UV-C 발광 다이오드의 전력 출력에 따른 미생물 불활성화 효율 평가

The inactivation efficacy of ultraviolet-C light–emitting diodes differs according to electrical power output

이지원[a], 김도균[a,b*]

Jiwon Lee[a] and Do-Kyun Kim[a,b*]

[a] 서울대학교 식품영양학과, [b] 서울대학교 생활과학연구소

[a] Department of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, 08826, Republic of Korea
[b] Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, 08826, Republic of Korea

김 도 균

Correspondence to

Do-Kyun Kim
Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, 08826, Republic of Korea.
Phone: 82-2-880-8749.
E-mail: dkkim@snu.ac.kr

서론

식수 안전은 개발도상국과 선진국을 막론하고 중요한 보건학적 과제로, 수인성 병원성 미생물의 전파와 밀접한 관련이 있다. 물의 음용 뿐만 아니라 세척 과정에서 식품 표면을 통한 교차 오염으로 인해 수인성 질병이 흔히 발생한다 (Brassard, Guévremont, Gagné, & Lamoureux, 2011; S. Kim et al., 2013). 개발도상국에서는 오염된 물로 인해 매년 약 50만 명의 사망자가 발생하며 (WHO, 2014), 비위생적인 보관 및 가정 내 불결한 위생 습관으로 인해 전 세계 인구의 약 30%에서 설사가 보고되었다 (Rosa & Clasen, 2010; WHO, 2014). 세계보건기구(WHO)는 수질 위생 및 개인위생 개선을 통해 전 세계 질병 부담과 사망자 수를 각각 9%와 6% 감소시킬 수 있을 것으로 예측하였다 (Pruss-Ustun & Organization, 2008).

자외선(Ultraviolet, UV) 조사는 미생물을 효과적으로 불활성화시켜 수질 안전을 확보하는 데 활용된다. UV 처리는 뉴클레오타이드의 피리미딘 이합체 (pyrimidine dimer) 형성을 유도하여 DNA 복제 및 RNA 합성을 방해함으로써 세포 증식을 억제하기 때문에 세균, 바이러스, 진핵세포 등 다양한 미생물을 불활성화한다 (Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki, & Robinson, 2000; Blatchley III et al., 2008; Lopez-Malo & Palou, 2005). 또한 UV 처리는 소독 부산물이나 잔류물을 생성하지 않으며 (Aoyagi et al., 2011; Mori et al., 2007), 화학적 첨가제를 대체할 수 있는 잠재적 살균 기술로 간주된다 (Pirnie, Linden, & Malley, 2006; Song, Mohseni, & Taghipour, 2016).

유엔환경계획(United Nations Environment Programme [UNEP])의 미나마타 협약은 수은 오염으로부터 환경을 보호하고 공중 보건을 유지하기 위해 제조 제품 내 수은 사용 및 수은 거래의 단계적 중단을 규정하고 있다. 이 국제 협약에 따라 기존 저압 수은 자외선 램프(low-pressure mercury UV lamp, LP lamp)는 2020년부터 단계적으로 폐지되었으며, 이에 따라 대체 UV 기술 개발이 진행되고 있다. 최근에는 발광다이오드(LED)를 기반으로 한 조사 시스템이 활발히 연구되고 있다.

수은을 포함하지 않는 UVC LED는 LP 램프의 한계를 보완할 수 있는 여러 장점을 가진다. 예열 과정 없이 최대 세기에 도달하고, 조사 강도가 온도와 무관하며, 소형이면서 내구성이 높아 살균 시스템에 용이하게 적용된다 (Beck et al., 2017; Matsumoto, Tatsuno, & Hasegawa, 2019; Shin, Kim, Kim, & Kang, 2016; Song et al., 2016). 최근에는 수중 병원체 불활성화를 위한 UV LED 활용 연구가 다수 보고되고 있다. Gora et al. (Gora, Rauch, Ontiveros, Stoddart, & Gagnon, 2019)에 따르면, UVC LED 조사(8 mJ/cm^2)에서 Pseudomonas aeruginosa 바이오 필름이 1.3-log 감소하였다. 또한 Escherichia coli는 서로 다른 파장에서 효과적으로 불활성화되었으며, 특히 275 nm 파장의 UVC LED 조사는 단백질 손상을 유발하여 세포의 재활성화를 억제하는 것으로 나타났다 (Nyangaresi et al., 2018).

현재까지 대부분의 UV 조사 연구는 표면에 대한 에너지 전달과 유효 조사량(mJ/cm^2)의 산정에 중점을 두어 수행되어 왔다. 조사 시간은 조사량의 표준화를 위한 중요한 독립 변수로 간주되며, 동일한 조사량은 동일한 살균 효과를 나타낸다고 가정되어 왔다. 그러나 최근 UVC LED 기술의 발전으로 출력 전력이 향상됨에 따라, 동일한 조사량을 구현하기 위해 소요되는 조사 시간은 단축되었다. 이러한 점을 고려할 때, 조사량이 동일하더라도 UVC 조사는 유전 물질 손상 뿐만 아니라 산화적 스트레스와 핵심 효소 손상에 따른 다중 표적 기능 장애를 유발하므로 살균 효과에는 차이가 발생할 수 있다 (Franz, 2001; D.-K. Kim, Kim, & Kang, 2017a; Nyangaresi et al., 2018; Oguma, Katayama, & Ohgaki, 2002).

따라서 본 연구에서는 전력 출력(2, 10, 100 mW)에 따른 UVC LED의 세균 불활성화 효과 차이를 조사하였다. 병원체의 생존 양상을 분석하기 위해 예측 모델을 적용하였으며, 처리 후 세균 생존 양상을 설명할 수 있는 기작을 제시하였다.

본론

1. 재료 및 방법

1.1 사용 균주

본 연구에서는 서울대학교(서울, 대한민국) 미생물 자원 센터로부터 E. coli O157:H7 (ATCC 35150, ATCC 43889, and ATCC 43890) 및 Staphylococcus aureus (ATCC 25923, ATCC 27213, and ATCC 29213) 균주를 제공받아 사용하였다. 균주는 5 ml의 tryptic soy broth(TSB; Difco Laboratories Inc., Franklin Lakes, NJ, USA)에서 배양한 후, 0.7 ml TSB와 0.3 ml 50% glycerol을 혼합하여 −80°C에서 보관하였다. 실험용 균주는 tryptic soy agar(TSA; Difco Laboratories Inc.) 평판배지에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였으며, 4°C에서 보관하였다.

