과산화수소 증기 시스템을 이용한 미생물 제독에 관한 연구

김윤기 · 김민철 · 윤성녀 · 황현철[†] · 류삼곤*

삼양화학공업(주), *국방과학연구소

A Study on Microorganisms Decontamination Using a Vapor-Phase Hydrogen Peroxide System

Yun Ki Kim, Min Cheol Kim, Sung Nyo Yoon, Hyun Chul Hwang[†], and Sam Gon Ryu*

Samyang chemical Co., Ltd. 251-3, Seoksu-dong, Manan-gu, Anyang-si, Korea

*Agency for Defense Development, Yuseong, P.O.Box 35, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Objectives: Effectiveness and conditions of vapor-phase hydrogen peroxide (VPHP) system on decontamination of *Geobacillus stearothermophilus*(GS) spores, *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Enterobacteria* phage felix01 (felix01) were determined.

Methods: The VPHP system was designed to vaporize 35% (w/w) solution of hydrogen peroxide, continuously to inject and withdraw VPHP. The system and VHP 1000ED (Steris) were operated such that dehumidification and conditioning were initiated without samples in the chamber. Then the samples were loaded into and removed. Coupons (glass, anodizing, silicon, viton) with GS spores (1×10^6 colony forming unit/mL [CFU/mL]), *E.coli* (1×10^7 CFU/mL) and felix01 (1×10^7 plaque forming unit/mL [PFU/mL]), and Biological Indicator (BI) with GS spores (1×10^6 CFU/mL) on stainless steel coupons were used. The tested samples were sonicated and vortexed, and then were plated for enumeration, followed by incubation at 55°C, 24 hr for GS spores, and at 37 °C, 24 hr for *E.coli* and felix01. BI analysis in broth culture was only qualitative.

Results: The efficacy of the VPHP system on decontamination was almost equivalent to that of VHP 1000ED. The conditions for complete decontamination with the VPHP system was as follows: concentration; 700~450 ppm, relative humidity; approximately 55%, and temperature; 34~32 °C. When comparing the decontamination efficiency among different kinds of coupons, glass was the most effective, however, all kinds of coupons were decontaminated completely after 60 min exposure in both systems.

Conclusion: The VPHP system can be recommended as an alternative system for traditional system using ethylene oxide, formaldehyde or chlorine dioxide.

Keywords: Biological indicator, coupon, decontamination, dehumidification, vapor-phase hydrogen peroxide system

I. 서 론

과산화수소는 자유 라디칼 및 활성산소를 형성하여 단백질, 지질, 핵산의 산화 및 분해를 초래하게

된다.¹⁾ 이러한 현상은 세포, 바이러스 및 아포의 구조에 손상을 주어²⁾ 오래전부터 세균을 제거하기 위한 매체로 사용되어왔다. 무엇보다도 제거 후 물과 산소로 분해되기 때문에 안전하고 친환경적이다.³⁾ 따

[†]Corresponding author: Samyang Chemical Co., Ltd. 251-3, Seoksu-dong, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, Korea, Tel: 031-470-3818, Fax: 031-473-5300, E-mail: hchwang@samyangchemical.com

Received: 10 April 2013, Revised: 26 April 2013, Accepted: 15 May 2013

라서 IARC(International Agency for Research on Cancer)에 의해 이미 2004년에 발암 유발물질로 알려진 에틸렌 옥사이드, 포름알데히드 같은 제독 매체³⁾를 대체하는 물질로 등장하기 시작했다.^{4,8)} 과산화수소 증기가 플라스틱과 스테인리스스틸 표면을 제독하는 데 효과적이라는 보고⁹⁾에 이어 증기 제독에 관한 활발한 연구가 이루어지고 있다.^{9,10)} 과산화수소 증기 제독의 장점은 빠르고 건조한 상태에서 할 수 있고 낮은 온도에서도 효과적으로 제독이 가능하다.¹¹⁾ 따라서 전자회로기관 또는 광학렌즈 등으로 구성된 정밀 장비나 기계에 손상을 적게 주므로, 넓은 범위에 제독이 가능하다. 과산화수소 증기는 일반적으로 표면 제독에 많이 사용되기 시작했고 현재 크린룸, 동물 사육실, 구급차, 병원 등에서 살균을 위해 사용하고 있다.^{5,7,12)}

