

오존에 의한 bacteriophage f2의 殺菌作用

金 致 卿

(忠北大學校 自然大 生物學科)

Ozone Inactivation of Bacteriophage f2

Kim, Chi-Kyung

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

Abstract

Bacteriophage f2 were treated with ozone at various concentrations for 20 minutes. The inactivation kinetics of f2 phage were examined during ozonation. In order to study the mode of action of ozone on the phage f2, absorption of the phage to the host pili was measured by utilizing radioactivity of tritium incorporated into the phage RNA. Sucrose density gradient analysis and electron microscopy were also used to prove the mechanism of ozone inactivation of the phage. Structural proteins of the phage were broken by ozonation into many protein subunits. The extent of phage breakage was proportional to ozone concentration and reaction time. Percent decrease of the phage absorption to the host pili was coincident with the rate of ozone inactivation of the phage. Ozone inactivation of bacteriophage f2 was shown to be caused by the breakage of the structural protein and blockage of the phage absorption to the host pili.

緒 論

上水水의 殺菌處理에 사용되는 여러가지 化學殺菌劑 중에서 ozone은 최근에 와서 매우 効率的이며 處理후에도 水質에 아주 작은 汚染영향을 준다는 점에서 世界的으로 注目を 받고있다. 그러나 水中微生物에 대한 ozone의 強力한 殺菌作用에도 불구하고 그 殺菌機作에 대해서는 별로 많은 研究가 이루어지지 못했다.

특히 virus와 같은 抵抗力이 큰 微生物에 대해서 ozone은 매우 効果的인 殺菌作用을 나타내므로 最近에는 virus에 대한 ozone의 殺菌에 관한 研究가 Katzenelson과 Biedermann(1976), Kim등(1980), Pavoni등(1972), Riesser등(1976)에 의하여 활발히

진행되고 있다.

RNA를 내포하고 있는 bacteriophage f2는 그 構成成分이 物理的으로나 化學的으로 enteric virus와 매우 類似할 뿐더러 chlorine등의 殺菌劑에 대한 反應이 또한 enteric virus와 같으므로(Cramer등, 1976; Olivieri등 1975), 下水處理과정에서 問題되는 enteric virus의 殺菌研究의 model로 Hsu등(1966)에 의하여 導入되었다. Bacteriophage f2는 한 分子의 RNA와 아미노산의 構成이 밝혀진 두 分子의 構造蛋白質로만 되어있고(Weber와 Konigsberg, 1975) 實驗室에서의 取扱이 용이하므로 여러가지 化學殺菌劑의 殺菌作用 및 그 機作을 研究하는데 좋은 材料가 되고있다.

Bacteriophage f2에 대한 ozone의 殺菌作用에 관해서는 Pavoni등(1972)이 보고했으며 Riesser등(19

※ 이 論文은 1979年度 文敎部 學術研究 助成費에 의하여 研究된 것임.

76)은 poliovirus type 2에서 ozone은 protein capsid를破壞한다고 보고했었다. Bacteriophage ϕ X174를 재료로 DeMik과 DeGroot(1977)는 ozone을 포함하는空氣중에서 단백질 外套膜의破壞를觀察했었다. 最近에 와서 Kim등(1980)이 bacteriophage f2에 대한 ozone의殺菌效果를 시험하고 그殺菌機作을究明했었다.

本 研究에서는 bacteriophage f2에 대한 ozone의殺菌作用을 여러가지 ozone농도를使用하여 보다 오래동안反應시키면서 일어나는殺菌效果를試驗하였으며 UV(ultra violet)light의吸光性和電子顯微鏡技術을利用하여 ozone의殺菌作用 및 寄主細菌에 대한 f2 phage의吸着性を 서로比較檢討하였다.

實驗材料 및 方法

1. Bacteriophage f2의 分離 및 滴定方法

Bacteriophage f2(ATCC#15766-B)와 그 寄主細菌인 *Escherichia coli* K-13(ATCC#15766)은 The Ohio State University, Water Resources Center로부터 分讓받았으며 Loeb와 Zinder(1961)의 ammonium sulfate方法을 약간 變更하여 2l의 Tryptone Yeast Extract(TYE) broth medium에서 寄主細菌을 약 12시간 培養한 후 bacteriophage f2를 multiplicity of infection (MOI) 10으로 接種시켜 다시 약 12시간 培養增殖시켰다. Bacteriophage는 ammonium sulfate로 濃縮시킨 후 0.65g/l의 cesium chloride로 混合하여 Beckman L2-65B ultracentrifuge에서 125,000×g로 48시간 遠心分離하여 形成된 phage band를 取하였다. 이 phage sample은 pH 7.0의 0.01M phosphate buffer용액을使用하여 4°C에서 24시간 dialyze시킨 후 triple-distilled water로 약 10^{12} PFU(plaque forming unit)/ml이 되도록 희석하여 使用할때까지 -70°C에 저장하였다.