1.2 접종균액 준비

E. coli O157:H7과 S. aureus 균주는 각각 5 ml TSB에서 37°C, 24시간 동안 진탕 배양기에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(4000 × g, 4°C, 20분)하여 침전된 세포를 회수한 후, 0.2% 멸균 peptone water(PW; BD, Franklin Lakes, NJ, USA)로 3회 세척하였다.

이후 침전된 세포를 9 ml PW에 현탁하여 최종 농도가 약 10^7 – 10^8 colony forming units(CFU)/ml이 되도록 하였다. 준비된 현탁액을 혼합하여 혼합 균주 접종액(mixed-culture cocktail)을 제조하였다.

1.3 실험 장치 및 조사강도 측정

본 실험에는 정격 출력이 2, 10, 100 mW이며 약 280 nm 파장의 피크 파장을 방출하는 UVC LED(LG Innotek Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 직류 전원 공급장치(TPM series; Toyotech, Incheon, Korea)를 통해 일정 전류를 공급하였으며, 2 mW 및 10 mW LED에는 0.1 A를, 100 mW LED에는 0.35 A를 공급하였다. 조사강도의 안정화를 위해 세 종류의 UVC LED 모두 후면에 냉각팬이 장착된 방열판을 부착하였다.

각 UVC LED의 조사강도는 분광기(AvaSpec-ULS2048-USB2-UA-50; Avantes, Apeldoorn, Netherlands)를 이용하여 200 – 400 nm 교정 범위 내에서 측정하였다. 피크 파장에서의 조사강도는 광 프로브를 LED로부터 3 cm 떨어진 지점에 위치시켜 측정하였다. Petri factor는 표면에 조사되는 자외선 분포의 균일성을 나타내는 값으로, 측정된 강도를 최대 강도로 나눈 뒤 이를 평균하여 산출하였다. 변환된 UVC 강도는 최대 강도에 Petri factor를 곱하여 계산하였으며, 이로써 평균 UVC 조사강도를 얻었다 (D.-K. Kim & Kang, 2018a, 2018b; D.-K. Kim et al., 2017a; D.-K. Kim, Kim, & Kang, 2017b; S.-J. Kim, Kim, & Kang, 2016; Shin et al., 2016).

시료 표면에 전달된 자외선 조사량은 변환된 UVC 강도에 조사 시간을 곱하여 산출하였다.

1.4 시료 준비 및 자외선 처리

시료 준비를 위하여 각 혼합 균주 칵테일 100 µl를 멸균 증류수 5 ml에 현탁한 후, 고투명 폴리스티렌 페트리 접시(15 mm [높이] × 60 mm [내경])에 분주하였다. 시료가 접종된 각 페트리 접시는 UVC LED로부터 3 cm 아래에 위치시킨 뒤, E. coli O157:H7은 1.95, 3.90, 5.85, 7.80 mJ/cm², S. aureus 7.80, 15.60, 23.40, 31.21 mJ/cm²의 조사량으로 처리하였다. 자외선의 균일한 조사를 위하여 시료는 자기 교반기(TM-17R; Jeio Tech, Seoul, Korea)를 사용하여 250 rpm에서 교반하였으며, 모든 처리는 실온(22 ± 1 ℃)에서 수행하였다.

1.5 세균 수 측정

세균 정량을 위하여 처리된 시료 1 ml를 멸균된 0.2% PW 9 ml에 연속 10배 희석한 후, 각 희석액 100 µl를 선택배지에 도말하였다. E. coli O157:H7 은 sorbitol-MacConkey agar(Difco Laboratories Inc)에, S. aureus 는 Baird-Parker agar(BPA; MB Cell, Seoul, Korea)에 각각 접종하였다. 모든 평판배지는 37℃에서 24시간 배양하였으며, 특징적인 집락을 계수하였다.

1.6 손상세포 계수

S. aureus의 손상 세포는 overlay 방법(Lee & Kang, 2001) 을 이용하여 계수하였다. 손상 세포의 회복을 위해 비선택배지로 TSA를 사용하였다. 먼저 적절히 희석된 시료 100 µl를 TSA 평판배지에 도말한 후, 37℃에서 2시간 배양하여 손상 세포가 회복되도록 하였다 (D. H. Kang & Siragusa, 1999). 이후 선택배지인 BPA 약 7 – 8 ml를 겹부어 고화시킨 후, 37℃에서 22시간 동안 추가로 배양하였다. 이 과정에서 형성된 특징적인 흑색 집락을 계수하였다. E. coli O157:H7 의 경우, 1% sorbitol을 첨가한 phenol-red agar base 배지(Difco Laboratories Inc)를 사용하였다 (Rhee, Lee, Hillers, McCURDY, & Kang, 2003). 37℃에서 24시간 배양한 후 E. coli O157:H7 특유의 백색 집락을 계수하였다. 또한 무작위로 선별한 추정 E. coli O157:H7 집락에 대하여 혈청학적 확인 (E. coli O157:H7 latex agglutination assay; Remel, Renexa, KS, USA)을 실

시하였다.

1.7 활성산소종(ROS) 생성

각 UVC LED 처리 후 생성된 세포 내 ROS 수준은 제조사 지침에 따라 CM-H_2DCFDA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 측정하였다. 처리된 세균 현탁액 1 ml에 대한 최종 농도는 5 μM이 되도록 하였으며, 형광 신호는 분광광도계(SpectraMax M2e; Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 여기(492 nm) 및 방출(520 nm) 조건에서 측정하였다 (J.-W. Kang & Kang, 2019a, 2019b; D.-K. Kim & Kang, 2018a).

1.8 생존 곡선 모델링

LED 처리 후 세균 수 변화 양상을 평가하기 위하여, 세균 생존 곡선을 GInaFiT 도구 (Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005)를 이용하여 두 가지 예측 모델 방정식에 적용하여 분석하였다. 첫 번째 방정식은 로그-선형 회귀식이다:

$$\log_{10} N = \log_{10} N_0 - k_{max}\left(\frac{d}{\ln 10}\right),$$

여기서 N(CFU/ml)은 생존 미생물 수, N_0는 초기 균수, kmax는 불활성화 속도상수, d(mJ/cm²)는 N_0의 1 log 감소에 필요한 처리 조사량을 의미한다. 두 번째 방정식은 Weibull 모델식이다:

$$\log_{10} N = \log_{10} N_0 - \left(\frac{d}{\delta}\right)^p,$$

여기서 N(CFU/ml)은 생존 미생물 수, N_0는 초기 균수, d(mJ/cm²)는 처리 조사량, δ(mJ/cm²)는 세균 수가 1 log 감소하는 데 필요한 조사량을 의미하며, p는 곡선의 형태와 관련된 매개변수로서 p 〈 1일 경우 상향 오목 곡선, p 〉 1일 경우 하향 볼록 곡선을 나타낸다.