현재 외국의 경우 유해한 전통적인 제독매체에서 안전하고 친환경적인 과산화수소 매체로 전환하고 있으며 과산화수소 증기를 이용한 제독 시스템에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.³⁾ 대표적인 장비로는 VHP 1000ED(Steris, Mentor, OH, US)와 Clarus port(Bioquell, Andover, Hants, UK)가 있다. VHP 1000ED의 제독 원리는 제독 공간의 습도를 제어함으로써 제독 대상 표면에 과산화수소 응축이 형성되지 않은 상태에서 제독을 하는 원리이고, Clarus port의 제독 원리는 습도를 제어하지 않고 제독공간에 응축이 일어날 때까지 과산화수소 증기를 주입하는 원리이다.¹³⁾ 두 방식의 차이점인 습도 제어의 필요성에 대한 부분은 여전히 논란의 대상이 되고 있다.¹⁴⁾ 현재까지 우리나라의 경우 제약 및 의료 분야의 실내 멸균 제독제로서 포름알데히드를 혼증하여 사용하고 있거나 의료 장비나 병실의 소독에 이산화 염소를 사용하고 있다. 이는 인체에 유해하며 2차 환경오염을 유발할 수 있는 매체이다.¹⁵⁾ 이를 대체할 수 있는 방안으로 과산화수소가 좋은 대안이 될 수 있으나 과산화수소 증기 시스템을 이용한 제독 연구가 부족한 상황이며 장비 역시 외국에 의존하는 실정이다.

본 연구에서는 과산화수소 증기 제독 시스템을 제작하여 상용 장비인 VHP 1000ED와 성능을 비교하고, 제작된 시스템을 이용하여 제독 매체에 저항성이 가장 강한 GS(ATCC 12980) 아포와 영양세포로 *E.coli*(ATCC27922), 파지로는 felix01을 사용, 이들이 완전 제독되는 조건 즉, 과산화수소의 농도, 온

도, 습도 조건을 확보하고자 하였다. 그리고 논란이 되고 있는 제독 반응 단계에서의 제습의 필요 여부 및 표면의 재질에 따른 제독효율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 실험 방법

본 실험에 사용된 과산화수소 증기 시스템은 제독 대상 공간에 대해 증기의 이동 경로가 닫힌 경로로 구성되어있다. 액체정량펌프(Liquid Pump)는 액상의 과산화수소를 정량 제어하여 기화기(Vaporizer)로 공급한다. 액상의 과산화수소는 노즐을 통해 140 °C로 가열되어 있는 기화기의 열판으로 분무되어 증기로 변환된다. 발생된 증기는 송풍기(Blower)에서 발생된 송풍량에 의해 제독 공간 내로 분사된다. 챔버 내부에는 과산화수소 증기 농도 및 온도, 습도측정을 위한 센서 모듈(Sensor Module)이 배치되고 챔버에서 장비로 연결되는 첫 단계에 제독 전, 후의 독성물질 및 부산물의 오염을 방지하기 위한 여과장치(Filter)를 배치하였다. 촉매기능은 후처리 단계(Aeration)에서만 작동되고 건조기는 제독 조건 상 필요 시 작동시키도록 제작되었다(Fig. 1). VHP 1000ED는 초기 제독 조건과 쿠폰 별 제독 효과를 알아보기 위해 사용되었다.

실험에 사용된 균주는 GS 아포, *E.coli*, felix01이 사용되었다. GS 아포의 경우 1×10^8 CFU/ml 농도로 40% 에탄올에 현탁된 것을 MESA Labs (Colorado, 80228, US)에서 구매하였고 제독 실험 시 1×10^6 CFU/ml를 쿠폰에 도말하여 사용하였다. *E.coli*의 경우 실험 전 50 ml의 LB(Luria-Bertani, Life technology, New York, US)배지에 배양하여 멸균된 증류수에 현탁한 다음 1×10^7 CFU/ml를 쿠폰에 접종하여 사용하였다. Felix01은 박테리오파지 은행(한국외국어대학교 생명공학과)으로부터 구매하여 사용하였다. 실험 전에는 SM완충액(pH7.5, Life technology, New York, US)에 현탁하여 4 °C에 보관하였으며 제독 실험 시 1×10^7 PFU/ml를 쿠폰에 접종하여 사용하였다. 접종하기 위한 쿠폰으로써 18 mm×18 mm의 유리, 애노다이징, 바이톤(Viton, 불소고무[Fluoroelastomer]의 상품명) 그리고 실리콘 쿠폰을 자체 제작하여 사용하였다. 각 쿠폰에 현탁액을 접종하여 5시간 이상 상온에서 건조하였다. 그리고 BI로는 스테인리스스틸 쿠폰에 GS

Fig. 1. Operating diagram of vapor-phase hydrogen peroxide system.