Bacteriophage f2의 滴定은 *E. coli* K-13을 寄主로使用하여 Adams(1959)의 overlay method에 의하여 serial dilute한 phage sample을 triplicate로 plate하여 生成된 plaque를 檢査하여 그 平均數値를 採하였다.

2. phage f2의 오존처리

Ozone 發生은 Union Carbide의 Linde model SG-4050 ozone generator를 이용하였으며 Kim등(1980)이 만든 ozonation system을使用하여 phage sample을 오존處理하였다. 0.01M NaCl이 포함된 10^{-3} M

phosphate buffer용액(pH7.0)에 溶存시킨 ozone溶液의 농도는 Shechter(1973)의 spectrophotometer方法에 의하여 測定했다. Ozone處理實驗에 쓰이는 모든 操作器具는 2mg/l의 ozone溶液에 1時間 以上 浸漬시킨 후 증류수로 몇차례 洗滌하여, 120°C에서 2時間 乾燥시켜 ozone demand를 完全히 없앴다. Phage f2는 오존溶液에 1:100의 比率로 混合處理하였으며 處理후 殘留오존은 0.209g/l의 sodium thiosulfate溶液을使用하여 中和시켰다.

3. Sucrose density gradient分析 및 紫外線 吸光度 測定

Sucrose density gradient는 8%의 NaCl을 포함하는 0.01M phosphate buffer(pH7.2)로 만든 5%와 20%의 sucrose 溶液으로 만들었다. 11ml의 sucrose density gradient의 上層에 1ml의 f2 phage 試料를 넣고 Beckman L2-65B ultracentrifuge를使用하여 4°C에서 110,000×g로 4시간 遠心分離한 후 ISCO model 180 density gradient fractionator를使用하여 40%의 sucrose를 遠心分離管의 下部에 注入함으로써 上層으로부터 fractionate하는 동안 density gradient fractionator에 裝置한 ultraviolet spectrophotometer로 254nm의 波長을 吸收하는 f2 phage의 構成蛋白質 및 RNA의 量을 連續적으로 記錄測定하였다.

4. Phage f2의 tritium labeling

Bacteriophage f2는 Oeschger와 Nathans(1966)의 方法에 準하여 [3 H]-uridine을 RNA에 附着시켰다. 이 때 使用한 phage의 寄主細菌은 *E. coli* C-3000-38로서 uridine, thymine 및 몇가지 아미노산을 要求하는 mutant로서 uridine의 양을 10분의 1로 減少시킨 Tris Pyruvate Glucose (TPG) medium 1l에서 滅菌된 空氣를 供給하면서 37°C에서 24시간 培養한 후 3mCi의 [3 H]-uridine을 添加하였다. 30분간 더 培養한 후 bacteriophage f2를 MOI 10으로 接種시켜 24시간 계속 培養하였다. [3 H]-uridine이 RNA에 附着한 phage는 Yamamoto와 Alberts(1970)의 polyethylene glycol 6,000을 使用하는 方法에 따라 分離하였다. 이 bacteriophage f2의 lysate는 앞에서 言及한 Loeb와 Zinder(1961)의 方法에 따라 cesium chloride에서 遠心分離하여 얻은 phage band를 취하여 dialyze한 후 適當濃度로 희석하여 使用할 때까지 -70°C에 저장하였다.

5. Phage f2의 寄主細菌에 대한 吸着

Tritium으로 label된 f2 phage를 오존處理한 후

Table 1. Ozone inactivation kinetics of bacteriophage f₂ at various ozone concentration

Ozone Solution		Surviving bacteriophage(PEU/ml) after ozonation for (seconds)											
ozone(mg/l)	pH	temperature(C)	0	10	20	30	40	50	60	120	300	600	1,200
0.05	7.0	25	2.4×10 ⁸	— ^a	8.4×10 ³	3.4×10 ³	—	3.6×10 ³	4.2×10 ³	2.2×10 ³	1.9×10 ³	1.8×10 ³	9.0×10 ²
0.16	6.9	27	1.5×10 ⁸	—	7.3×10 ³	—	1.3×10 ⁴	—	6.9×10 ²	3.8×10 ²	6.4×10 ²	5.1×10 ²	1.3×10 ³
0.21	7.0	23	4.7×10 ⁸	—	9.5×10 ²	—	1.3×10 ³	—	1.1×10 ²	1.3×10 ²	1.0×10 ²	8.3×10 ¹	2.1×10 ²
0.34	7.0	24	5.9×10 ⁸	4.3×10 ²	1.6×10 ²	—	—	4.4×10 ¹	4.3×10 ¹	1.0×10 ⁰	1.0×10 ⁰	0	0
0.55	6.9	26	2.0×10 ⁸	8.2×10 ¹	9.7×10 ¹	—	1.2×10 ¹	1.5×10 ¹	6.3×10 ¹	4.8×10 ¹	0	0	0
0.65	7.0	25	1.5×10 ⁸	—	4.6×10 ¹	—	4.6×10 ¹	—	4.0×10 ⁰	1.0×10 ¹	2.0×10 ⁰	0	0