1.9 통계 분석

모든 실험은 각 조건에 대해 이중으로 수행하였고, 동일한 실험을 독립적으로 3회 반복하였다. 수집된 모든 데이터에 대하여 SAS 소프트웨어(SAS Institute, Cary, NC,

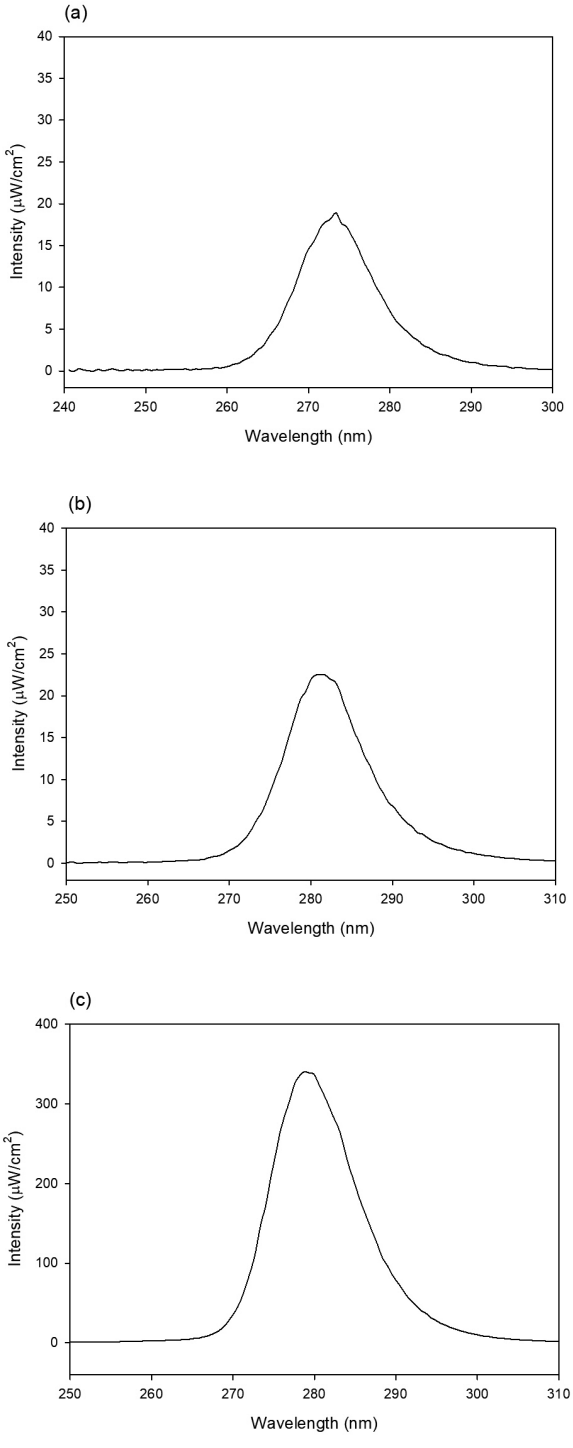

Fig. 1. Emission spectra of the (a) 2–, (b) 10–, and (c) 100–mW light–emitting diodes.

USA)를 이용하여 분산분석을 실시하였고, Duncan의 다중 범위 검정을 통해 처리군 간 세균 수 및 형광의 일정 수준 감소를 달성하는 데 필요한 평균 조사량의 유의적 차이($P < 0.05$)를 검정하였다.

2. 결과

2.1 2, 10, 100 mW UVC LED의 비교

2, 10, 100 mW UVC LED의 발광 스펙트럼은 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 각 LED의 피크 파장은 각각 273.41, 281.16, 279.37 nm에서 관찰되었다. 2 mW LED의 적분 강도는 240 – 300 nm 범위에서 205.26 μW/cm²이었으며, 10 및 100 mW LED의 적분 강도는 250 – 310 nm 범위에서 각각 301.79 및 5,887.88 μW/cm²로 나타났다. 반치폭(full width at half maximum, FWHM)은 피크 강도의 절반에서의 파장 차이로 정의되며, 2, 10, 100 mW LED에서 각각 10.67, 11.32, 11.92 nm였다.

2.2 병원성 세균의 불활성화 및 불활성화 곡선 모델링

E. coli O157:H7 과 S. aureus 는 모든 UVC LED에서 조사량 증가에 따라 효과적으로 불활성화되었으나, 출력 수준에 따라 불활성화 속도에 차이가 있었다(Figs. 2, 3). 살균 효과는 2, 10, 100 mW 순으로 감소하였다. E. coli O157:H7 은 2 mW UVC LED 처리에서 약 5 log 감소가 나타났으나, 10 및 100 mW UVC LED에서는 3.90 mJ/cm²의 조사량에서 각각 2 log 감소에 불과하였다. S. aureus 의 경우, 2 mW UVC LED 처리에서 약 5 log 감소가 나타났으나, 10 및 100 mW UVC LED에서는 15.60 mJ/cm²의 조사량에서 각각 1 log 및 2 log 감소가 나타났다.

두 균주의 생존 곡선은 로그-선형 회귀식(Fig. 2)과 Weibull 식(Fig. 3)에 적용하였다. 예측 모델에 따른 동역학적 모델식의 파라미터 값은 Tables 1과 2에 제시하였다. 로그-선형 식은 평균제곱오차(mean squared error)와 결정계수(R^2) 값에 근거하여 E. coli O157:H7의 생존을 잘 반영하였으나, S. aureus의 생존 곡선에는 부합하지 않았다. 반면, Weibull 식은 두 균주의 불활성화 거동을 모두 적절히 모사하였다.