아포(1×10^6 CFU/ml)가 도말된 것을 구입하여 사용하였다.

2. 분석 및 측정

A. 제독실험

제작된 과산화수소 증기 제독 시스템과 VHP 1000ED를 이용하여 35%(w/w) 과산화수소를 기화시켜 과산화수소 증기로 만들어 제독제로 사용하였다. 제독 과정으로는 먼저 제습을 하여 상대습도 8.5%를 유지하기 위한 환경조기화 단계(Conditioning), 증기를 주입하고 제독하는 단계(Injection/Reaction), 제독 후 챔버에 남은 과산화수소를 제거하는 후처리 단계(Aeration)의 3단계로 실시하였다. 챔버의 크기는 1000 mm × 700 mm × 600 mm (0.4 m^3)로 자체 제작하였으며 각 실험의 조건에 따라 챔버 내에 BI, GS 아포, *E. coli*, *felix01* 등이 접종된 쿠폰을 배치하여 실험을 실시하였다. 챔버 내 위치에 따른 제독 실험을 제외한 모든 실험에서는 쿠폰을 챔버의 중앙에 배치하였다.

B. 분석 실험

아포와 영양세포의 경우, 제독 실험 후 멸균된 완충액(PBS+0.1% Triton X-100) 5 ml에 쿠폰을 넣고 10분간 초음파 분쇄를 하고 그 다음 2분간 와동(vortexing)하였다. 완충액의 거품이 제거되면 100 μ l를 따서 LB agar(Difco)plate에 도말하고 55°C 혹은

37°C 배양기에 넣어 하루 동안 배양한 뒤, 배양된 콜로니들을 개수하여 제독 후 살아 남은 아포 혹은 영양 세포의 수를 확인한다. 파지의 경우 제독 실험 후 멸균된 SM 완충용액 5 ml에 쿠폰을 넣고 짧은 시간 와동하였다. 와동 후 1 ml의 완충액을 배양된 대장균 200 μ l와 함께 멸균된 4 ml의 top agar배지에 접종한 후 다시 LB agar plate에 부었다. 도말된 배지를 37°C 배양기에 넣어 하루 동안 배양한 뒤 용균 반점들을 개수하여 살아남은 파지의 수를 확인하였다. BI의 경우 제독 후 10분간 초음파 분쇄를 하고 그 다음 2분간 와동하여 액체배지에 넣어 55°C 배양기에서 하루 동안 배양한 뒤 색의 변화를 확인하였다.

III. 결 과

1. VHP 1000ED를 이용, 완전 제독을 위한 초기 조건의 도출

초기 조건을 조사하기 위하여 BI와 GS 아포가 1×10^6 CFU/ml 도말 되어 있는 유리 쿠폰을 사용하였다. 과산화수소 용액은 35%(w/w)를 사용하였고, 최소 주입량을 찾기 위해 2.0, 1.2 g/min 그리고 VHP 1000ED의 주입 최소량인 1.0 g/min까지 줄여 같은 실험을 3회 반복하여 GS 아포와 BI의 제독에 대한 효율을 분석하였다. 이 때 주입시간은 30분으로 고정하였다. Table 1의 결과에서 제시한 것과 같이 과

Table 1. Effect of injection rate of hydrogen peroxide on decontamination of *Geobacillus stearothermophilus* (GS) spore and Biological indicator(BI)

Injection rate (g/min)	GS spore	BI
1.0	+	+
1.2	+	+
2.0	+	+

+ : completely decontaminated

Table 2. Effect of reaction time of hydrogen peroxide on decontamination of GS spores and BI

Reaction time(min)	GS spores	BI
30	+	+(0/3) [†]
20	+	-(1/3)
10	+	-(1/3)
7	+	-(1/3)
5	-(6.0×10 ²)*	-(2/3)
3	-(1.5×10 ⁴)	-(3/3)

+ : completely decontaminated

- : incompletely decontaminated

* : average numbers of surviving spores (CFU/ml)

