

細菌性 Virus f2에 對한 Ozone의 不活性作用

金 致 卿

(忠北大 自然大 生物學科)

Action of Ozone on Bacterial Virus f2

Kim, Chi-Kyung

(Department of Biology, College of Natural Sciences
Chung-buk National University)

ABSTRACT

Bacterial virus f2 and its RNA were examined to elucidate the mode of ozone utilizing sucrose density gradient analysis and electron microscopic techniques. The inactivation kinetics of the virus f2 by ozonation showed that the viruses were rapidly inactivated during the first 5 sec of the reaction and were further inactivated at a slower rate during the next 10 min at 0.09 and 0.8mg/l ozone concentrations. The virus coat was broken by ozonation into many pieces of protein subunits and the adsorption of the viruses to the host pili was inversely related to the extent of the breakage of the virus. The viral RNA was released from the virus particles during ozonation, retaining reduced infectivity to the spheroplasts. The RNA was resistant to ozone, but ozone inactivation of the RNA enclosed in the protein coat could not ruled out the possibility that the RNA was secondarily sheared by a reaction with the broken coat protein.

緒 論

社會의 發展과 人口의 增加에 따라 必須的으로 隨伴되는 問題는 自然의 汚染現象이며 特別히 都市에서의 下水汚染問題는 人體의 腸內寄生 病原菌이 下水에 流入될때 水因性 傳染病의 傳播 및 發病의 可能性은 國民의 保健問題와 直接 關係된다. 그러므로 上水의 殺菌消毒은 물론 都市 下水의 最終處理場에서의 살균소독은 지극히 중요한 과정이다.

이러한 目的으로 上水 및 下水의 殺菌消毒은

鹽素處理法에 거의 依存하여 왔으나 多量의 有機物質이 함유되어 있는 下水에 있어서는 有機물이 鹽素를 소모하여 殺菌의 効率性을 저하시켜 抵抗性이 강한 virus에 대해서는 殺菌目的으로 使用되는 鹽素처리의 意味를 감소시킨다. 特別히 이러한 下水에 多量의 鹽素를 처리할 境遇 有機物質은 鹽素와 化合하여 보다 더 難解性物質인 鹽化有機化合物을 生成하여 더욱 심각한 汚染問題를 제기하는 동시에 이 鹽化有機化合物은 水中生物에 有害할 뿐더러 人體에 대하여 發癌性 特性을 갖고 있다는 報告가 점차 增加하고 있다(Dugan, 1978).

최근에는 上下水 處理過程에서 殺菌劑로 사용되는 鹽素의 代替方法이 여러모로 검토되어오고 있는데 그 중 오존은 強力한 酸化劑로서 신속한 殺菌력과 鹽素處理에서 생기는 냄새나 毒性있는 副產物이 생성되지 않으므로 많은 脚光을 받고 있다(Berg, 1970). Virus를 포함하는 여러가지 微生物에 대한 오존의 殺菌실험은 世界的으로 活發히 進行되고 있으며 (Kim 등, 1980; Nebel 등, 1975; Sommerville 등 1972), 低濃도와 짧은 反應時間으로도 amoebic cyst나 virus와 같은 抵抗性이 강한 微生物에 대한 殺菌效果가 鹽素나 다른 化學殺菌劑보다 優秀함이 證明되고 있다(Katzenelson 등, 1974; Venosa, 1972).

그러나 박테리아 뿐만 아니라 virus에 대한 오존 殺菌의 機作에 관해서는 現在 研究가 部分的으로 進行되고 있을 뿐이다. Pavoni 등 (1972)은 下水처리과정중 secondary effluent를 오존으로 處理했을 때 박테리아 및 f2 phage가 破壞되는 것은 酸化作用에 의한 것이라고 報告했으며 Riesser 등 (1976)은 poliovirus type 2가 오존 處理에 의하여 破壞되는 것을 觀察하고 寄主細胞에 侵入하는 過程이 抑制된다고 推定하였다. DeMik과 DeGroot (1977)는 오존이 含有된 空氣에 bacteriophage $\phi \times 174$ 를 露出시킴으로서 蛋白質로 된 virus coat가 破壞되는 것을 發見하였으며 이 過程中 特히 DNA가 破壞된다고 報告하였다. Christensen과 Giese (1954)는 核酸에 대한 오존의 影響은 purine이나 pyrimidine에 共히 作用하기 때문이라고 했다. Prat 등 (1968)과 Scott (1975)는 *E. coli* DNA를 사용한 實驗에서 pyrimidine base가 오존에 의하여 變化됨을 發見했는데 base 중 cytosine이나 uracil보다 thymine이 더욱 예민하게 反應한다는 것을 報告했었다. 그러나 virus가 오존에 의하여 어떻게 殺菌되는지에 대한 完全한 機作은 아직 모르고 있으며 特히 virus RNA나 coat protein에 대한 作用은 밝혀져 있지 않다.