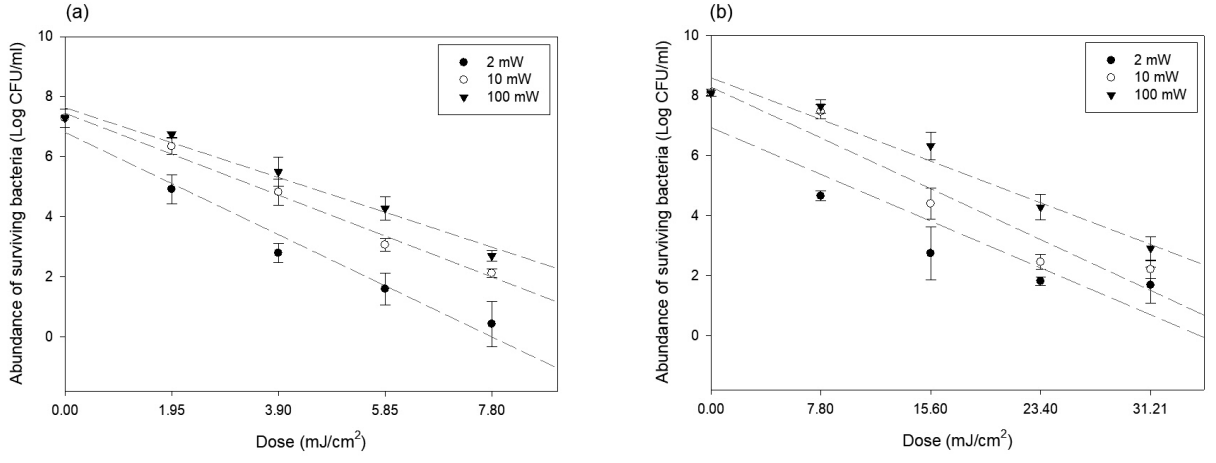

Fig. 2. Inactivation curves of (a) Escherichia coli O157:H7 and (b) Staphylococcus aureus after treatment with (●) 2–, (○) 10–, and (▼) 100–mW ultraviolet–C light–emitting diodes, fitted to log–linear regression lines. Each datapoint represents a mean calculated from three experiments, and error bars indicate standard deviations. CFU, colony forming unit.

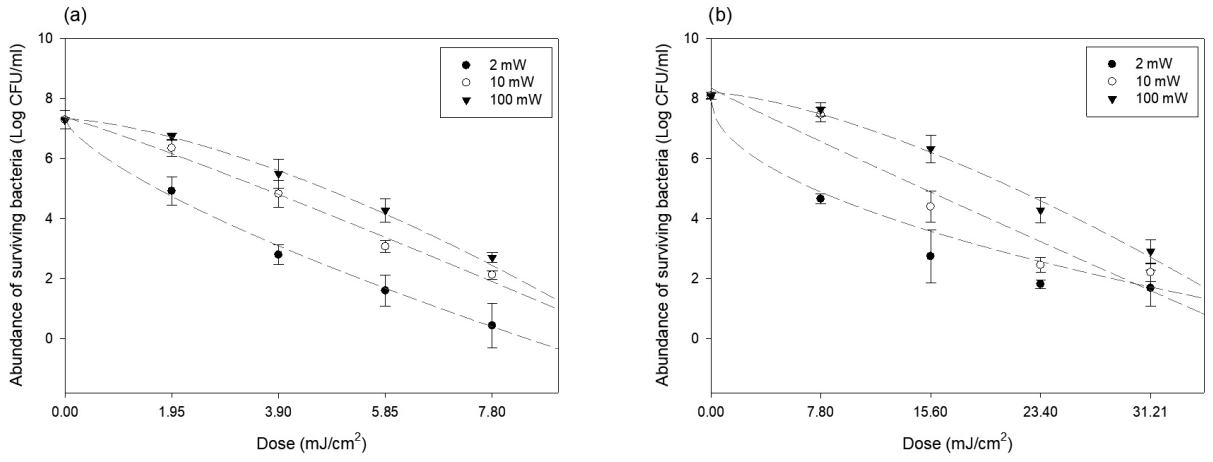

Fig. 3. Weibull modeling of the inactivation curves of (a) E. coli O157:H7 and (b) S. aureus after treatment with (●) 2–, (○) 10–mW, and (▼) 100–mW ultraviolet–C light–emitting diodes. Each datapoint represents a mean calculated from three experiments, and error bars indicate standard deviations.

2.3 손상세포의 회복

Fig. 4에는 E. coli O157:H7 과 S. aureus 에 대하여 각각 3.90 및 15.60 mJ/cm²의 UVC LED 처리 후 세균 수 감소와 손상세포 수 변화를 나타내었다. 2 mW 및 10 mW UVC LED 처리 후에는 선택배지와 overlay 배지에서 배양한 두 균주 간 유의적 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$). 반면, 100 mW UVC LED 처리 시에는 세균 수가 유의적으로 감소하였으며($P < 0.05$), 이는 해당 출력에서 일부 세포가 손상되어 회복 과정을 거쳤음을 시사한다.

2.4 ROS 생성

각 UVC LED 처리 후 생성된 ROS의 수준은 Table 3에 제시하였다. 무처리군의 ROS 수준은 대조군(100%)으로 간주하였다. 2, 10, 100 mW UVC LED 처리군 모두에서 대조군보다 높은 ROS 수준이 확인되었다. 동일 조사량 조건에서는 2 mW 처리군에서 가장 높은 ROS 수준이 관찰되었고, 그 다음은 10 mW, 100 mW 처리군 순이었다. 특히, 2 mW와 100 mW UVC LED 처리 간에는 유의적인 차이가 확인되었다($P < 0.05$).

3. 고찰

수자원 안전성 확보는 공중 보건 유지 측면에서 중요한 전 지구적 과제이다. 세계보건기구(WHO)에 따르면, 전 세계적으로 약 21억 명이 가정에서 안전한 음용수를 공급받지 못하고 있으며, 이로 인해 매년 약 50만 명이 수질 오염으로 사망한다 (WHO, 2014). 또한 미국에서는 매년 약 1,000건의 수인성 병원체 관련 질환이 보고되고 있다 (Prevention). 수중 미생물 관리를 위해 UV 소독 시스템이 활용되고 있으며, 이 중 LP 램프가 널리 사용되고 있다 (Hijnen, Beerendonk, & Medema, 2006).