† : numbers of coupon(s) not decontaminated per 3 test coupons

산화수소 주입량 1.0 g/min에서부터 2.0 g/min까지 모든 구간에서 완전 제독됨을 확인할 수 있었고, 제독에 필요한 주입량은 완전제독의 효과를 얻으며 과산화수소 증기에 의한 부식의 영향을 최소화 하기 위해 장비에서 설정가능한 최소값인 1.0 g/min으로 설정하였다. 다음은 시간에 따른 제독 효과를 살펴보기 위해 1.0 g/min 과산화수소 주입량에서 GS 아포 및 BI의 제독 여부를 실험하였다. 제독 반응 시간은 3, 5, 7, 10, 20, 30분으로 설정하였다. 그 결과 Table 2에서 제시하듯이 GS 아포는 7분 부터 완전 제독되었으며 BI의 경우 30분 부터 완전 제독되기 시작하였다. 따라서 제독 반응 시간은 GS 아포와 BI 모두 제독되는 30분으로 설정하였다.

2. 제작된 과산화수소 증기 시스템을 이용, BI, GS 아포, *E.coli*, *felix01*의 제독

먼저 제작된 과산화수소 증기 시스템의 과산화수소 주입 성능을 알아보기 위해 주입량 1.0, 2.0, 3.0 g/min에서 180분 동안 지속적으로 주입한 후 무

Fig. 2. Positions of coupons within decontaminatic chamber.**Table 3.** Procedure for decontamination test

Cycle	Air Flow Rate (liter/min)	Time (min)	Injection amount (g/min)
Conditioning	300	30	
Injection/Reaction	300	30	1.0
Aeration	300	60	

Table 4. Efficiency of vapor-phase hydrogen peroxide on decontamination of BI, GS spores, *E.coli* and *felix01*

Positions Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BI (1×10 ⁶ CFU/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GS spores (1×10 ⁶ CFU/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i> (1×10 ⁷ CFU/ml)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
<i>felix01</i> (1×10 ⁷ PFU/ml)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+

NA : not applicable

게를 측정하였다. 그 결과 각각의 주입량에서 1.37~1.66%의 오차 범위를 나타내어 시간에 따른 정량 공급에 문제가 없음을 알 수 있었다(자료 미제시). 과산화수소가 정량 공급이 되어도 챔버 내 위치에 따라 농도가 다를 것으로 판단되어 BI와 GS는 Fig. 2와 같이 챔버 내의 9곳에, *E.coli*, *felix01*는 챔버 내의 9번에만 배치하였다. 그리고 지금까지의 결과를 토대로 Table 3와 같은 제독 절차를 설정하였다. 그 결과 Table 4와 Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 쿠폰이 배치된 모든 구간에서 제독되었음을 알 수 있었다.

Fig. 3. Efficacy of vapor-phase hydrogen peroxide on decontamination of BI, *GS* spores, *E.coli*, felix01: (a); Color change of BI culture media (upon growing, color is changed yellow into red), (b); *GS* spores culture, (c); *E. coli* culture, (d); felix01 culture : Right panel; control, Left panel; tested.

Fig. 4. Changes of conditions within the chamber during the decontamination: (a); concentration of vapor-phase hydrogen peroxide, (b); relative humidity, (c); temperature.

Fig. 5. Distribution of concentration of vapor-phase hydrogen peroxide by positions within decontamination chamber: (a); position 0 to 7, (b); concentration of vapor-phase hydrogen peroxide at 0 to 7 positions.

3. 제작된 과산화수소 증기 시스템을 이용, 완전 제독조건에서 챔버 내 과산화수소 농도, 습도 그리고 온도의 변화

완전 제독이 이루어진 Table 3의 제독 조건에서 챔버와 연결된 과산화수소 농도, 온도, 습도 센서를 사용하여 제독 반응이 이루어진 30분 동안 각 요소의 변화를 조사하였다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 과산화수소 농도는 주입 직후 700 ppm이었다가 점차적으로 줄어들어 제독 반응 마지막에 약 450 ppm을 나타내었다. 상대 습도는 주입 직후 서서히 증가하기 시작하여 반응 마지막 시점에 55% 정도로 측정되었다. 온도는 과산화수소 주입 전에 서서히 올라가다가 과산화수소 증기가 주입되면서 약간 떨어지기 시작하여 반응시간 마지막쯤에 32 °C 정도를 나타내었다. 그 결과 완전 제독 되는 조건에서 챔버 내의 환경은 과산화수소의 농도 700~450 ppm, 상대 습도 약 55%, 온도 32~34 °C를 나타낼 수 있었다. 이는 제독 공간의 크기와 환경이 달라도 완전 제독이 되기 위해서는 상기 얻어진 조건이 필요한 것으로 사료된다.