a. Not determined

寄主細菌의 pili에 대한 吸着性を Brinton과 Beer(1967)의 方法에 따라 濾過하여 radioactivity를 測定試驗하였다. Specific adsorption은 寄主細菌인 *E. coli* K-13을 使用하였으며 Non-specific adsorption은 寄主가 아닌 *E. coli* K-15T와 Millipore filter membrane을 使用하여 測定하였다. 1ml의 phage試料를 TYE medium에 희석한 1ml의 細菌과 混合하여 常溫에서 10분간 吸着시킨 후 0.45 μ m Millipore membrane filter에 濾過한 후 filter membrane을 乾燥시켜 10ml의 Liquifluor cocktail(New England Nuclear Corp.)에 混合하였다. 寄主細菌의 pili에 吸着하여 寄主細菌과 함께 filter membrane을 通過하지 못한 f₂ phage의 radioactivity를 Packard Tri-carb model 3375 liquid scintillation spectrometer를 使用하여 測定함으로써 吸着度를 比較하였다.

6. 電子顯微鏡에 의한 觀察

Ozone으로 處理한 f₂ phage 試料와 處理하지 않은 phage control를 Formvar와 炭素로 coat된 300mesh의 구리 grid 위에 한 방울씩 30분간 놓았다가 filter paper로 溶液을 除去한 후 2%의 uranyl acetate로 3분간 negative staining했다. Uranyl acetate를 filter paper로 除去한 후 室溫에서 乾燥시켜 Phillips EM-300 電子顯微鏡을 使用하여 80 또는 100kV로 觀察하였다.

Control 및 오존處理한 f₂ phage가 寄主細菌의 pili에 吸着하는 率을 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 1ml의 phage試料를 1ml의 寄主細菌 *E. coli* K-13과 混合하여 室溫에서 10분간 吸着시킨 후 그 混合液을 Formvar와 炭素로 coat된 300mesh의 구리 grid에 놓고 2%의 uranyl acetate를 使用하여 上記 方法에 의하여 觀察하였다.

結 果

Bacteriophage f₂에 대한 오존의 殺菌作用을 여러 가지 오존濃度에서 시험한 結果는 table 1.과 같다. 어느 오존濃度에서나 f₂ phage는 10초 또는 20초의 反應에 의하여 10⁻⁵~10⁻⁶의 殺菌效果를 나타냈으며 그 以後에는 매우 完滿한 速度로 殺菌作用이 계속되었다. 오존濃度가 0.21mg/l나 그 以下에서는 20분의 處理 후에도 10³PFU/ml 내외의 phage가 生存하였으나 0.34mg/l 또는 그 以上の 濃度에서는 10분간의 處理에 의하여 f₂ phage는 完全히 殺菌되었다.

Bacteriophage f₂에 대한 오존의 殺菌作用의 原因

Table 2. Specific and non-specific absorption of bacteriophage f2.

Reaction time(sec)	Ozonation at 0.05mg/l			Ozonation at 0.55mg/l		
	Radioactivity in CPM		% decrease of specific absorption	Radioactivity in CPM		% decrease of specific absorption
	Non-specific absorption	Specific absorption		Non-specific absorption	Specific absorption	
Control	192	2425	0	192	2425	0
10	195	1582	34.76	183	674	72.02
30	243	1409	41.89	158	404	83.34
60	187	1178	51.42	146	294	87.88
120	219	1236	49.03	117	254	89.53
300	233	967	60.12	112	173	92.91