2013년 채택된 유엔환경계획(UNEP) 미나마타 협약은 수은 함유 제품의 제조 및 수은의 수출입을 규제하고 있으며, 이에 따라 기존의 LP 램프는 가까운 미래에 단계적으로 폐지될 예정이다. LP 램프를 대체할 수 있는 기술로서 UVC LED가 주목받고 있으며, 그 주요 특성, 미생물 살균 효과, 및 UVC LED 피크 파장에 따른

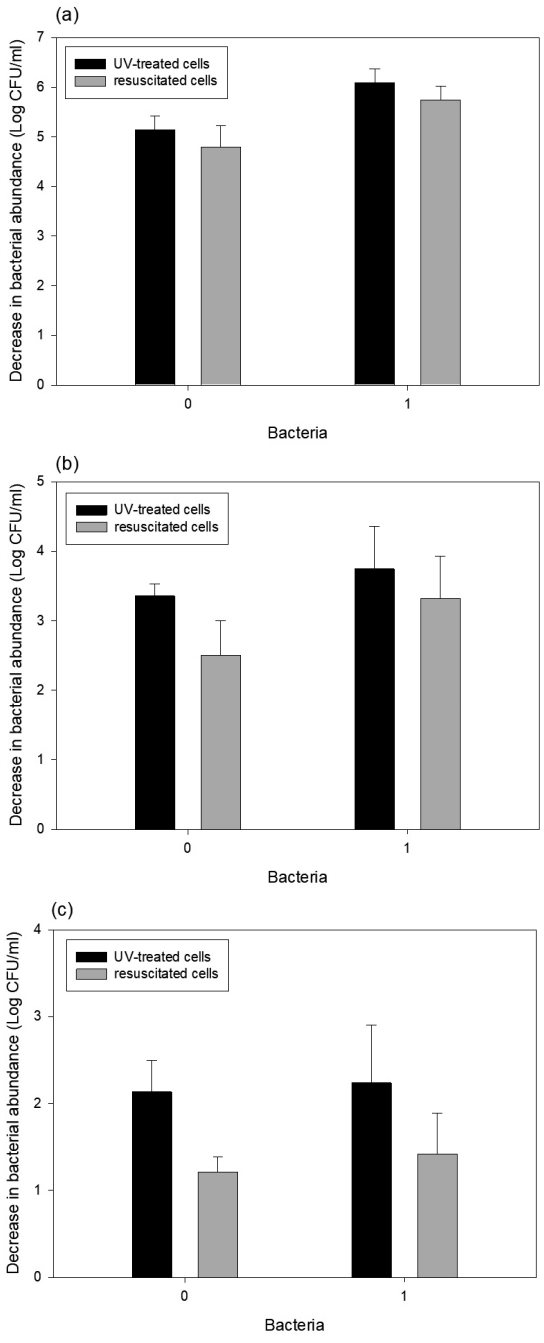

Fig. 4. Decreases in the abundances of treated (black bars) and resuscitated (gray bars) cells (log CFU/ml) after treatment with (a) 2–, (b) 10–, and (c) 100–mW ultraviolet (UV)–C light–emitting diodes. The height of each bar represents a mean calculated from three experiments, and error bars indicate standard deviations. Different letters for the same pathogen indicate significant differences between cell types ($P < 0.05$).

불활성화 기작이 규명된 바 있다 (D.-K. Kim & Kang, 2018b; D.-K. Kim et al., 2017a, 2017b; S.-J. Kim et al., 2016; Shin et al., 2016). 또한, 펄스형 UVC LED 시스템이 식중독균을 효과적으로 불활성화 할 수 있음이 보고되었다 (D.-K. Kim & Kang, 2018a). 그러나 이러한 선행연구에서는 조사량과 처리 시간이 독립변수로 고려되었으며, 살균 효과의 차이는 UVC LED 조사 강도의 차이에 기인하는 것으로 여겨졌다. 따라서 본 연구에서는 동일한 조사량 조건에서 출력 수준이 서로 다른(2, 10, 100 mW) UVC LED의 살균 효과를 평가하였다.

세 가지 LED 중 100 mW UVC LED의 적분 강도가 가장 높았으며, 이어 10 mW 및 2 mW LED 순으로 나타났다. 강도 분석 결과를 바탕으로, 목표 조사량을 각 UVC LED의 적분 강도로 나누어 처리 시간을 산출하였으며, 이를 통해 모든 시료에 동일한 조사량이 적용되도록 하였다. 또한, 전원 장치를 통해 처리 시간을 소수점 둘째 자리까지 정밀하게 조절하였다.

E. coli O157:H7 의 경우 3.90 mJ/cm^2, S. aureus 의 경우 15.60 mJ/cm^{2}의 조사량에서 LED 출력에 따른 불활성화 차이가 뚜렷하게 나타났다(Figs. 2, 3). 2 mW UVC LED 처리에서 불활성화 효과가 가장 컸으며, 100 mW 처리에서 가장 작았다($P < 0.05$). 세균을 일정 수준까지 감소시키는 데 필요한 조사량(D_{xd})은 로그-선형 식과 Weibull 식을 통해 산출하였으며(Table 1), LED 출력 증가에 따라 D_{xd} 값도 증가하였다. 이는 동일한 세균 감소 효과를 달성하려면 100 mW UVC LED는 2 mW UVC LED보다 더 긴 조사 시간이 필요함을 의미한다. 아울러, 두 균주 모두에서 2 mW와 100 mW UVC LED 간의 Dxd 값 차이는 통계적으로 유의하였다($P < 0.05$).

이러한 차이를 정밀하게 평가하기 위하여 손상세포에 대한 추가 실험을 수행하였으며, 그 결과 세균 수 변화 양상이 Fig. 4에 제시되었다. 2 mW 및 10 mW UVC LED 처리에서는 E. coli O157:H7 과 S. aureus

Table 1. Goodness of fit between the log-linear regression model and survival curves for Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus, and the doses (mJ/cm2) required to achieve 3-log (D3d) and 5-log (D5d) reductions in bacterial abundance in an ultraviolet (UV)-C light-emitting-diode (LED) water disinfection system.

		Log-linear			
	UVC LED (mW)	MSE	R^2	D_{3d}	D_{5d}
E. coli O157:H7	2	0.3846 0.1869	0.9612 ± 0.0174	3.48 ± 0.47 A	5.80 ± 0.79 A
	10	0.1216 ± 0.0141	0.9806 ± 0.0032	4.30 ± 0.16 B	7.17 ± 0.26 B
	100	0.1579 ± 0.1761	0.9623 ± 0.0456	5.06 ± 0.50 B	8.43 ± 0.83 B
S. aureus	2	1.6223 ± 1.0000	0.8337 ± 0.0098	15.01 ± 1.15 A	25.02 ± 1.92 A
	10	0.7464 ± 0.2187	0.9267 ± 0.0200	13.96 ± 0.31 A	23.26 ± 0.51 A
	100	0.2552 ± 0.1034	0.9604 ± 0.0171	17.13 ± 1.38 B	28.55 ± 2.30 B

MSE, mean squared error. The data are presented as the means ± standard deviations of three replicates for each UV treatment. Different uppercase letters in a column for each pathogen indicate significantly different values between treatments ($P < 0.05$).