RNA를 內包하고 있는 bacterial virus f2는 物理化學의 性質이 enteric virus와 매우 恰似한 特徵때문에 Hsu 등 (1966)에 의하여 처음으로 enteric virus의 殺菌研究의 model로 導入된 이래 많은 研究者들(Cramer 등, 1976; Kim

等, 1980; Olivieri 등, 1975; Pavoni 등, 1972; Shah and McCamish, 1972)에 의하여 利用되어 왔다. Hsu 등 (1966)은 poliovirus나 f2 virus의 RNA는 iodine 處理에 대하여 抵抗性이 높고 iodine ion의 농도가 增加됨에 따라 殺菌效果는 더욱 阻止된다는 것을 發見했다. Olivieri 등 (1975)은 chlorine, bromine 그리고 iodine이 virus f2를 어떻게 殺菌하는지를 實驗한 結果, 元素의 種類에 따라 作用方法이 서로 다르다는 것을 發見하였다.

오존의 殺菌機作을 研究하는데 bacterial virus f2는 single-strand로 된 RNA and 아미노산의 構성이 밝혀져 있는 두개의 structural protein만으로 構成되어있고 (Weber and Konigsberg, 1975) 또 鹽素등의 殺菌劑에 의한 殺菌效果가 enteric virus와 매우 類似하기 때문에 (Cramer 등, 1976) 本實驗의 材料로 選定하여 오존에 의한 virus의 殺菌機作을 究明했던 것이다.

材料 및 方法

1. Virus의 試料과 滴定

Bacterial virus f2 (ATCC # 15766-B)는 *Escherichia coli* K-13 Hfr (ATCC # 15766)를 寄主로 使用하여 Tryptone Yeast Extract (TYE) broth medium에서 增殖시켜 Loeb와 Zinder (1961)의 ammonium sulfate 方法에 따라 分離했다. 이 lysate는 cesium chloride와 0.65g/l로 混合하여 Beckman L2-65B 超遠心分離機에서 125,000×g로 48시간 회전시켜 遠心分離管의 中間部位에 形成된 virus band를 採取하여 8.0g/l NaCl을 包含하는 pH7.0의 0.01M 磷酸緩衝液을 使用하여 4°C에서 24時間동안 透析하였다. 이 virus 試料은 다시 三次 증류한 滅菌蒸溜水를 使用하여 5.0×10^{12} PFU (Plaque Forming Unit)/ml로 희석한 후 使用할 때까지 -70°C에 貯藏하였다. Virus 試料은 *E. coli* K-13을 寄主로 使用하여 Adams (1959)의 overlay method에 의하여 滴定하였다.

2. Virus RNA의 Tritium 附屬

Virus f2의 RNA는 Oeschger와 Nathans

(1966)의 방법에 따라 [^3H]-uridine 을附着하였다. Uridine, thymine 그리고 arginine, lysine, histidine 등의 아미노酸을 要求하는 變異菌株인 *E. coli* C-3000-38을 1l의 tris pyruvate glucose (TPG) medium에 接種시켜 37°C에서 空氣를 供給하면서 24시간 培養한 후 3mCi의 [^3H]-uridine 을 添加補正하여 다시 30분간 培養하고 10 MOI (multiplicity of infection)의 比率로 bacterial virus f2를 接種시킨 후 다시 24시간 동안 培養하였다. Virus RNA에 [^3H]-uridine 으로 附着한 f2 virus는 Yamamoto와 Alberts (1970)의 방법에 따라 polyethylene glycol 6000을 使用하여 分離한 후 위에서 記述한 方法에 따라 再分離 透析하여 使用할 때까지 -70°C에 貯藏하였다.

3. Virus f2의 Infectious RNA 實驗

Bacterial virus f2의 infectious RNA는 Hofschneider와 Delius (1968)의 phenol 法에 따라 2ml의 virus sample에서 推出하여 4°C의 滅菌蒸溜水를 使用하여 다시 2ml로 희석하여 實驗하였다. 오존으로 處理할 RNA는 오존 要求量이 높은 phenol을 完全히 除去하기 위하여 2ml의 ethyl ether로 6번 處理한 후 窒素가스를 通過시킴으로서 殘留하는 ethyl ether를 完全히 除去했다. RNA의 infectivity는 Hofschneider와 Delius (1968)의 方法에 따라 使用直前に 準備한 *E. coli* K-13의 spheroplast를 寄主로 滴定했다.

4. Virus와 RNA의 오존處理

오존處理裝置는 Linde model SG-4050 ozone generator를 利用한 Kim等 (1980)의 裝置를 使用했다. 오존은 0.01M NaCl이 包含된 pH7.0의 1mM 磷酸緩衝液에 溶存시켰다. 오존濃度는 Shechter (1973)의 spectrophotometer 法에 따라 測定했으며 모든 유리기구는 2mg/l 以上の 오존溶液에 1時間 以上 담근 후 증류수로 세척하여 오존要求量을 없었다. 試驗 virus와 RNA 試料는 1對 100의 比率로 25±1°C의 오존溶液에 一定시간 處理한 후 0.206g/l의 sodium thiosulfate 溶液을 使用하여 1對 10의 容量比로 殘留오존을 中和시켰다.