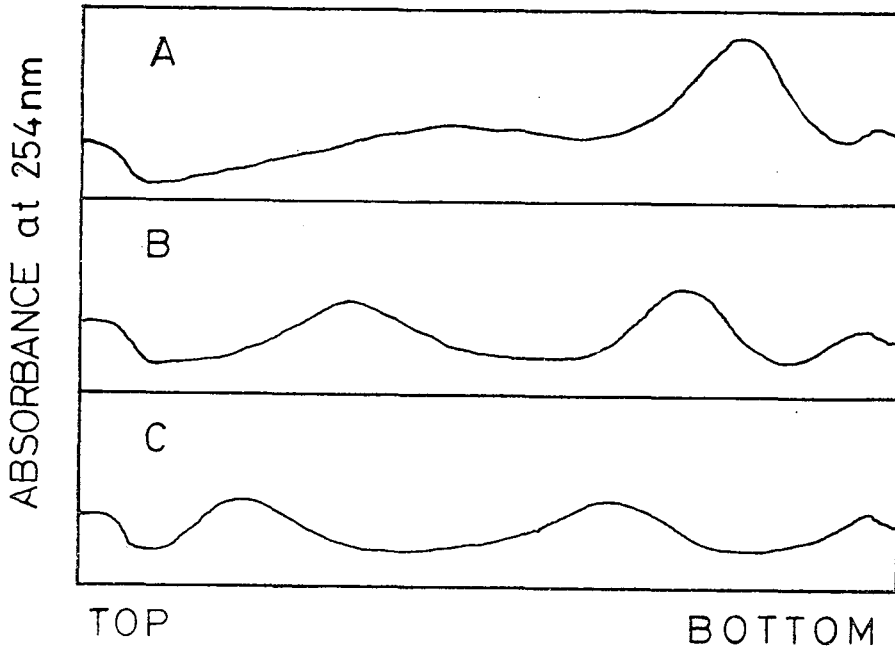


Fig. 1. Sucrose density gradient analysis of control bacteriophage f2 (A) and phages ozonated at 0.05mg/l for 20 seconds (B) and at 0.55mg/l for 60 seconds (C). Three separate 5 to 20% sucrose gradients were used to centrifuge at 110,000×g for 4 hours and measured for UV absorbance at 254nm continuously from the top. Control f2 phage showed a peak on the bottom side. Ozonated phages showed two peaks which were moved up.

을 구명하기 위하여 phage f2가 寄主細菌의 pili에 吸着되는 成果와 오존의 濃度 및 處理期間과의 關係를 tritium으로 附着한 phage를 材料로 濾過方法에 의하여 시험하였다. 오존은 0.05mg/l와 0.55mg/l의 두가지 濃度を 선택하여 10초에서 5분까지 각각 오

존處理하였다. 오존處理를 하지 않은 control f2 phage와 오존處理를 한 phage試料에 대하여 寄主細菌이 아닌 *E. coli* K-15T와 Millipore filter membrane에 吸着하는 程度를 non-specific adsorption으로 測裁하였고 正常寄主인 *E. coli* K-13에 吸着하는

度程과 non-specific absorption과의 差異를 specific absorption으로 測定하였다. Specific absorption과 non-specific absorption을 radioactivity(CPM)으로 表示한 結果는 table 2.에 表示되어있다. Specific absorption은 두가지 오존濃度에서 모두 反應時間이 연장됨에 따라 漸進적으로 減少되었으며 그 減少의 百分率은 0.05mg/l에서 5분간 處理후 약 66%에 이르렀으나 0.55mg/l의 오존濃度에서는 90%이상까지 增加하였다. 이 結果는 table 1의 같은 오존濃度에서 나타난 phage의 殺菌效果와 同一한 pattern을 보여 주었다.

오존의 濃度와 反應時間에 따라 나타난 bacteriophage의 殺菌效果와 연관하여 phage particle에 일어날수 있는 構造 및 形態上的 變化를 紫外線 absorbancy와 electron microscopy에 의하여 시험하였다. 紫外線 吸光度의 變化를 測定하기 위하여 control phage 試料과 0.05mg/l의 오존溶液에서 20초 그리고 0.55mg/l에서 60초동안 處理한 phage試料을 5%와 20%의 sucrose density gradient에서 遠心分離한 후 254nm 波長의 紫外線에 의한 각 fraction의 吸光度를 測定한 結果는 Fig. 1에 圖示되어 있다. Control phage의 吸光 頂點은 遠心分離管의 下部에서 發見되었으나 오존處理를 함에 따라 오존의 濃度 및 處理期間에 比例하여 頂點은 上部로 移動하였으며 control phage試料에서는 별로 나타나지 않았던 다른 하나의 吸光頂點이 遠心分離管의 중간部位에서 나타나 上部로 移動하였다.