Table 2. Goodness of fit between the Weibull equation and survival curves for E. coli O157:H7 and S. aureus, and the doses (mJ/cm2) needed to achieve 3- and 5-log reductions in bacterial abundance in an ultraviolet-C light-emitting diode (UVC LED) water disinfection system.

	UVC LED (mW)	Weibull					
		MSE	R^2	δ	*p*	D_{3d}	D_{5d}
E. coli O157:H7	2	0.1858 0.0358	0.9870 ± 0.0050	0.5118 ± 0.1891	0.7053 ± 0.0853	2.39 ± 0.60 A	4.93 ± 1.01 A
	10	0.1298 ± 0.0464	0.9860 ± 0.0058	1.6414 ± 0.4292	10900 ± 0.1837	4.49 ± 0.45 B	7.22 ± 0.24 B
	100	0.0156 ± 0.0207	0.9980 ± 0.0025	2.7146 ± 1.0736	1.4999 ± 0.5026	5.70 ± 0.89 B	8.14 ± 0.38 B
S. aureus	2	0.6110 ± 0.4233	0.9579 ± 0.0291	0.8582 ± 0.6407	0.5101 ± 0.1444	6.19 ± 2.87 A	16.62 ± 3.50 A
	10	1.0075 ± 0.3144	0.9294 ± 0.0196	4.2663 ± 1.0804	0.9574 ± 0.1120	13.36 ± 1.63 B	22.80 ± 1.42 B
	100	0.1003 ± 0.0194	0.9898 ± 0.0009	9.7250 ± 1.5784	1.4522 ± 0.1613	20.68 ± 1.85 C	29.42 ± 1.85 C

MSE, mean squared error; δ, dose required for the first decimal reduction (mJ/cm2); p, parameter associated with the shape of the curve. The data are presented as the means ± standard deviations of three replicates for each UV treatment. Different uppercase letters in a column for each pathogen indicate significantly different values between treatments ($P < 0.05$).

의 불활성화 세포수와 회복된 세포 수 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이는 손상세포가 거의 생성되지 않았고, 대부분의 세포가 완전히 불활성화되었음을 보여준다. 그러나 100 mW UVC LED 처리에서는 두 균주 모두에서 불활성화 세포수와 회복된 세포 수 간에 유의적인 차이가 관찰되었으며($P < 0.05$), 이는 100 mW 조건에서 세포가 완전히 불활성화되지 않고 일부가 손상 상태로 남아 회복될 수 있음을 시사한다. Kim et al. (D.-K. Kim et al., 2017a) 은 E. coli O157:H7 과 Salmonella typhimurium 이 저선량 UVC LED 조

사 조건에서 아임계적 손상을 입을 수 있음을 보고하였다. 또한, UVC 처리 후 E. coli 와 Listeria innocua에서 세포막 무결성이 현저히 손상되었음에도 불구하고 효소 활성이 지속되는 세포가 유세포분석법(flow cytometry)에 의해 확인되었다 (Schenk, Raffellini, Guerrero, Blanco, & Alzamora, 2011). 이러한 손상 세포 세부 집단(sub-population)은 대사활성은 유지하나 물리적 손상에 따른 세포 성장 억제로 인해 선택배지에서 증식하지 못하므로, "배양 불가능 생존 세포(viable but nonculturable, VBNC)"로 정의된다 (Oliver, 2016). UV 처리는 E. coli, P. aeruginosa, Legionella pneumophila, Listeria monocytogenes, and Salmonella Thompson을 포함한 다양한 세균에서 VBNC 세포의 발생과 관련된 것으로 보고되었다 (Grossi, Dey, & Ashbolt, 2018; Highmore, Warner, Rothwell, Wilks, & Keevil, 2018; N. J. Rowan, Valdramidis, & Gomez-Lopez, 2015; Zhang, Ye, Lin, Lv, & Yu, 2015). 아임계적 손상 세포는 적절한 조건에서 병원성을 다시 발현할 가능성이 있으므로, UVC 처리 후 이러한 세포를 고려하는 것은 중요하다 (Wu, 2008).

고강도의 자외선은 세포에 더 많은 자외선 에너지가 전달되어 살균 활성이 증가한다. 펄스 제논램프(pulsed xenon lamp)는 짧은 조사 시간 내에 강렬한 자외선을 방출할 수 있어, 저압 수은 램프(LP lamp)보다 병원체를 보다 효과적으로 불활성화 할 수 있는 것으로 보고되었다 (Anderson, Rowan, MacGregor, Fouracre, & Farish, 2000; Farrell, Garvey, Cormican, Laffey, & Rowan, 2010; V Mm Gomez-Lopez, Devlieghere, Bonduelle, & Debevere, 2005; Levy, Aubert, Lacour, & Carlin, 2012; N. Rowan et al., 1999; Woodling & Moraru, 2007). 이러한 고강도 자외선은 광자 작용 및 광열 효과를 매개로 물리적 세포 손상을 일으켜 추가적인 세균 불활성화를 유도할 수 있다 (Vicente M Gomez-Lopez, Ragaert, Debevere, & Devlieghere, 2007).

자외선 처리는 통상적으로 조사량을 기준으로 하며, 조사 강도가 높으면 처리 시간이 짧아지고, 반대로 강도가 낮으면 길어지도록 설정된다 (Bolton & Linden, 2003). 따라서 동일한 조사량 조건에서는 조사 강도가 달라지더라도 시료가 받는 자외선의 총량은 이론적으로 같게 된다.

그러나 본 연구에서는 조사 강도가 가장 높은 LED(100 mW)에서 오히려 가장 낮은 살균 효과가 관찰되었다. 본 실험에서 차이를 보인 변수는 처리 시간뿐이었으므로, 이러한 결과는 처리 시간의 차이에 기인했을 가능성이 있다. 장시간 처리는 세균 DNA에 충분한 자외선 손상을 축적 시킬 수 있었던 반면, 0.66초 및 2.65초와 같은 짧은 처리 시간은 DNA 손상을 발생시키기에 미치지 못했을 것으로 보인다. 또한, 처리 시

Table 3. Reactive oxygen species (ROS) generation relative to the control level (%) in E. coli O157:H7 and S. aureus after treatment with ultraviolet-C light-emitting diodes with three types of power output.

	Relative ROS generation (%)	
	E. coli O157:H7	*S. aureus*
Control	100.00 ± 0.00 C	100.00 ± 0.00 C
2 mW	131.99 ± 2.49 A	128.91 ± 5.79 A
10 mW	111.65 ± 9.58 B	114.70 ± 8.31 B
100 mW	103.74 ± 2.97 BC	104.91 ± 2.61 BC

The data are presented as the means ± standard deviations of three replicates for each UV treatment. Different uppercase letters in each column indicate significantly different values between treatments ($P < 0.05$).