4. 챔버 내 위치와 시간에 따른 과산화 수소증기의 농도 변화

챔버 내의 위치와 시간에 따른 농도 변화를 조사하고자 Fig. 5(a)와 같이 챔버 내 위치에 과산화수소 농도계를 부착하였다. 위치 0은 챔버 내의 중앙이고 위치 1에서 7번은 챔버의 뒷면에 배치하였다. 과산화수소의 주입은 1, 3, 6번이 위치한 쪽에서 주입하

였다. 조건은 완전 제독이 이루어지는 Table 4에 따라 실시하였다. 그 결과 주입 구의 맞은 편 상단 2번이 900~600 ppm으로 가장 높게 나타났고, 주입구의 하단인 6번이 400~200 ppm으로 가장 낮게 나타났다. 중앙과 주입 구 쪽 상단은 Fig. 5(b)에서와 같이 상대적으로 중간 정도의 농도를 나타내었다. 이는 위치 마다 농도가 다를 수 있고 최저 농도인 200 ppm 정도에서도 완전제독이 일어났음을 의미한다. 반응 시간 이 지남에 따라 과산화수소 농도의 감소는 응축이 일어났음을 의미하고, 과산화수소의 공급을 끊고 공기를 주입하는 후처리 단계(Fig. 5(b)의 그래프 상에서 1시간 시점)농도가 증가하는 현상 역시 표면에 응축되었던 과산화수소가 다시 기화한 결과로 사료된다.

5. 재질에 따른 제독 효과

표면 재질에 따라 아포의 부착 정도가 다르기 때문에 재질에 따른 제독의 효과가 다를 수 있다. Sagripanti 등¹⁶⁾은 hypochlorite 제독 실험에서 고무와 금속 쿠폰을 사용하여 제독을 실시한 바 있다. 본 실험에서도 실험실 및 의료 장비를 주로 구성하는 유리와 애노다이징, 실리콘, 바이톤 4종의 서로 다른 재질을 사용하여 제독 실험을 실시하였다. Fig. 6의 결과에서 보듯이 제작된 과산화수소 증기 시스템과 VHP 1000ED에서 모두 1×10^6 CFU/ml의 아포가 유리 재질에서는 30분에 나머지는 60분에 완전 제독됨을 알 수 있었다. 두 시스템에서 30분에 약간의 차이가 있었지만 거의 동등한 제독 효율을

Fig. 6. Efficacy of vapor-phase hydrogen peroxide (1g/min) on decontamination of coupons (glass, anodizing, silicon, viton) contaminated with *GS* spores (1×10^6 CFU/ml): (a); Vapor-phase hydrogen peroxide system, (b); VHP 1000ED.

보였다. 그러나 쿠폰 별 차이는 유리 재질이 가장 제독이 잘되었으며 애노다이징, 실리콘 그리고 바이톤은 상대적으로 낮은 제독 효율을 나타내었다.

IV. 고 찰

1. VHP 1000ED를 이용한 최적 제독 조건의 도출 및 과산화수소 증기 시스템에의 적용

아포의 제독 조건을 파악하기 위해 제독에 대한 저항성이 가장 강하다고 알려진 *GS* 아포^{12,17}를 유리 쿠폰에 직접 도말한 것과 이미 스테인리스 스틸에 쿠폰화되어 시판되고 있는 BI를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 제독 챔버(0.4 m³)에 VHP 1000ED를 연결하여 최적 주입량과 최적 반응 시간을 결정하였다. 1×10^6 CFU/ml의 아포가 완전 제독이 되는