이와 같이 sucrose density gradient에서 紫外線 吸光頂點의 移動은 오존處理에 의하여 phage f₂가 破壞되어 構成蛋白質이나 RNA로 分解되어 그들의 沈澱速度가 減少되었음을 意味하는 것이다. 오존處理에 의하여 나타나는 phage f₂의 構造形態上的 變化를 證明하기 위하여 control 및 오존處理한 phage 試料을 negative staining하여 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 그 結果는 Fig. 2와 같다. Control phage (Fig. 2A)는 그 본래의 icosahedral形을 保存하고 大部分의 phage particle은 RNA를 內包하고 있었으나 極少數의 particle은 破壞된 形態와 內部 RNA를 流失한 構造를 나타내었다.

오존處理한 f₂ phage 중에서는 0.05mg/l의 오존에서 20초 그리고 0.55mg/l에서 60초 동안 處理한 phage試料을 代表的으로 選定하여 그 構造上的 變化를 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 0.05mg/l에서 20초 處理한 phage의 形態는 Fig. 2B와 같으며 많은

수의 phage particle이 여러가지 크기의 protein 조각으로 破壞되어 흩어져 있었으며 아직 破壞되지 않은 phage는 正常的인 icosahedral形을 保存하고 있거나 약간 變形된 形態를 나타내고 있었다. 0.55mg/l의 오존溶液에서 60초 동안 處理한 phage(Fig. 2C)는 大部分이 破壞되어 一定한 크기의 protein subunit으로 遊離되어 있었으며 때로는 중간크기의 protein 조각도 發見되었다. 完全한 icosahedral 形態는 거의 發見되지 않았으며 혹시 發見된다 하더라도 內部的 RNA는 流失된 構造를 나타내었다.

Bacteriophage f₂의 寄主細菌에 대한 specific absorption의 結果(table 2)를 證明하기 위하여 電子顯微鏡으로 觀察한 結果는 Fig. 3과 같다. Control phage를 寄主細菌인 *E. coli* K-13에 混合시켰을 때에는 大部分의 phage particle이 pili에 吸着하였다 (Fig. 3A). 오존處理한 f₂ phage의 specific absorption을 電子顯微鏡으로 觀察하기 위하여 0.05mg/l의 오존溶液에서 30초 동안 處理한 phage와 0.55mg/l에서 120초 處理한 phage를 代表的으로 選定하여 control phage와 같은 方法으로 檢鏡하였다. 0.05mg/l에서 30초 오존處理한 phage(Fig. 3B)는 icosahedral 形態를 保存하고 있는 phage만이 寄主細菌의 pili에 吸着했으며 그 數는 control에 比하여 훨씬 적었다. 0.55mg/l에서 120초 오존處理한 phage (Fig. 3C)에서는 寄主細菌의 pili에 吸着된 phage particle이 전혀 發見되지 않았으며 오존處理에 의하여 破壞된 무수한 protein subunit만이 周圍에 散在하고 있었다. 이 結果는 tritium으로 labeling한 phage f₂에 대한 吸着度의 結果와 同一하였다.

考 察

Bacteriophage f₂의 오존處理에 使用한 오존의 濃度는 反應 直前 10초 以內에 測定한 것이며 反應期間중 1분 2분 5분 10분 그리고 20분에 測定하였다. 反應 1분 뒤에는 약 30 내지 40%의 減少를 나타냈으며 그 以後에는 完만한 減少를 보여주었다. 反應 用器나 초자器具는 ozone demand를 完全히 除去하였기 때문에 反應도중에 減少된 오존量은 phage f₂와의 反應에 의한 것이었다고 볼수있다.

여러가지 오존 濃度에서 보여준 二段階의 殺菌效果는 Katzenelson등(1974)과 Kim등(1980)에 의해서도 報告되었으며 모든 phage의 試料을 電子顯微鏡으로 檢査한 結果 凝集된 phage particle은 發見되

지 않았으므로 Young과 Sharp(1977)가 報告한 二段階의 殺菌効果는 virus의 凝集에 의한 것이라는 提議에는 合當하지 않으며 오존이 먼저 coat protein과 反應하여 phage를 破壞시킬때 流出된 RNA가 二次的으로 서서히 inactivate 될수 있다는 Kim등(1980)의 說明이 더 可能한 것이다. 오존이 f2 phage와 反應할때 약간의 溫度와 pH의 差異에서는 殺菌效果에 큰 影響이 없으며 殺菌效果는 오존의 濃도와 反應時間에 比例하여 增加하는 것으로 나타났다.

오존處理에 의하여 破壞된 phage의 coat protein과 流出된 RNA는 破壞되지 않은 phage particle보다 sucrose density gradient에서 sedimentation velocity가 減少하였으며 particle의 破壞程度는 오존의 濃도와 反應時間에 比例하여 增加하는 것이 Kim등(1980)의 結果에서와 같이 電子顯微鏡觀察에 의하여 立證되었다.