간이 길어질수록 세포 표면 또는 내부에서 활성산소종(ROS)이 생성될 수 있음이 확인되었다(Table 3). UVC LED 조사와 ROS에 의한 DNA 손상과 다중 표적 손상은 세균 불활성화 효과를 증대시켰다. 이러한 영향으로 2 mW UVC LED 처리에서 상대적으로 더 큰 세균 수 감소가 나타난 것으로 판단된다. Kang and Kang (J.-W. Kang & Kang, 2019b) 은 E. coli O157:H7, S. typhimurium, and L. monocytogenes 를 254 nm 및 222 nm UV 램프로 조사한 후 세포 내 총 ROS를 측정하였다. UV 처리에 따라 ROS가 현저히 증가하였으며, 이는 ROS가 세균 불활성화 과정에 관여함을 시사한다. ROS는 세포막에서 지질 과산화를 유도하여 세포막 투과성을 증가시키고, 궁극적으로 세포 사멸을 유발할 수 있다 (Lovrić, Cho, Winnik, & Maysinger, 2005). 또한, UVC LED 및 펄스형 UVC LED 조사에 의해 발생한 ROS는 세균의 막전위 손상, 지질 과산화, 효소 활성 소실 등 다양한 형태의 손상을 유발하는 것으로 보고되었다 (D.-K. Kim & Kang, 2018a; D.-K. Kim et al., 2017a).

본 연구에서는 동일한 조사량 조건에서 출력 수준이 서로 다른(2, 10, 100 mW) UVC LED의 식중독균 불활성화 효과를 비교하였다. 이에 따라 세 가지 UVC LED 간에 살균 효과의 유의적인 차이가 나타났으며, 특히 2 mW UVC LED 처리에서 E. coli O157:H7과 S. aureus의 세균 수가 가장 크게 감소하였다. 또한, 100 mW UVC LED 처리에서는 아임계적 손상 세포가 확인된 반면, 2 mW 및 10 mW 처리에서는 관찰되지 않았다. 이는 짧은 조사 시간으로 인하여 ROS 생성이 충분히 이루어지지 못했기 때문으로 해석된다. 따라서 세균을 효과적으로 불활성화하기 위해서는 조사량과 더불어 처리 시간 또한 최적 조건 설정 시 반드시 고려되어야 한다.

국문 요약

자외선(UV) 소독은 수중 병원성 미생물 제어에 효과적인 수단으로 보고되고 있다. 기존 저압 수은램프를 대체할 잠재적 기술로서 발광다이오드(LED)를 기반으로 한 UVC 시스템이 개발되어 활발히 연구되고 있다. 본 연구에서는 전력 출력 수준(2, 10, 100 mW)에 따른 UVC LED의 Escherichia coli O157:H7 및 Staphylococcus aureus 불활성화 효율을 평가하였다. 두 병원체 모두에서 2 mW LED 조사 시 가장 높은 살균 효과가 관찰되었으며, 그 다음으로 10 mW와 100 mW 조사 순이었다. 병원체의 생존 곡선은 Weibull 모델에 의해 설명될 수 있었다. 회귀분석 결과, 3-log 및 5-log 감소를 달성하기 위해 요구되는 조사량은 2 mW와 100 mW LED 처리 간 유의한 차이를 보였으며, 100 mW LED에서 목표 수준 달성을 위해 더 많은 에너지가 요구되는 것으로 나타났다. 또한 100 mW LED 조사에서는 적절한 조건에서 회복 가능한 부분 손상 세포가 생성된 것으로 확인되었으나, 다른 출력 조건에서는 관찰되지 않았다. 세포 내 활성산소종(ROS) 수준은 세 가지 LED 처리군 간에 유의한 차이($P < 0.05$)를 나타내었으며, 이는 살균 효과의 차이로 연결되었다. 이러한 결과는 UVC LED가 핵산 손상 뿐만 아니라 ROS 생성을 유도함을 시사하며, 특히 장시간 조사는 ROS 증가를 통해 세포 대사 기능 상실을 유발하여 세포를 단순 손상 상태가 아닌 불활성화 상태로 전환시킴을 보여준다.

Acknowledgement

본 연구는 서울대학교 신임교수 연구정착금으로 지원되는 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

참고 문헌

1. Anderson, J. G., Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Fouracre, R. A., & Farish, O. (2000). Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science, 28*(1), 83-88.

2. Aoyagi, Y., Takeuchi, M., Yoshida, K., Kurouchi, M., Yasui, N., Kamiko, N., . . . Nanishi, Y. (2011). Inactivation of bacterial viruses in water using deep ultraviolet semiconductor light-emitting diode. *Journal of Environmental Engineering, 137*(12), 1215-1218.

3. Beck, S. E., Ryu, H., Boczek, L. A., Cashdollar, J. L., Jeanis, K. M., Rosenblum, J. S., . . . Linden, K. G. (2017). Evaluating UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy. *Water research, 109*, 207-216.

4. Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 80*(6), 637-645.

5. Blatchley III, E. R., Shen, C., Scheible, O. K., Robinson, J. P., Ragheb, K., Bergstrom, D. E., & Rokjer, D. (2008). Validation of large-scale, monochromatic UV disinfection systems for drinking water using dyed microspheres. *Water research, 42*(3), 677-688.

6. Bolton, J. R., & Linden, K. G. (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering, 129*(3), 209-215.

7. Brassard, J., Guévremont, É., Gagné, M.-J., & Lamoureux, L. (2011). Simultaneous recovery of bacteria and viruses from contaminated water and spinach by a filtration method. *International journal of food microbiology, 144*(3), 565-568.

8. Farrell, H., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J., & Rowan, N. (2010). Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. *Journal of applied microbiology, 108*(5), 1494-1508.

9. Franz, X. (2001). Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. Encyclopedia of life sciences. In: Macmillan Publishing Group/www. els. net.

10. Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Van Impe, J. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International journal of food microbiology, 102*(1), 95-105.

11. Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International journal of food microbiology, 103*(1), 79-89.

12. Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science & technology, 18*(9), 464-473.

13. Gora, S. L., Rauch, K. D., Ontiveros, C. C., Stoddart, A. K., & Gagnon, G. A. (2019). Inactivation of biofilm-bound Pseudomonas aeruginosa bacteria using UVC light emitting diodes (UVC LEDs). *Water research, 151*, 193-202.