5. Sucrose Density Gradient의 分析

Sucrose gradient는 0.01M 磷酸緩衝液에 溶解한 5~17% 또는 5~2%의 sucrose로 만들었다. 1ml의 virus 또는 RNA 試料를 11ml의 sucrose gradient의 上層에 넣고 4°C에서 110,000×g 또는 149,000×g로 4 또는 8시간 遠心分離한 후 ISCO fractionator model 180을 利用하여 上層으로부터 15 또는 25 방울씩 收集하였다. 각 fraction의 refractive index, virus의 infectivity, 그리고 [^3H] radioactivity를 測定했다. virus의 infectivity는 0.01M 인산완충액으로 24시간 透析한 후 滴定했으며 radioactivity는 10ml의 Biofluor cocktail (New England Nuclear)에 1ml의 fraction을 混合하여 Packard Tri-carb model 3375 liquid scintillation spectrometer를 使用하여 5분간 測定하였다.

Table 1. Ozone inactivation kinetics of bacterial virus f2 at 0.09 and 0.8mg/l ozone concentration

| Reaction time (sec) | 0.09mg/l ozone treatment | | 0.8mg/l ozone treatment | |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Ozone residual (mg/l) | Virus survival (PFU/ml) | Ozone residual (mg/l) | Virus survival (PFU/ml) |
| 0 | 0.090 | 5.3×10^9 | 0.80 | 5.3×10^9 |
| 5 | | 8.7×10^4 | | 2.6×10^3 |
| 10 | 0.086 | 6.2×10^4 | 0.75 | 6.8×10^2 |
| 30 | 0.085 | 3.3×10^3 | 0.68 | 5.2×10^2 |
| 60 | 0.083 | 5.6×10^3 | 0.64 | 2.0×10^0 |
| 120 | 0.080 | 5.0×10^3 | 0.53 | 1.0×10^0 |
| 600 | 0.065 | 4.6×10^1 | 0.03 | 0 |

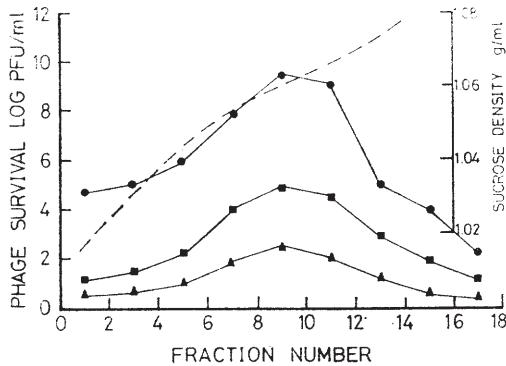


Fig. 1. Virus survival of untreated control virus f2 (●) and samples which were treated with 0.09mg/l ozone for 5 sec (■) and with 0.8mg/l ozone for 30 sec (▲). The viruses were centrifuged at 110,000×g for 4 hrs. in three separated 5~20% sucrose gradients. Each fraction of 25 drops was collected and dialysed. All three samples showed their PFU peaks in fraction number 9.

6. Virus의 電子顯微鏡 檢査

오존처리된 하지않은 control 및 處理한 virus를 寄主細菌인 *E. coli* K-13과 混合하여 室溫에서 10분간 放置한 후 formvar와 carbon으로 coat한 grid에서 2%의 uranyl acetate로 negative staining한 후 Phillips EM-300 電子顯微鏡으로 80kV의 電壓을 使用하여 觀察하였다.

結 果

Bacterial virus f2의 오존에 의한 殺菌効果는 Table 1.과 같다. 0.99와 0.8mg/l의 오존溶液에서 處理된 virus는 모두 反應 5秒 동안에 急速한 殺菌現象을 나타냈으며 그후 10分間에는 緩慢한 殺菌效果를 보여 주었다.

오존處理를 하지않은 virus 그리고 0.09mg/l의 오존溶液에서 5秒 동안 처리한(弱處理) virus와 0.8mg/l의 오존에서 30秒 동안 처리한(強處理) virus의 세가지 試料를 5~20% sucrose gradient에서 各各 遠心分離한 후 25방울씩 收集한 fraction에 生存하고 있는 virus는 Fig. 1

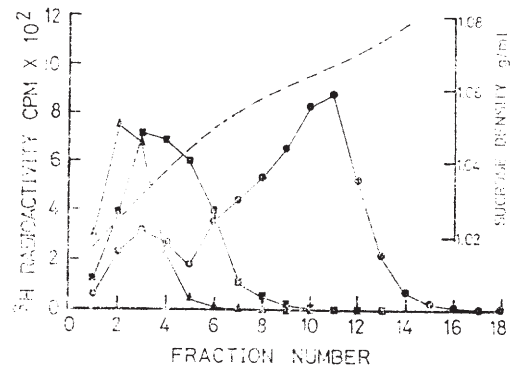


Fig. 2. Tritium radioactivity of untreated control virus f2 (●) and samples which were treated with 0.09mg/l ozone for 5 sec (■) and with 0.8mg/l ozone for 30 sec (▲). The viruses were centrifuged at 110,000×g for 4 hrs. in three separated 5~20% sucrose gradients. Each fraction of 25 drops was collected and analyzed for the radioactivity of the virus RNA. The radioactivity peaks were moved up to the fractions of number 2 by ozonation. Note a minor peak of the control virus sample in fraction number 3.

