 실리카의 결정화(Devitrification 혹은 Crystallization)에 따른 결과이다.

Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs 분석결과에서는 ACCS-Ag에서 확인 된 (111), (200), (220) 회절 패턴과 2 theta에서 30°와 57°에서 (220), (511)에 해당하는 Fe₃O₄의 회절 패턴이 확인되었다(Amarjargal et al., 2013). 따라서, 본 결과들을 바탕으로 실험에 사용된 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs가 ACCS-Ag와 Fe₃O₄이 성공적으로 합성되었음을 보여준다.

3.1.3. FTIR 분석

합성에 사용된 ACCS와 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs 표면에 존재하는 관능기를 확인하고자 FTIR 분석을 실시하였다(Fig. 4). FTIR 분석결과는 ACCS-Ag와 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 표면에서 3453, 3182 cm⁻¹(-OH, -NH)과 2927 cm⁻¹(C-H) 피크가 확인 되었으며, 이것은 CCS 기질에 흡착된 수분이나 3-APTES 개질로부터 확인될 수 있음이 보고된바 있다(Yanagisawa et al., 1997; Quang et al., 2011). ACCS-Ag와 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 표면에서 각각 1644, 1559 cm⁻¹(C-O) 피크가 확인되었고, 일반적으로 실리카에서 보여지는 유사한 밴드가 1082, 1103 cm⁻¹(Si-O-Si or Si-OH), 825, 796 cm⁻¹(SiO₄ tetrahedra), 575 cm⁻¹(Si-O-Si or Si-O)에서 각각 확인되었다(Jeon et al., 2003; He et al., 2013). ACCS-Ag의 결과에서 선명하게 나타난 실리카 밴드가 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs에서 감소하는 것을 확인할 수 있는데, Quang et al.(2011)에

따르면 이러한 현상은 합성된 매질에서 3-APTES의 개질은 'siloxane bridges'에서 'silanol' 작용기가 응축 되었음을 보여준다.

Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs에서 관찰되지 않은 피크가 ACCS-Ag 분석시 1385 cm^{-1} 에서 확인되었다. 이것은 Jeon et al.(2003)에서 보고된 NO_3^- 피크의 범위와 유사하였으며, ACCS-Ag의 합성에 사용된 AgNO_3 또는 HNO_3 의 영향으로 판단된다. 합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 FTIR 결과는 이전에 Quang et al.(2011)에서 실리카를 코팅한 은 나노 비드와 Wu and Liao(2011)에서 합성한 Ag-SiO₂의 분석결과와 유사하였으며, 이러한 결과는 본 실험에서 사용된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs이 성공적으로 합성되었음을 보여준다.

3.2. Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 불활성화 효율 확인

합성된 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 magnetic 특성과 매질에 의한 *E. coli* ATCC 8739의 불활성화 효율 분석결과를 Fig. 5a와 Fig. 5b에 각각 나타내었다. 매질의 불활성화 효율을 확인한 결과 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs에 10분 동안 노출되었을 경우 *E. coli*가 1 log(90%) 이상, 20분 후에는 3 log(99.9%)까지 불활성화되는 것을 확인하였다. 이전에 보고된 연구들과 비교하였을 때, Zhang et al. (2011b)의 연구에서 Fe_3O_4 -SiO₂-Ag를 이용하여 *Staphylococcus aureus*와 *E. coli*를 3 log(99.9%)까지 불활성화 시

키는데 약 1시간, Naik et al.(2011)에서 1 log(90%)의 *E. coli* 불활성화에 1시간을 고려하면 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs의 불활성화 효율이 비교적 높은 것을 알 수 있다.

매질의 재사용 가능성을 확인하고자 불활성화 실험에 사용되었던 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs를 회수하여 동일한 방법으로 불활성화 실험을 진행하였다. 분석결과 1회 회수하였을 때, 10분 내에 약 0.8 log 불활성화를 보였으며, 재사용 횟수의 증가와 함께 불활성화 효율이 점차 감소하는 것을 확인하였다. 불활성화 속도 상수값(K)를 확인한 결과 처음에 0.158이었으나 1회 회수하였을 때 0.097, 2회 0.061로 점차 감소하였다. 이러한 실험 결과는 Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs 회수후 재사용이 가능하며, 2회의 재사용 후에도 불활성화 효율이 20분 이내 90%로 매질을 효과적으로 재사용할 수 있음을 확인하였다.