14. Grossi, M., Dey, R., & Ashbolt, N. (2018). Searching for Activity Markers that Approximate (VBNC) Legionella pneumophila Infectivity in Amoeba after Ultraviolet (UV) Irradiation. *Water, 10*(9), 1219.

15. Highmore, C., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S., & Keevil, C. (2018). Viable but nonculturable Listeria monocytogenes and Salmonella enterica Thompson induced by chlorine stress remain infectious. *mBio*.

16. Hijnen, W., Beerendonk, E., & Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. *Water research, 40*(1), 3-22.

17. Kang, D. H., & Siragusa, G. (1999). Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl. Environ. Microbiol., 65*(12), 5334-5337.

18. Kang, J.-W., & Kang, D.-H. (2019a). Increased resistance of Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157: H7 to 222-nm krypton-chlorine excilamp treatment by acid adaptation. *Appl. Environ.*

Microbiol., AEM. 02221-02218.

19. Kang, J.-W., & Kang, D.-H. (2019b). The synergistic bactericidal mechanism of simultaneous treatment with a 222-nanometer krypton-chlorine excilamp and a 254-nanometer low-pressure mercury lamp. *Appl. Environ. Microbiol.*, *85*(1), e01952-01918.

20. Kim, D.-K., & Kang, D.-H. (2018a). Elevated inactivation efficacy of a pulsed UVC light-emitting diode system for foodborne pathogens on selective media and food surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, *84*(20), e01340-01318.

21. Kim, D.-K., & Kang, D.-H. (2018b). UVC LED irradiation effectively inactivates aerosolized viruses, bacteria, and fungi in a chamber-type air disinfection system. *Appl. Environ. Microbiol.*, *84*(17), e00944-00918.

22. Kim, D.-K., Kim, S.-J., & Kang, D.-H. (2017a). Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Research International*, *97*, 280-287.

23. Kim, D.-K., Kim, S.-J., & Kang, D.-H. (2017b). Inactivation modeling of human enteric virus surrogates, MS2, Qβ, and ΦX174, in water using UVC-LEDs, a novel disinfecting system. *Food Research International*, *91*, 115-123.

24. Kim, S.-J., Kim, D.-K., & Kang, D.-H. (2016). Using UVC light-emitting diodes at wavelengths of 266 to 279 nanometers to inactivate foodborne pathogens and pasteurize sliced cheese. *Applied and environmental microbiology*, *82*(1), 11-17.

25. Kim, S., Ghafoor, K., Lee, J., Feng, M., Hong, J., Lee, D.-U., & Park, J. (2013). Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water research*, *47*(13), 4403-4411.

26. Lee, S.-Y., & Kang, D.-H. (2001). Suitability of overlay method for recovery of heat-injured Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium. *Food Science and Biotechnology*, *10*(3), 323-326.

27. Levy, C., Aubert, X., Lacour, B., & Carlin, F. (2012). Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light. *International journal of food microbiology*, *152*(3), 168-174.

28. Lopez-Malo, A., & Palou, E. (2005). Ultraviolet light and food preservation. *Novel food processing technologies*, 464-484.

29. Lovrić, J., Cho, S. J., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005). Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry & biology*, *12*(11), 1227-1234.

30. Matsumoto, T., Tatsuno, I., & Hasegawa, T. (2019). Instantaneous Water Purification by Deep Ultraviolet Light in Water Waveguide: Escherichia Coli Bacteria Disinfection. *Water*, *11*(5), 968.

31. Mori, M., Hamamoto, A., Takahashi, A., Nakano, M., Wakikawa, N., Tachibana, S., . . . Kinouchi, Y. (2007). Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED. *Medical & biological engineering & computing*, *45*(12), 1237-1241.

32. Nyangaresi, P. O., Qin, Y., Chen, G., Zhang, B., Lu, Y., & Shen, L. (2018). Effects of single and combined UV-LEDs on inactivation and subsequent reactivation of *E. coli* in water disinfection. *Water research*, *147*, 331-341.

33. Oguma, K., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2002). Photoreactivation of Escherichia coli after low-or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(12), 6029-6035.

34. Oliver, J. D. (2016). The viable but nonculturable state for bacteria: status update. *Microbe*, *11*(4), 159-164.

35. Pirnie, M., Linden, K. G., & Malley, J. (2006). Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. *US Environmental Protection Agency*, *2*(11), 1-436.

36. Prevention, C. f. D. C. a. Surveillance Reports for Drinking Water-associated Disease & Outbreaks. Retrieved from https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/drinking-surveillance-reports.html

37. Pruss-Ustun, A., & Organization, W. H. (2008). Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health.

38. Rhee, M.-S., Lee, S.-Y., Hillers, V. N., McCURDY, S. M., & Kang, D.-H. (2003). Evaluation of consumer-style cooking methods for reduction of Escherichia coli O157: H7 in ground beef. *Journal of food protection*,

66(6), 1030-1034.

39. Rosa, G., & Clasen, T. (2010). Estimating the scope of household water treatment in low-and medium-income countries. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 82*(2), 289-300.

40. Rowan, N., MacGregor, S., Anderson, J., Fouracre, R., McIlvaney, L., & Farish, O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and environmental microbiology, 65*(3), 1312-1315.

41. Rowan, N. J., Valdramidis, V. P., & Gomez-Lopez, V. M. (2015). A review of quantitative methods to describe efficacy of pulsed light generated inactivation data that embraces the occurrence of viable but non culturable state microorganisms. *Trends in food science & technology, 44*(1), 79-92.

42. Schenk, M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G. A., & Alzamora, S. M. (2011). Inactivation of Escherichia coli, Listeria innocua and Saccharomyces cerevisiae by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. *LWT-Food Science and Technology, 44*(1), 191-198.

43. Shin, J.-Y., Kim, S.-J., Kim, D.-K., & Kang, D.-H. (2016). Fundamental characteristics of deep-UV light-emitting diodes and their application to control foodborne pathogens. *Applied and environmental microbiology, 82*(1), 2-10.

44. Song, K., Mohseni, M., & Taghipour, F. (2016). Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. *Water research, 94*, 341-349.

45. WHO. (2014). Preventing Diarrhoea Through Better Water, Sanitation and Hygiene: Exposures and impacts in low- and middle-income countries.

46. Woodling, S. E., & Moraru, C. I. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of Listeria innocua using broad-spectrum pulsed light. *Journal of food protection, 70*(4), 909-916.

47. Wu, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food microbiology, 25*(6), 735-744.

48. Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., & Yu, X. (2015). UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Environmental science & technology, 49*(3), 1721-1728