에 表示되어 있다. 세가지 virus 試料의 PFU 曲線은 모두 9番 fraction에서 그 頂點을 나타냈으며 PFU의 數는 높은 濃度의 오존에서 오래 處理한 試料일수록 더 많이 減少하였다.

위의 세가지 virus 試料를 5~20% sucrose gradient에서 遠心分離한 후 각 fraction의 [³H] radioactivity를 調査한 結果는 Fig. 2와 같다. 오존處理를 하지 않은 virus의 radioactivity는 11番 fraction에서 가장 높았으나 오존處理를 한 virus에서는 모두 2番과 3番의 fraction에서 radioactivity가 가장 높았다. 이는 virus가 오존處理를 받으므로써 RNA가 溶液 속으로 流出되어 나왔음을 意味한다.

오존處理를 하지않은 virus로부터 먼저 RNA를 推出한 후 그 RNA (naked RNA)를 위의 virus에서 처한 0.09와 0.8mg/l의 오존溶液으로 處理하여 sucrose gradient에서 遠心分離하여 각 fraction의 [³H] radioactivity를 分析한 結果는 Fig. 3과 같다. 오존處理를 하지 않은 naked RNA와 오존處理를 한 naked RNA 試

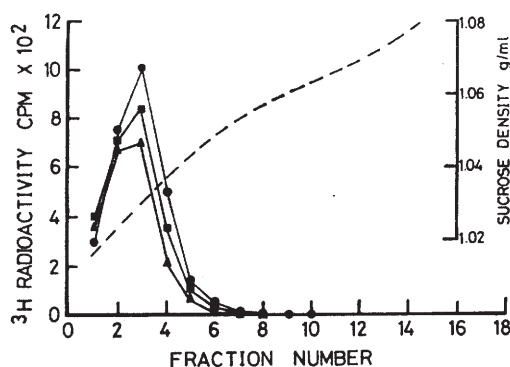


Fig. 3. Tritium radioactivity of untreated naked RNA (●) and samples which were treated with 0.09mg/l ozone for 5 sec (■) and with 0.8mg/l ozone for 30 sec (▲). The naked RNAs were centrifuged at 110,000×g for 4 hrs. in three separated 5~20% sucrose gradients. Each fraction of 25 drops was collected and analyzed for the radioactivity of the RNA. The radioactivities of all naked RNAs showed their peaks in fraction number 3.

料은 모두 똑 같이 3番 fraction에서 radioactivity의 頂點이 나타났다. 이는 Fig. 2의 결과와 比較할때 virus RNA는 오존處理에 의하여 溶液속으로 流出되어 나왔음을 나타내는 同時に naked RNA는 오존에 대하여 抵抗性を 갖고 있음을 意味한다.

오존處理에 의한 virus RNA의 流出을 證明하고 오존處理한 virus의 殺菌效果和 寄主細菌에 대한 吸着性과의 相關性を 究明하기 위하여

위의 세가지 virus 試料과 寄主細菌을 混合한 溶液을 電子顯微鏡으로 檢察한 結果는 Fig. 4에 나타나 있다. 오존處理를 하지 않은 溫全한 icosahedral 形態의 virus 들은 大部分 寄主細菌의 pili에 吸着되어 있으며 (Fig. 4A), 弱處理한 virus에서는 (Fig. 4B) 破壞된 virus 粒子들도 보였지만 溫全한 構造의 virus 들은 pili에 吸着되어 있었다. 그러나 強處理된 virus 試料에서는 약간의 溫全한 virus 以外の 大部分의 virus는 一定한 크기의 單位體로 破壞되어 散在하고 있다 (Fig. 4C).

오존處理에 의한 virus f2와 naked RNA의 生存比와 오존處理한 virus에서 推出한 RNA의 生存比를 比較한 實驗結果는 Table 2에 表示되어 있다. 弱處理한 virus와 그로부터 추출한 RNA의 生存比는 各各 5log와 3log의 減少를 보였으나 naked RNA의 境遇에는 1log 以下の 減少밖에 나타나지 않았다. 強處理한 virus와 그로부터 推出한 RNA의 境遇에도 각각 7log와 5log의 減少에 比하여 naked RNA는 2log 밖에 減少하지 않았다. 다시말하면 naked RNA는 virus coat 內에 在存하는 RNA 보다 오존處理에 依하는 不活性率이 매우 적다는 것을 意味한다.