일반적으로 Ag는 미생물 불활성화에 효과가 있다고 알려져 있으며(Kim et al., 2011), Ag에 의한 미생물의 불활성화 메커니즘은 다음과 같다. 은나노 실리카 매질로부터 방출된 Ag(I)가 수중에서 물질들간의 상호작용에 의해 Ag^+ 이온으로 방출되어 균일하게 흩어지게 된다. 흩어진 Ag^+ 는 효소나 단백질에 존재하는 thiol(sulfhydryl) 작용기에 결합하여 불활성화가 일어나거나 미생물 성장을 저해하거나(Chamakura et al., 2011), 세포벽에 존재하는 polysaccharides와 결합하여 변형됨이 보고된 바 있다(Shrivastava et al., 2007). 이러한 불활성화 메커니즘들은

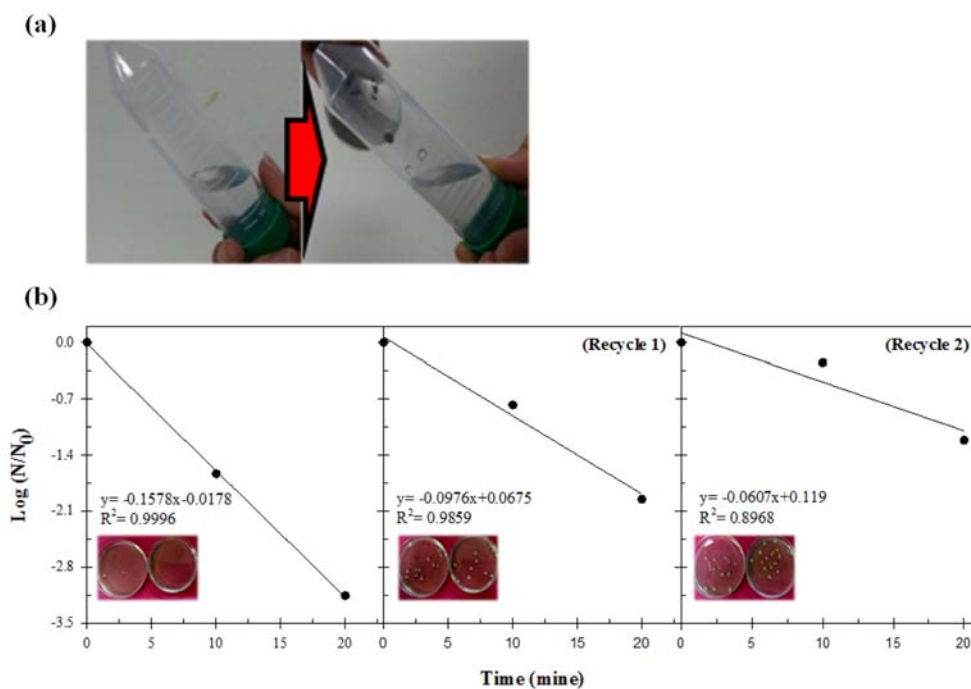


Fig. 5. Magnetic properties (a) and inactivation of *E. coli* ATCC 8739 (b) by Fe_3O_4 -ACCS-Ag NPs.

Table 1. Comparison of inactivation rate by modified silver nanoparticles

Stabilizer (& Reducing agent)	Microbial strains	Initial bacterial concentration (CFU/mL)	Exposure time (min)	Inactivation rate	References
CCS (Fe ₃ O ₄)	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁵	20	3 log	This study
SiO ₂ (Fe ₃ O ₄)	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁵	60	3.34 log	Zhang et al. (2011b)
SiO ₂ (Fe ₃ O ₄)	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁵	60	3.02 log	Zhang et al. (2011b)
Fe ₂ O ₃	<i>Escherichia coli</i>	10 ³	120	3 log	Amarjargal et al. (2013)
Silica	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁶	Flow type	3 log	Quang et al. (2013)
Al ₂ O ₃	<i>Escherichia coli</i>	6 × 10 ⁸	30	100%	Chang et al. (2008)
PBAT*	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁶	180	100%	Wu et al. (2011)
DMAB**	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁵	120	100%	Chamakura et al. (2011)
Chitosan	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁸	300	100%	Sanpui et al. (2008)

*PBAT: Polybutylene adipate-co-terephthalate, **DMAB: Dimethylamine borane

매질의 재사용 횟수의 증가에 따른 미생물 불활성화 속도 감소가 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 불활성화 메커니즘과 관련되어 있음을 보여준다. Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs가 수계에 노출됨에 따라 점차 매질에 부착된 Ag 이온이 감소하며, 결과적으로 불활성화 효율이 감소하게 된다.

Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 불활성화 효율을 비교해 보기 위해 이전에 보고된 유사 연구들을 정리하였다(Table 1). 안정화제로 TEOS silica, chitosan, Poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT)를 사용하였을 경우 *E. coli*를 3 log (99.9%) 이상 불활성화 시키는데 약 120분이 걸리고, 재회수율을 높이기 위해 Fe₃O₄에 Ag를 합성한 경우 3 log (99.9%)의 *E. coli* 불활성화에 약 120분이 소요되었다. 또한, 본 연구는 Zhang et al.(2011b)의 실험을 응용하여 적용하였으나 *Staphylococcus aureus* 와 *E. coli*를 3 log (99.9%)까지 불활성화 시키는데 약 1시간인 것을 고려하면 본 논문에서 합성한 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs의 불활성화 효율이 비교적 높은 것을 알 수 있다.

재사용에 따른 매질의 불활성화 효율 감소의 대안으로 이전에 보고된 연구에서 전해질(Electrolyte composite)의 사용이 보고된 바 있다(Jin et al., 2010). Ag NPs의 응집과 Ag 이온의 방출 속도는 혼합된 전해질에 영향을 받으며, 이것의 종류에 따라서 매질로부터 분산된 Ag NPs 농도는 최대 10³의 차이를 보일 수 있음이 확인되었다. 다음의 연구는 Ag NPs의 분산을 통해 Ag NPs에서 방출되는 Ag 이온의 양을 조절하여 미생물의 불활성화 효율을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 보여준다. 이러한 방법 이외에도 매질이 수용액에 노출되는 시간을 감소시켜, 방출되는 Ag의 양을 줄이는 것도 재사용시 불활성화 효율 감소를 최소화하는 방안이 될 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs를 합성하여 기저적 방법을 이용한 매질의 특성 분석, *E. coli* ATCC 8739의 불활성화 효율 및 재사용 가능성에 대한 연구를 진행하였다. TEM, SEM-EDX, XRD 및 FTIR를 이용한 연구 결과로부터 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs가 성공적으로 합성되었음을 확인하였으며, 합성된 매질은 20분 이내에 3 log (99.9%)로 *E. coli* ATCC 8739을 효과적으로 불활성화 시킴을 확인하였다. 합성된 매질의 재사용 가능성 확인 결과 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs에 의한 미생물의 불활성화 메커니즘은 합성된 담체로부터 방출된 Ag(I)에 의한 미생물 불활성화이며, 재사용시 Ag(I) 방출 감소로 미생물 불활성화 효율이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있다. 추후 토양과 지하수에서 항생제 내성, 병원성 미생물에 대한 방제 효과 및 환경에서 Fe₃O₄-ACCS-Ag NPs 입자의 거동에 대한 추가적인 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

References

- Akhavan, O., 2009, Lasting antibacterial activities of Ag-TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation, *J. Coll. Interf. Sci.*, **336**(1), 117-124.
- Amarjargal, A., Tijing, L.D., Im, I.T., and Kim, C.S., 2013, Simultaneous preparation of Ag/Fe₃O₄ core-shell nanocomposites with enhanced magnetic moment and strong antibacterial and catalytic properties, *Chem. Eng. J.*, **226**, 243-254.
- Chang, Q., He, H., and Ma, Z., 2008, Efficient disinfection of *Escherichia coli* in water by silver loaded alumina, *J. Inorg. Biochem.*, **102**(9), 1736-1742.