破壞된 coat protein과 流出된 RNA는 254nm波長의 紫外線 吸光度를 함께 測定하였으며 RNA에 대한 오존의 作用은 따로 檢討하지 않았다. 그러나 오존에 의한 f2 phage의 殺菌效果和 sucrose density gradient의 分析과 電子顯微鏡에 의한 觀察結果는 一次的으로 phage f2의 coat protein이 오존에 의하여 破壞된다는 點에서는 一致하였다.

오존에 의하여 phage의 構造蛋白質이 破壞되는 것이 寄主細菌의 pili에 吸着하는데 作用하는 phage의 A-protein에도 影響을 준다는 것이 specific absorption 實驗結果에 있어서나 電子顯微鏡 觀察에 있어서나 同一하였다. 이는 構造蛋白質과 함께 A-protein도 破壞되어 寄主細菌의 pili에 吸着하지 못하므로 phage의 replication 經路가 차단되는 것으로 理解할수 있다.

Virus가 오존에 의하여 破壞된다는 것은 Riesser등(1976)에 의하여 poliovirus type 2에서, Kim등(1980)에 의하여 bacteriophage f2에서, 그리고 DeMik과 DeGroot(1977)에 의하여 bacteriophage ϕ X174에서 報告되었으며 蛋白質 구성의 아미노산에 대한 오존研究는 Mudd등(1969)은 tryptophan, methionine 그리고 cysteine이 다른 아미노산보다 오존에 대한 感受性이 크다고 報告했을 뿐이다.

本 研究에서 얻은 結果로서는 오존은 一次的으로 f2 phage의 構造蛋白質을 破壞하는 同時에 寄主細菌의 pili에 吸着하는 過程을 차단하는 것이다. 그리고 構造蛋白質은 오존의 濃도와 反應時間에 比例하여 破壞되는데 反應初에는 커다란 조각으로 붕괴되

었다가 궁극적으로는 一定한 크기의 蛋白質의 構成單位體로 分離되었다.

論 結

Bacteriophage f2를 여러가의 濃度の 오존溶液으로 20분 동안 處理하며 그 殺菌效果를 試驗하였으며 그 殺菌作用의 原因을 究明하기 위하여 sucrose density gradient와 寄主細菌의 pili에 대한 吸着度를 試驗分析하였다. 電子顯微鏡으로 f2 phage의 破壞程度와 寄主細菌에 대한 吸着性을 觀察하여 殺菌效果和 比較하는 동시에 殺菌作用의 原因을 立證하였다.

오존은 一次的으로 phage f2의 構造蛋白質을 破壞하여 寄主細菌의 pili에 吸着하는 過程을 차단했으며 構造蛋白質의 破壞程度는 오존의 濃도와 反應時間에 比例하며 궁극적으로는 構成單位體로 유리되었다.

References

Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., N.Y.

Brinton, C. C., Jr., and H. Beer. 1967. The interaction of malespecific bacteriophage with Fpili, p.251~289. In J. S. Colter and W. Paranchych (ed.), The molecular biology of viruses. Academic Press Inc., N.Y.

Cramer, W.N., K. Kawata, and C. W. Kruse. 1976. Chlorination and iodination of poliovirus and f2. J. Am. Water Works Assoc. 68 : 61~76.

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. 78 : 199~211.

Hsu, Y. C., S. Nomura, and C. W. Kruse. 1966. Some bacterial and virucidal properties of iodine not affecting infectious RNA and DNA. Am. J. Epidemiol. 82 : 317~328.