RNA가 露出되어 있을 때와 virus coat 內에 存在할 때 오존에 대한 不活性度를 보다 精密하게 比較하기 위하여 위의 두가지 RNA를 5~17% sucrose gradient에서 遠心分離한 후 각 fraction의 [³H] radioactivity를 分析한 結果는 Table 3

Table 2. Survivals of f2 virus, RNA extracted from previously ozonated virus, and naked RNA treated with 0.09 and 0.8mg/l ozone, and their survival fractions

| Sample | Untreated control (PFU/ml) | 0.09mg/l ozone treatment | | 0.8mg/l ozone treatment | |
|--|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | | Virus or RNA survival (PFU/ml) | Survival fraction (-logN/No) | Virus or RNA survival (PFU/ml) | Survival fraction (-logN/No) |
| Virus | 5.3×10^9 | 8.7×10^4 | 1.64×10^5 | 5.2×10^2 | 4.96×10^7 |
| RNA extracted from previously ozonated virus | 6.2×10^5 | 9.8×10^2 | 1.58×10^3 | 8.5×10^0 | 1.37×10^5 |
| Naked RNA treated with ozone | 4.5×10^5 | 3.6×10^4 | 8.00×10^0 | 7.7×10^3 | 1.71×10^2 |

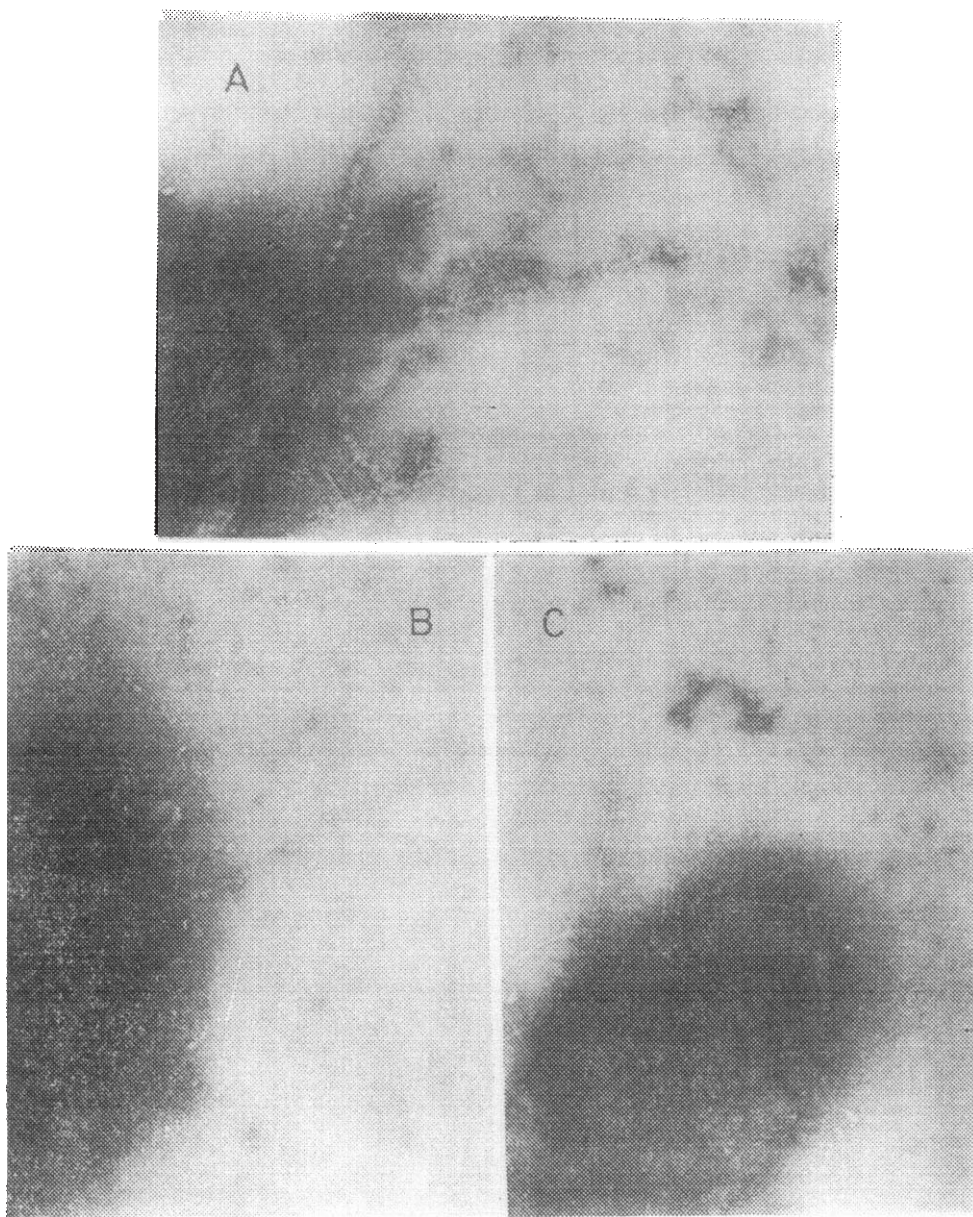


Fig. 4. Electron micrographs of the mixtures of *E. coli* K-13 and untreated control virus f2 (A) and viruses which were treated with 0.09mg/l ozone for 5 sec (B) and with 0.8mg/l ozone for 30 sec (C). The viruses adsorbed to the host bacteria were stained with 2% uranyl acetate. The control viruses were intact and many of them adsorbed to the host pili. Some of the viruses treated with 0.09mg/l ozone for 5sec were still intact and adsorbed to the pili. Most of the viruses treated with 0.8mg/l ozone for 30 sec were broken down to many capsid subunits. Magnification is $\times 32,000$.

Table 3. Sucrose density analysis of ozonated naked RNA and RNA extracted from the virus previously treated with ozone

| Fraction number | Radioactivity in CPM | | | | | |
|-----------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Ozonated naked RNA | | | RNA extracted from the ozonated virus | | |
| | Untreated control | 0.09mg/l ozone treatment | 0.8mg/l ozone treatment | Untreated control | 0.09mg/l ozone treatment | 0.8mg/l ozone treatment |