- Chamakura, K., Perez-Ballester, R., Luo, Z., Bashir, S., and Liu, J., 2011, Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants, *Coll. Surf. B: Biointer.*, **84**(1), 88-96.
- Cho, M., Chung, H.M., Choi, W.Y., and Yoon, J.Y., 2004, Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection, *Wat. Res.*, **38**, 1069-1077.
- Deng, Y.H., Wang, C.C., Hu, J.H., Yang, W.L., and Fu, S.K., 2005, Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **262**(1), 87-93.
- Fan, Z., Senapati, D., Khan, S.A., Singh, A.K., Hamme, A., Yust, B., Sardar, D., and Ray, P.C., 2013, Popcorn-Shaped Magnetic Core-Plasmonic Shell Multifunctional Nanoparticles for the Targeted Magnetic Separation and Enrichment, Label-Free SERS Imaging, and Photothermal Destruction of Multidrug-Resistant Bacteria, *Chem. Eur. J.*, **19**(8), 2839-2847.
- He, D., Ikeda-Ohno, A., Boland, D.D., and Waite, T.D., 2013, Synthesis and characterization of antibacterial silver nanoparticle-impregnated rice husks and rice husk ash, *Environ. Sci. Technol.*, **47**(10), 5276-5284.
- Jeon, H.J., Yi, S.C., and Oh, S.G., 2003, Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method, *Biomaterials*, **24**(27), 4921-4928.
- Jin, X., Li, M., Wang, J., Marambio-Jones, C., Peng, F., Huang, X., and Hoek, E.M., 2010, High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions, *Environ. Sci. Tech.*, **44**(19), 7321-7328.
- Kalpathy, U., Proctor, A., and Shultz, J., 2000, A simple method for production of pure silica from rice hull ash, *Biore-source Technol.*, **73**(3), 257-262.
- Kim, S.H., Lee, H.S., Ryu, D.S., Choi, S.J., and Lee, D.S., 2011, Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(1), 77-85.
- Landeen, L.K., Yahya, M.T., and Gerba, C.P., 1989, Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(12), 3045-3050.
- Liria, C.W., Ungaro, V.A., Fernandes, R.M., Costa, N.J., Marana, S.R., Rossi, L.M., and Machini, M.T., 2014, Synthesis, properties, and application in peptide chemistry of a magnetically separable and reusable biocatalyst, *J. Nanopart. Res.*, **16**(11), 1-13.
- Liu, J., Lee, J.B., Kim, D.H., and Kim, Y., 2007, Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **302**(1), 276-279.
- Mpenyana-Monyatsi, L., Mthombeni, N.H., Onyango, M.S., and Momba, M.N., 2012, Cost-effective filter materials coated with silver nanoparticles for the removal of pathogenic bacteria in groundwater, *Int. J. Environ. Res. Pub. He.*, **9**(1), 244-271.
- Naik, B., Desai, V., Kowshik, M., Prasad, V.S., Fernando, G.F., and Ghosh, N.N., 2011, Synthesis of Ag/AgCl-mesoporous silica nanocomposites using a simple aqueous solution-based chemical method and a study of their antibacterial activity on *E. coli*, *Particuology*, **9**(3), 243-247.
- Quang, D.V., Sarawade, P.B., Hilonga, A., Kim, J.K., Chai, Y.G., Kim, S.H., Ryu, J.Y., and Kim, H.T., 2011, Preparation of amino functionalized silica micro beads by dry method for supporting silver nanoparticles with antibacterial properties, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **389**(1), 118-126.
- Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, A.P., and Gade, A.K., 2012, Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multi-drug-resistant bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, **112**(5), 841-852.
- Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P.D., Ghosh, S.S., and Chattopadhyay, A., 2008, The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite, *Int. J. Food Microbiol.*, **124**(2), 142-146.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., and Dash, D., 2007, Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology*, **18**(22), 1-9.
- Wang, J.X., Wen, L.X., Wang, Z.H., and Chen, J.F., 2006, Immobilization of silver on hollow silica nanospheres and nanotubes and their antibacterial effects, *Mater. Chem. Pphysic.*, **96**(1), 90-97.
- Wu, C.S. and Liao, H.T., 2011, Antibacterial activity and anti-static composites of polyester/Ag-SiO₂ prepared by a sol-gel method, *J. Appl. Polym. Sci.*, **121**(4), 2193-2201.
- Yanagisawa, N., Fujimoto, K., Nakashima, S., Kurata, Y., and Sanada, N., 1997, Micro FT-IR study of the hydration-layer during dissolution of silica glass, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **61**(6), 1165-1170.
- Yoon, K.Y., Hoon Byeon, J., Park, J.H., and Hwang, J., 2007, Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, *Sci. Total Environ.*, **373**(2), 572-575.
- Zhang, L., Yu, J.C., Yip, H.Y., Li, Q., Kwong, K.W., Xu, A.W., and Wong, P.K., 2003, Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated TiO₂ with enhanced photocatalytic and bactericidal activities, *Langmuir*, **19**(24), 10372-10380.
- Zhang, W., Yao, Y., Sullivan, N., and Chen, Y., 2011a, Model-

ing the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics, *Environ. Sci. Technol.*, **45**(10), 4422-4428.

Zhang, X., Niu, H., Yan, J., and Cai, Y., 2011b, Immobilizing

silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **375**(1), 186-192.