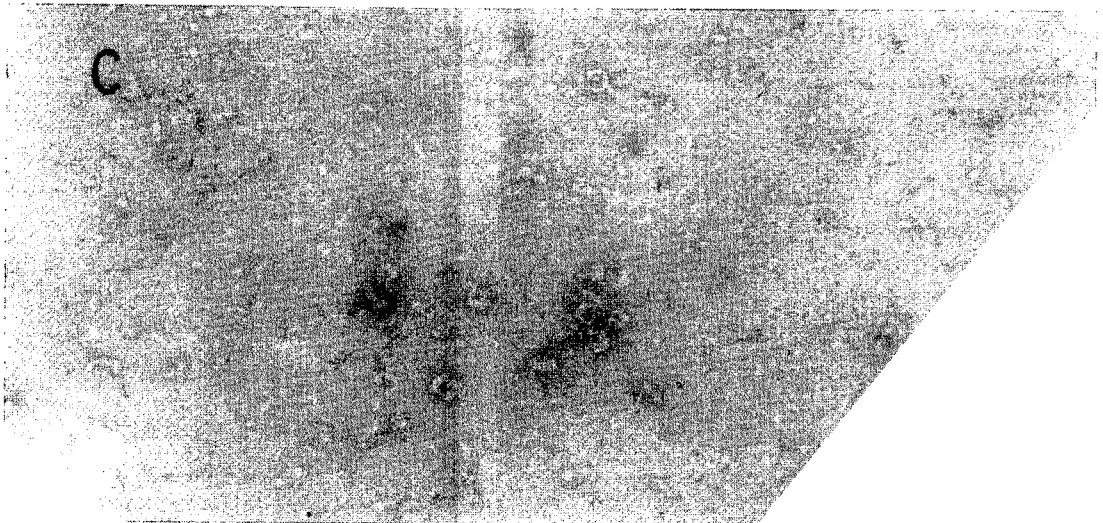
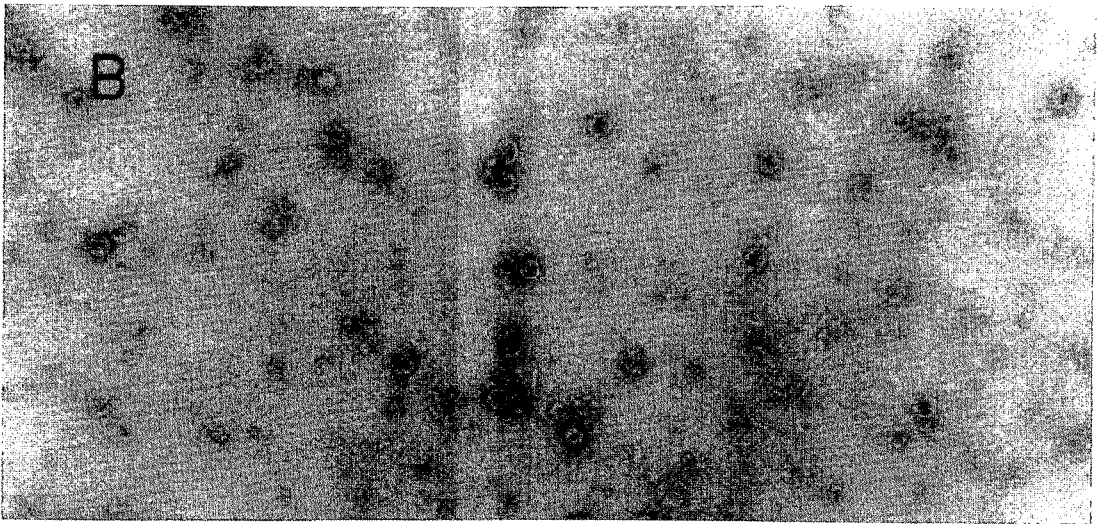
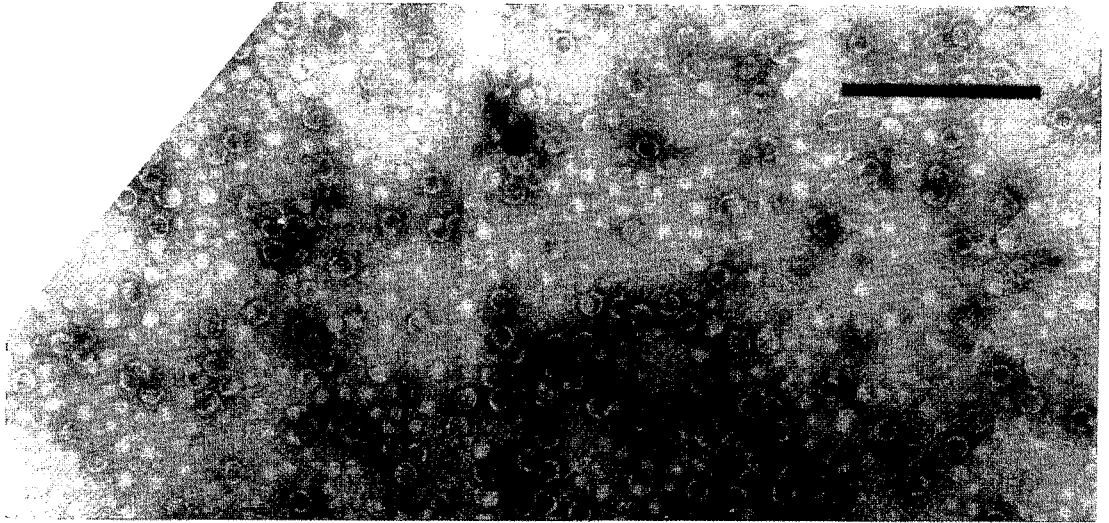
Katzenelson, E., and N. Biedemann. 1976. Disinfection of viruses in sewage by ozone. Water Res. 10 : 629~631.