| 1 | 57.8 | 58.2 | 103.2 | 107.9 | 159.0 | 115.2 |
| 2 | 172.4 | 191.2 | 403.5 | 117.5 | 256.8 | 405.9 |
| 3 | 527.2 | 567.7 | 1083.8 | 238.5 | 315.2 | 679.8 |
| 4 | 992.6 | 1069.8 | 1644.1 | 614.7 | 886.7 | 613.3 |
| 5 | 1486.3 | 1494.0 | 1495.4 | 1083.3 | 784.4 | 298.5 |
| 6 | 1713.9 | 1489.7 | 898.4 | 1502.6 | 356.7 | 183.6 |
| 7 | 1387.0 | 1177.4 | 340.6 | 1471.6 | 282.4 | 99.9 |
| 8 | 908.6 | 823.6 | 170.5 | 1200.3 | 223.4 | 79.1 |
| 9 | 556.9 | 479.4 | 75.5 | 837.5 | 222.6 | 65.9 |
| 10 | 265.8 | 301.7 | 40.5 | 515.1 | 173.7 | 63.9 |
| 11 | 168.4 | 129.1 | 28.8 | 335.0 | 157.4 | 63.4 |
| 12 | 92.8 | 73.6 | 19.0 | 167.9 | 142.3 | 58.1 |
| 13 | 49.9 | 42.3 | 11.8 | 131.9 | 139.8 | 60.4 |
| 14 | 27.0 | 41.3 | 11.5 | 102.7 | 132.6 | 59.5 |
| 15 | 43.0 | 42.2 | 5.7 | 110.8 | 67.3 | 56.0 |

과 같다.

Naked RNA 와 오존처리한 virus 에서推出的 RNA 는 共히 6 番 fraction 에서 가장 높은 radioactivity 나타냈으나 弱處理한 試料에서 naked RNA 는 5 番 그리고 오존處理한 virus 에서推出的 RNA 는 4 番 fraction 에서 가장 높은 radioactivity 가 發見되었고 强處理한 試料에서는 前者는 4 番, 後者는 3 番 fraction 에서 各 各 가장 높은 radioactivity 를 나타냈다. 다시 말하면 오존處理에 의하여 naked RNA 의 sedimentation velocity 는 약간 變化한데 比하여 오존處理를 한 virus 에서推出的 RNA 의 sedimentation velocity 는 크게 減小하였다. 이는 naked RNA 가 virus 內에 存在하는 RNA 보다 오존에 대한 抵抗力이 크다는 것을 意味하며 이는 또한 Table 2 의 生存比의 結果와 같이 virus 內의 RNA 는 naked RNA 보다 오존處理에 의하여 더 많이 不活性化되었다는 것이다.

考 察

本實驗에서 觀察된 bacterial virus f2 에 대한 오존의 殺菌效果는 Venosa (1972)에 의하여指摘된 바와 같이 低濃度の 오존에서도 매우迅速하면서 強力한 反應에 의한 것이 說明되었다. 오존의 殺菌效果는 反應 5 秒와 그 후 10 分間の 두 段階作用은 Katzenelson 等 (1974)과 Young 과 Sharp (1977)에 의한 virus 의 凝集에 의한 說明은 適用되지 않는다. 왜냐하면 本實驗에使用한 virus 試料는 모두 使用 直前까지 -70°C 에 保存되었으며 電子顯微鏡에 의하여 어떠한 virus 의 凝集現象도 觀察되지 않았다.

오존處理하지 않은 virus 의 sucrose gradient 分析(Fig. 2)에서 觀察된 3 番 fraction 의 radioactivity 는 實驗過程中 우발적으로 破壞된 virus 에서 流出된 RNA 로 생각된다. 왜냐하면 對照群으로 使用한 naked RNA 의 radioactivity 도 모두 3 番 fraction 에서 가장 높았고 오존處理

하지 않은 virus의 電子顯微鏡사진에서도 약간의 破壞된 virus 粒子가 觀察되었기 때문이다.