조건은 Table 1, Table 2의 결과에서 보듯이 최소주입량인 1.0 g/min, 제독 반응 시간은 30분으로 도출하였다. 과산화수소의 최소 주입량을 최적값으로 도출한 이유는 완전제독이 되면서도 가장 낮은 농도를 형성하므로 제독 환경의 다른 재료에 대한 부식성을 최소화 할 수 있기 때문이다. 제독반응시간은 직접 제조한 *GS* spore와 BI 모두 제독되는 조건인 30분으로 선정하였는데, 사용된 두 시료의 제독결과가 다른 이유는 시료 제조조건 및 쿠폰 재질의 차이에 의한 것으로 사료된다.¹⁸⁾ 상기 VHP 1000ED로부터 얻어진 조건(주입량 1.0 g/min, 제독시간 30분)을 제작된 과산화수소 증기 시스템에 적용한 결과 Table 4와 Fig. 3에서 보듯이, BI와 *GS*가 제독 챔버 내의 모든 위치에서 제독됨을 확인하였다. 가장 제독이 잘 되지 않은 *GS* 아포¹⁹⁾가 모든 위치에서 제독되었기 때문에 보다 쉽게 제독이 되는 *E.coli*와 *felix01*은 9번의 위치에만 적용하였다. 그리고 적용된 위치에서 완전 제독됨을 확인하였다. 이는 또한 제작된 과산화수소 증기 시스템의 제독 성능이 VHP 1000ED의 제독 성능과 거의 동등함을 알 수 있는 결과이다. 한편 본 연구에서 도출된 제독조건은 제작된 챔버에서 도출된 조건이므로 다양한 크기의 공간에 대한 제독실험 및 경제적인 관점에서의 최소 주입량을 확인하는 실험이 계속되어야 할 것으로 사료된다. 특히 과산화수소수를 1 g/min 보다 더 적은 양으로 제어할 경우에는 기포에 의해 오차가 커지므로, 이를 위한 정밀한 제어기술이 뒷받침되어야 한다.

2. 완전 제독 조건에서 과산화수소 증기 시스템 챔버 내의 과산화수소 농도, 습도 그리고 온도의 변화 및 챔버 내 위치와 시간에 따른 농도 변화

제독의 필수요소인 챔버 내 과산화수소의 농도와 상대습도 및 온도에 대한 최적 조건은 문헌마다 다르게 나타난다. 본 연구에서는 초기 상대 습도 8.5% 정도에서 과산화수소를 주입하였으며 제독 반응 동안은 습도를 제어하지 않았다. 결과 Fig. 4(a)에서 보듯이 과산화수소 농도는 주입초기 700 ppm에서 점차 줄어들어 반응 마지막 시점에 450 ppm에 달하였다. 이는 500 ppm을 사용했을 때 30분만에 *GS* 아포가 제독 되었다는 Edgewood Chemical Biological Center(ECBC) 보고와 거의 일치한 결과임을 알 수 있다.²⁰⁾ 제독 반응 중 상대습도는 Fig. 4(b)에서 보

듯이 주입초기 점차 증가하여 반응 마지막 시점에 약 55%를 유지하였다. 제독의 효율에 미치는 습도의 영향에 대해서는 서로 다른 주장들이 보고되고 있다. 제습을 한 경우는 상대적으로 많은 수의 과산화수소 증기 분자가 접촉을 하는 형태로 제독이 되므로 습도를 40% 이하로 제어하여 과산화수소 농도를 높여야 된다는 Krishnan등의 보고²¹⁾와 제습을 하지 않는 경우는 과산화수소의 응축에 의한 접촉으로 제독이 일어나기 때문에 습도의 제어가 필수적이지는 않다는 Watling등¹⁴⁾의 보고가 있다. 습도를 제어하지 않아도 완전 제독되는 본 연구의 결과는 Watling 등의 결과를 뒷받침한다. 이와 같은 결과는 챔버 내 위치에 따른 과산화수소 증기의 확산 경향을 확인하는 실험에서도 나타난다. Fig. 5(a)와 같이 다양한 위치에서 완전 제독되는 동일 조건으로 과산화수소 증기 농도를 측정하였다. 그 결과 위치에 따라 다른 농도를 나타냄을 알 수 있었고 주입 구의 하단이 400~200 ppm으로 최저치를 나타냈다. 또한 Fig. 5(b)에서와 같이 시간이 지남에 따라 농도가 감소하고 후처리 단계에서는 농도가 급격하게 상승함을 확인할 수 있었다. 전자의 현상은 Fig. 4(b)에서 같이 반응 중 상대습도의 증가가 표면에 과산화수소 응축을 일으킨 것이며 후처리 단계에서 농도가 증가한다는 것 역시 응축된 과산화수소가 증발되면서 나타나는 현상으로 보여진다. 따라서 Fig. 4(b)와 Fig. 5(b)의 결과는 최저 농도(200 ppm)에서도 완전 제독되었으며 상대습도의 증가(55%)로 낮은 농도에서도 응축이 일어났음을 나타낸다. 한편 제독 반응 중 10~20%로 습도를 제어하면서 과산화수소 농도를 500 ppm으로 유지한 ECBC의 결과와 다르다. 이 서로 다른 결과는 고농도, 낮은 습도의 환경이나 저농도, 높은 습도의 환경에서 동등한 제독 효율이 가능함을 의미한다.¹⁴⁾ 특히 과산화수소 사용량 면에서, 챔버내 고농도의 과산화수소 증기를 형성하는 것 보다는 미생물 표면에 응축을 형성시키는 것이 더 효율적임을 알 수 있다. 이것은 과산화수소 증기 주입 중 응축이 형성되면 제독이 시작되기 때문에, 특정 농도 도달을 위해 과산화수소를 더 주입할 필요가 없음을 의미한다. 한편, 제독 대상 공간 내 모든 영역에서 응축효과를 얻기 위해서는 증기의 이동 중 응축이 발생되지 않아야 하므로, 환경초기화 단계에서의 온도 조절 및 제습은 반드시 필요하다. 또한, Fig. 4C