Kazenelson, E., B. Kletter, and H. I. Shuval. 1974. Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone. J. Am. Water

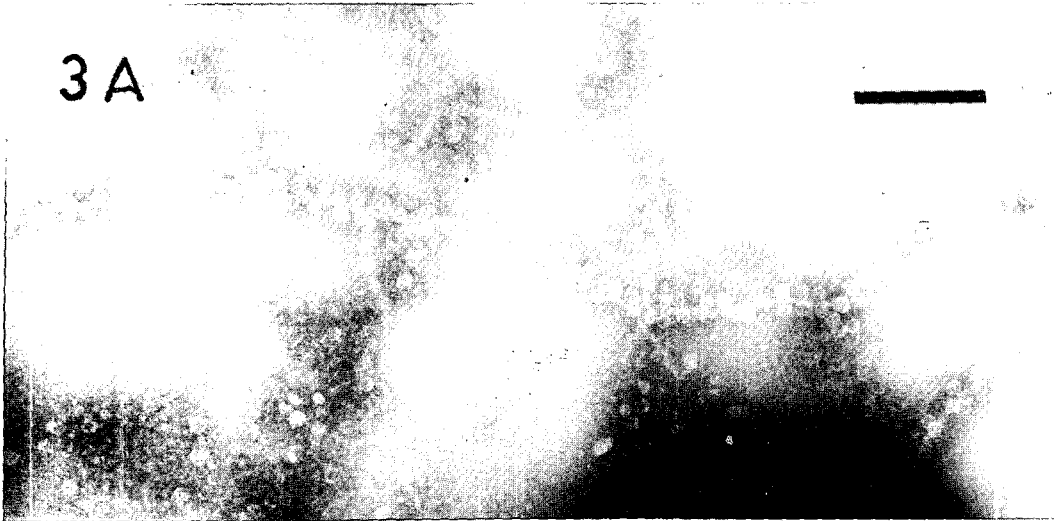
- Works Assoc. 66 : 725~729.
- Kim, C.K., D.M. Gentile, and O.J. Sproul. 1980. Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f₂. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 210~218.
- Keller, J. W., R. A. Morin, and T. J. Schaffernoth. 1974. Ozone disinfection pilot plant studies at Laconia, N.H. *J. Am. Water Works Assoc.* 66 : 730~733.
- Loeb, T., and N. D. Zinder. 1961. A bacteriophage containing RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 47 : 282~289.
- Mudd, J. B. R., Reavitt, A. Ongun, and T.T. McManus. 1969. Reaction of Ozone with amino acids and proteins. *Atmos. Environ.* 3 : 669~681.
- Oeschger, M.P., and D. Nathans. 1966. Differential in synthesis of bacteriophage-specific proteins in MS2-infected *Escherichia coli* treated with actinomycin. *J. Mol. Biol.* 22 : 235~247.
- 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-wafer and wastewater*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich.
- Pavoni, J.L., M.E. Tittlebaum, H.T. Spencer, M. Fleischman, C. Nebel, and R. Gottschling. 1972. Virus removal from wastewater using ozone. *Water Sewage Works.* 119 : 59~67.
- 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 E. G. Fochtman, R.G. Rice, and M.E. Browning (ed.), *Forum on ozone disinfection*. International Ozone Institute, Syracuse, N.Y.
- Shechter, H. 1973. Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. *Water Res.* 7 : 729~739.
- 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.
- Young, D.C., and D.G. Sharp. 1977. Poliovirus aggregates and their survival in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 168~177.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 2.** Electron Micrographs of bacteriophage f₂ negatively stained with 2% uranyl acetate. Control phage f₂ (A) were icosahedral shaped and filled with RNA. A few of them were broken into large pieces. The phage f₂ treated with 0.05mg/l ozone for 20 seconds (B) showed breakage of the particle. Some of them were still intact in shape and filled with RNA. The phage ozonated at 0.55mg/l for 60 seconds (C) were broken down into many protein subunits. The bar represents 0.2μm.
- Fig. 3.** Electron micrographs of the negative stained control phage f₂ (A) and phages ozonated at 0.05mg/l for 30 seconds(B) and at 0.55mg/l for 120 seconds(C), showing specific absorption to the pili of the host *E. coli* K-13. Almost all of the control phage f₂ were absorbed to the host pili. In the ozonated phages, only the intact phage particles reduced in number were absorbed to the host pili. The bar represents 0.2μm.



3A



B



C