오존處理에 의한 virus의 破壞는 電子顯微鏡 觀察로 明白히 證明되었으며 그 破壞程度는 오존의 濃度和 反應時間에 比例하여 增加하였다. 오존處理에 의하여 破壞된 蛋白質 외투막의 構成單位體는 bacteriophage f2 (Zelazo와 Haschemeyer, 1969)와 R17(O'challaghan 등 1973)을 中性 pH에서 4M의 guanidine hydrochloride로 處理하여 얻은 11s의 構成單位體들과 매우 恰似하였다. 오존處理에 의한 蛋白質 외투막의 破壞는 RNA를 含有하는 poliovirus (Riesser 등, 1976)와 DNA를 含有하는 bacteriophage ϕ X174 (DeMik와 DeGroot, 1977)에서도 觀察되었다. 이와같은 結果는 蛋白質과 cysteine, tryptophan, methionine과 같은 아미노산을 오존으로 處理했을때 觀察한 Mudd 등 (1969)의 結果와 아미노산中 tryptophan과 methionine이 특히 오존에 의하여 敏感하게 反應한다는 Previero 등 (1967)의 結果에 의해서 證明된다. 오존에 의한 virus f2의 破壞는 이 virus의 외투막 蛋白質이 cysteine, tryptophan, methionine 등의 아미노산을 包含하고 있다는 事實로 說明할 수 있다.

RNA에 대한 오존의 影響에 대해서 많은 報告가 없다. Christensen과 Giese (1954)와 Scott (1975)는 purine과 pyrimidine이 오존處理에 의하여 UV 吸收率이 變化되었음을 報告했으며 Christensen과 Giese (1954) 그리고 Prat 등 (1968)은 pyrimidine base 중 특히 thymine이 cytosine이나 uracil보다 더욱 敏感하게 反應한다는 點을 指摘하였다. Uracil이 thymine보다 오존에 의하여 作用을 받지 않는다면 virus f2의 naked RNA가 오존處理에 대하여 抵抗性이 크다는 結果를 說明할 수 있다. 그러나 virus를 오존處理 했을때 그 virus RNA의 높은 不活性에 대한 說明은 外투막 蛋白質이 오존에 의하여 破壞된 후 變化된 蛋白質分子가 二次적으로 RNA를 絶斷하여 不活性化시키는 可能性도 排除할 수 없다.

摘 要

細菌性 virus f2에 대한 ozone의 殺菌機作을 [3 H]-uridine을 RNA에 附着하여 sucrose gradient 分析法과 電子顯微鏡 觀察에 의하여 究明하였다. Virus f2는 0.09와 0.8mg/l의 오존溶液에서 5秒동간의 處理 結果 각각 5log와 7log의 殺菌效果를 보였으며 그 後 10分동안에는 보다 完만한 速度로 殺菌作用이 나타났다. Virus f2는 오존處理에 의하여 蛋白質 外투막이 破壞되어 많은 單位體들 形成했으며 外투막의 破壞程度에 따라 寄主細菌의 pili에 吸着되는 程度는 減少하였다. 外투막의 破壞에 依하여 RNA는 溶液속으로 流出되는데 純粹한 RNA溶液에서는 오존에 對한 抵抗性이 컸지만 RNA가 virus 蛋白質과 함께 溶存되어 있을때에는 오존殺菌效果가 增加되었다. 이는 RNA가 絶斷되어 不活性化되는 過程에 파괴된 蛋白質分子가 影響을 주고 있음을 意味한다.

REFERENCES

1. Adams, M.H. 1959, Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., N.Y.
2. Berg, G. 1970, Integrated approach to the problem of viruses in water. p.339-364. In Proc. National specialty conference on disinfection. Amer. Soc. Civil Engineer., N.Y.
3. Dugan, P.D. 1978, Use and misuse of chlorine for the protection of publicwater supplies and the treatment of wastewater. Amer. Soc. Microbiol. News. 44: 97-102.
4. Christensen, E., and A. Giese. 1954, Changes in absorption spectra of nucleic acids and their derivatives following exposure to ozone and ultraviolet radiations. Arch. Biochem. Biophys. 51: 208-216.
5. Cramer, W.N., K. Kawata, and C.W. Kruse. 1976, Chlorination and iodination of poliovirus and f2. J. Amer. Water Works Assoc. 68: 61-76.
6. DeMik, G., and I. DeGroot. 1977, Mechanism of inactivation of bacteriophage ϕ X174 and its DNA in aerosols by ozone and ozonized cyclohexene. J. Hyg. Camb. 78: 199-211.