에서 보듯이 30 °C정도의 온도에서 완전 제독이 되는 점은 ECBC의 결과²⁰⁾와 일치하며 제독의 중요한 요인이라고 사료된다.

3. 재질에 따른 제독 효과

쿠폰 재질에 따른 제독효율을 조사하기 위해 먼저 GS 아포의 회수 실험을 실시한 바 4종의 쿠폰에 1×10^6 CFU/ml을 접종하여 모두 약 6×10^5 CFU/ml 정도를 회수함으로써, 회수에 의한 오차 부분은 제거할 수 있음을 확인하였다(자료 미 제시). 얻어진 최적 조건에서 쿠폰 별 제독을 한 결과 Fig. 6에서 보듯이 제작된 과산화수소 시스템과 VHP 1000ED 모두에서 유리쿠폰의 재질은 30분에서 완전 제독되었고, 애노다이징, 실리콘, 바이톤의 경우는 60분에 모두 제독됨을 알 수 있었다. 이는 재질에 따른 제독 효율이 다르다는 ECBC의 보고²⁰⁾와 일치하는 것이다. 제독의 표면 재질에 따른 차이는 다공성의 표면을 가진 재질과 비다공성의 표면을 가진 재질에서 서로 다른 제독의 효과를 나타낸다는 Roger등¹⁸⁾의 보고와 일치한다. 따라서 표면 재질에 따른 제독조건이 역시 고려 되어야 할 것이다.

V. 결 론

제작된 과산화수소 증기 시스템을 이용 BI, GS 아포, *E.coli*, 박테리오파지 felix01 등의 완전 제독 조건을 도출하고자 하였다. 초기 제독 조건을 조사하기 위한 제독 대상은 BI, GS 아포가 1×10^6 CFU/ml로 도포된 유리쿠폰을 사용하였고 쿠폰 별 제독 효율을 알아보기 위해서는 유리, 애노다이징, 실리콘, 바이톤 쿠폰을 사용하였다.

1) 본 연구를 위해 제작된 과산화수소 증기 시스템에 적용할 초기 조건을 알기 위해 Steris사의 VHP 1000ED를 사용하였다. 제작된 챔버의 크기(0.4 m^3) 내에서 완전 제독을 위한 초기 조건으로 과산화수소 주입량 1.0 g/min, 주입시간 30분으로 설정하였다.

2) VHP 1000ED에서 도출된 완전 제독되는 초기 조건 1)을 제작된 과산화수소 시스템에 적용한 결과, 챔버 내 9곳에서 모두 완전 제독되었다. 이는 제작된 과산화수소 증기 시스템의 제독 성능이 VHP 1000ED의 제독 성능과 동등함을 의미한다. 그리고 동일 조건에서 농도는 700~450 ppm이었고, 온도는

34~32 °C 그리고 상대 습도는 주입 초기부터 증가하여 반응의 마지막 시점에 약 55%에 달했다. 위치에 따른 과산화수소 농도의 변화는 주입 구의 맞은편 상단이 최고치(900~600 ppm)를, 최저치는 주입 구의 하단이 400~200 ppm으로 다름을 확인하였다. 이는 농도 200 ppm, 습도 55%에서도 완전 제독이 일어났음을 의미하며, 제독 반응 중 10~20%로 습도를 제어하면서 과산화수소 농도를 500 ppm으로 유지한 ECBC의 결과와 다르다. 이 결과는 상대습도의 증가가 응축을 유도함으로써 과산화수소 증기의 낮은 농도에서도 제독이 이루어진 것으로 사료된다.

3) 쿠폰 별 제독 효율은 제작된 과산화수소 시스템과 VHP 1000ED에서 유리쿠폰이 30분으로 가장 빨랐고, 애노다이징과 실리콘, 바이톤이 60분만에 제거되었다. 쿠폰에 따른 제독 효율의 차이는 표면 재질의 다공성과 같은 물리적 특성의 차이에서 오는 것으로 사료된다.