7. Hofschneider, P.H., and H. Delius. 1968, Assay of M12 phage RNA infectivity in spheroplasts. p.880-886. In L. Grossman and K. Moldava (ed.), *Methods in Enzymology*. vol. XII. Nucleic acids, part B. Academic Press, N.Y.
8. Hsu, Y.C., S. Nomura, and C.W. Kruse. 1966, Some bactericidal and virucidal properties of iodine not affecting infectious RNA and DNA. *Amer. J. Epidemiol.* **82** : 317-328.
9. Katzenelson, E., and N. Biedermann. 1976, Disinfection of viruses in sewage by ozone. *Water Res.* **10** : 629-631.
10. Katzenelson, E., B. Kletter, and H.I. Shuval. 1974, Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone. *J. Amer. Water Works Assoc.* **66** : 725-729.
11. Kim, C.K., D.M. Gentile, and O.J. Sproul. 1980, Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f2. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 210-218.
12. Loeb, T., and N.D. Zinder. 1961, A bacteriophage containing RNA. *Nat'l. Acad. Sci. U.S.* **47** : 282-289.
13. Majumdar, S.B., W.H. Ceckler, and O.J. Sproul. 1973, Inactivation of polioviruses in water by ozonation. *J. Water Pollut. Control Fed.* **54** : 2433-2443.
14. Mudd, J.B., R. Reavitt, A. Ongun, and T.T. McManus. 1969, Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmospheric Environment.* **3** : 669-681.
15. Nebel, C., R.D. Gottschling, R.L. Hutchison, T.J. McBride, D.M. Taylor, J.L. Pavoni, M.E. Tittlebaum, H.E. Spencer, and M. Fleischman. 1973, Ozone disinfection of industrial-municipal secondary effluents. *J. Water Pollut. Control Fed.* **45** : 2493-2507.
16. O'Callaghan, R., R. Bradley, and W. Paranchych. 1973, Controlled alterations in the physical and biological properties of R17 bacteriophage induced by guanidine hydrochloride. *Virology.* **54** : 476-494.
17. Oeschger, M.P., and D. Nathans. 1966, Differential synthesis of bacteriophage-specific proteins in MS2-infected *Escherichia coli* treated with actinomycin. *J. Mol. Biol.* **22** : 235-347.
18. Olivieri, V.P., C.W. Kruse, Y.C. Hsu, A.C. Griffiths, and K. Kawata. 1975, The comparative mode of action of chlorine, bromine, and iodine on f2 bacterial virus. p.145-162. In J.D. Johnson. (ed.), *Disinfection-water and wastewater*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
19. Pavoni, J.L., M.E. Tittlebaum, H.T. Spencer, M. Fleishman, C. Nebel, and R. Gottschling. 1972, Virus removal from wastewater using ozone. *Water Sew. Works.* **119** : 59-67.
20. Poynter, S.F.G., J.S. Slade, and H.H. Jones. 1973, The disinfection of water with special reference to viruses. *Wtr. Trtmt. and Exam.* **22** : 194-208.
21. Prat, R., C. Fofre, and A. Cier. 1968, Effects de l'hypochlorite de sodium, de l'ozone et des radiations ionisantes sur les constituants pyrimidiques d'*Escherichia coli*. *Ann. Ins. Pasteur.* **114** : 595-607.
22. Previero, A., M.A. Coletti-Previero, and P. Jolles. 1967, Localization of non-essential tryptophan residues for the biological activity of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **24** : 261-268.
23. Riesser, V.W., J.R. Perrich, B.B. Silver, and J.R. McCammon. 1976, Possible mechanism of poliovirus inactivation by ozone. p.186-192. In *Forum on ozone disinfection*. International Ozone Institute, Syracuse, N.Y.
24. Scott, D.B.M. 1975, The effect of ozone on nucleic acids and their derivatives. p.226-240. In W.J. Blogoslawski and R.G. Rice (ed.), *Aquatic applications of ozone*. International Ozone Institute, Syracuse, N.Y.
25. Shah, P., and J. McCamish. 1972, Relative resistance of poliovirus 1 and coliphage f2 and T2 in water. *Appl. Microbiol.* **24** : 652-659.
26. Shechter, H. 1973, Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. *Water Res.* **7** : 729-739.
27. Sommerville, R.C., and G. Rempel. 1972, Ozone for supplementary water treatment. *J. Amer. Water Works Assoc.* **64** : 377-382.
28. Venosa, A.D. 1972, Ozone as a water and

- wastewater disinfectant: a literature review. p.82—100. In F.L. Evans III (ed.), *Ozone in water and wastewater treatment*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
29. Weber, K., and W. Konigsberg. 1975, Proteins of the RNA phages. p.51—84. In N.D. Zinder (ed.), *RNA phages*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
30. Yamamoto, K.R., and B.M. Alberts. 1970, Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*. **40** : 734—744.
31. Young, D.C., and D.G. Sharp. 1977, Poliovirus aggregation and their survival in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 168—177.
32. Zelazo, P., and R. Haschemeyer. 1969, Specific dissociation of bacteriophage f2 protein to an 11 s component. *Biochemistry*. **8** : 3587—3592.