4) 이상의 결과는 병원이나 실험실 같은 실내공간을 과산화수소 증기를 이용하여 친환경적으로 제독하는데 유용한 정보를 제공할 것이다.

감사의 글

본 연구는 방위사업청과 국방과학연구소 건식제독 기술사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다(UC1000046ID).

참고문헌

- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12(1): 147-179.
- Melly E, Cowan AE, Setlow P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *Journal of applied microbiology*. 2002; 93(2): 316-325.
- Grare M, Dailloux M, Simon L, Dimajo P, Laurain C. Efficacy of dry mist of hydrogen peroxide (DMHP) against *Mycobacterium tuberculosis* and use of DMHP for routine decontamination of biosafety level 3 laboratories. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(9): 2955-2958.
- Fichet G, Comoy E, Duval C, et al. Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet*. 2004; 364(9433): 521-526.
- French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NM, Watling D, Parks MJ. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *The Journal of hospital infection*. 2004; 57(1): 31-37.
- Heckert RA, Best M, Jordan LT, Dulac GC, Eddington DL, Sterritt WG. Efficacy of vaporized hydrogen peroxide against exotic animal viruses. *Applied and environmental microbiology*. 1997; 63(10): 3916-3918.
- Johnston MD, Lawson S, Otter JA. Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores. *Journal of microbiological methods*. 2005; 60(3): 403-411.
- Quilez J, Sanchez-Acedo C, Avendano C, del Cacho E, Lopez-Bernad F. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology*. 2005; 71(5): 2479-2483.
- Klapes NA, Vesley D. Vapor-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant. *Applied and environmental microbiology*. 1990; 56(2): 503-506.
- Otter JA, French GL. Survival of nosocomial bacteria and spores on surfaces and inactivation by hydrogen peroxide vapor. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(1): 205-207.
- Pottage T, Macken S, Giri K, Walker JT, Bennett AM. Low-temperature decontamination with hydrogen peroxide or chlorine dioxide for space applications. *Applied and environmental microbiology*. 2012; 78(12): 4169-4174.
- Krause J, McDonnell G, Riedesel H. Biodecontamination of animal rooms and heat-sensitive equipment with vaporized hydrogen peroxide. *Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science*. 2001; 40(6): 18-21.
- Pottage T, Richardson C, Parks S, Walker JT, Bennett AM. Evaluation of hydrogen peroxide gaseous disinfection systems to decontaminate viruses. *The Journal of hospital infection*. 2010; 74(1): 55-61.
- Watling D, Ryle C, Parks M, Christopher M. Theoretical analysis of the condensation of hydrogen peroxide gas and water vapour as used in surface decontamination. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA*. 2002; 56(6): 291-299.

15. Hose JE, Di Fiore D, Parker HS, Sciarrotta T. Toxicity of chlorine dioxide to early life stages of marine organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1989; 42(3): 315-319.
16. Sagripanti JL, Carrera M, Insalaco J, Ziemski M, Rogers J, Zandomeni R. Virulent spores of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species deposited on solid surfaces have similar sensitivity to chemical decontaminants. *Journal of applied microbiology*. 2007; 102(1): 11-21.
17. Otter JA, Yezli S. Are commercially available *Geobacillus stearothermophilus* biological indicators an appropriate standard for hydrogen peroxide vapour systems in hospitals? *The Journal of hospital infection*. 2012; 80(3): 272-273.
18. Rogers JV, Sabourin CL, Choi YW, et al. Decontamination assessment of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator. *Journal of applied microbiology*. 2005; 99(4): 739-748.
19. Greenberg DL, Busch JD, Keim P, Wagner DM. Identifying experimental surrogates for *Bacillus anthracis* spores: a review. *Investigative genetics*. 2010; 1(1): 4.
20. Lalain TA, Brickhouse MD, Dfarr JW. Biological Warfare Agent Decontamination Efficacy Testing: Large-Scale Chamber mVHP Decontamination System Evaluation For Biological Contamination. *EDGEWOOD Chemical Biological Center Press*. 2007; 1-42.
21. Krishnan J, Berry J, Fey G, Wagener S. Vaporized Hydrogen Peroxide-based Biodecontamination of a High-Containment Laboratory under Negative Pressure. *Applied Biosafety*. 2006; 11(2): 74-80.