Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of the Sterilization Effect of a Plasma Generator with a Flexible Electrode Structure on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Chul Park, Hyeok Jae Lee

Department of Biomedical Laboratory Science, Gwangju Health University, Gwangju, Korea

황색포도알균과 녹농균에 대한 유연전극 구조를 갖는 플라즈마 발생기의 멸균효과 평가

박 철, 이혁재

광주보건대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received October 28, 2020
 Revised 1st November 13, 2020
 Revised 2nd November 14, 2020
 Revised 3rd November 24, 2020
 Accepted November 25, 2020

Key words

Flexible electrode
P. aeruginosa
S. aureus
 Sterilization

ABSTRACT

In this study, the sterilization ability of *S. aureus* and *P. aeruginosa* was evaluated using a plasma generator with a flexible electrode structure. Both strains were prepared at a concentration of 1.5×10^6 CFU/mL and inoculated and spread evenly on two medium plates. The medium were kept at a distance of 3 cm and 9 cm from the plasma generator and were plasma discharged from 30 sec to 10 minutes. The growth of colonies on the media, were subsequently compared with the control group. The mean colonies of *S. aureus* formed at a 3 cm distance were 9.2×10^2 (log value 2.96) CFU/mL for the 5 min discharge period and 8.0×10 (1.90) CFU/mL for the 10 min discharge period. When the medium was exposed for 5 min and 10 min at a 9 cm distance, the mean colonies of *S. aureus* formed were 2.16×10^3 (3.33) and 2.4×10^2 (2.38) CFU/mL, respectively. The medium containing *P. aeruginosa* kept at a 3 cm distance and exposed to 3, 5, 10-minute discharge, did not form any colonies. When kept at a 9 cm distance for 3 minutes, 6.0×10^2 (2.78) CFU/mL mean colonies were formed but no colonies were formed at exposure periods of 5 and 10 minutes. This enhanced sterilization effect was confirmed in experiments of *S. aureus* and *P. aeruginosa* using TiO_2 .

Copyright © 2020 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서 론

플라즈마(plasma)는 기체상태의 물질에 더욱 높은 에너지를 가하면 원자나 분자는 양전하를 띠는 양이온과 음전하인 전자로 이온화된 입자들이 만들어지게 되며, 이때 양이온의 수와 전자를 포함한 음전하를 띤 입자의 수는 거의 동일한 밀도로 분포되

어 전기적인 중성을 나타내는 하전입자의 집단을 형성하는데 이를 플라즈마라고 한다[1]. 대기권 내에서 일어나는 번개 등과 같이 자연에 존재하는 것과 형광등과 네온사인 등과 같이 인공적으로 만들어진 플라즈마를 우리 주변에서 흔하게 볼 수 있다.

플라즈마에서 초산소음이온(superoxide anion, O_2^-), 수산화기(hydroxyl radical, OH), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS) 등 다양한 활성화종들이 발생되며, 그 밖에 오존(O_3), 자외선(ultraviolet, UV) 등도 생성된다. 플라즈마에 의한 박테리아 살균은 오존, 활성산소종 등이 주요한 요인으로 알려져 있

Corresponding author: Hyeok Jae Lee

Department of Biomedical Laboratory Science, Gwangju Health University,
 Bungmun-daero 419 beon-gil, Gwangsan-gu, Gwangju 62287, Korea

E-mail: primo-uomo@ghu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8211-9352>

재료 및 방법

1. 연구대상

연구에서 사용한 그람양성알균인 *S. aureus* KCTC 1621은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양받았고 그람음성막대균인 *P. aeruginosa* KCCM 11321은 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganism, KCCM)로부터 분양받았다. 균체 현탁액을 KCTC, KCCM이 추천한 평판배지에 접종하여 배양한 후 균주의 오염여부를 확인하고 순수 배양된 균주를 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

유연전극 구조를 가진 플라즈마 발생기의 살균성능을 확인하기 위하여 Lee 등[11]에 의해 2020년 연구에 사용된 유전체장벽방전을 기본 형태로 하는 플라즈마 발생장치를 사용하였으나, 플라즈마 발생 고전압 전원장치는 AC 220V 전원을 DC 400V로 변환하는 2 kW급 AC-DC 정류기 모듈과 DC 400V를 9 kV로 변환하는 150 W급 고전압 전원모듈로 구성하였다. 또한 반응 chamber 체적을 9.7 L에서 180 mm×180 mm×180 mm (WHD) 규격의 5.8 L로 변경하였고 유연전극을 원형으로 가공한 SUS (steel use stainless) 가공물 내에 연속 평행구조 배치 방식에서 선형으로 가공한 SUS 가공물 외부에 고무 절연층을 추가하고 teflon 코팅하여 유연전극을 나선형으로 배치하였다. *S. aureus*와 *P. aeruginosa*의 colony 관찰을 위해 세균 현탁액 탁도(turbidity)를 측정하는 DensiCHECK™ Plus (Bio-merieux Inc, Missouri, USA)를 이용하여 McFarland Standard 0.50±0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) 농도로 세균 부유액을 조제하였다. phosphate-buffered saline (PBS)을 이용하여 100배 희석하여 1.5×10^6 CFU/mL 농도로 조제하였으며, autopipette을 이용하여 부유액 50 µL를 Blood agar plate와 Nutrient agar plate에 옮긴 후, 1회용 L-shaped spreader를 이용하여 배지 전체에 접종하였다. 플라즈마 발생기로부터 배지를 3 cm, 9 cm 떨어뜨리고 30초, 45초, 60초, 75초, 90초, 105초, 120초, 3분, 5분, 10분간 플라즈마를 방전시킨 후, 바로 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 배양하고 형성된 균의 colony를 자동 집락계수기인 IncuCount™ Automatic Colony counter (Revolutionary Sci, Minneapolis, USA)와 육안으로 확인하였다. 배지에 형성된 colony 수에 희석배수(20)를 곱하여 CFU/mL로 산정하였고, 각 균주에 대한 Log reduction (LR) 값을 확인하였다. LR은 $\log(A) - \log(B)$ 에 따라 계산하였는데 A

대[2]. 플라즈마를 다양한 산업분야에 적용하고 있으며, 근래에는 대기압 상태에서 플라즈마를 발생시켜 경제적, 기술적 효율성도 살린 저온 대기압 플라즈마 장치의 개발로 살균, 의학, 바이오 분야에서 폭 넓게 응용되고 연구가 활발히 진행되어 지고 있다[3, 4]. 특히 미생물 멸균에 플라즈마를 이용하는 기술은 그 가능성이 입증되어 여러 연구가 진행되어 오고 있다[5-7].

고압증기멸균법은 비용이 저렴하고, 비교적 단시간에 멸균이 가능하여 널리 사용되고 있으나, 열에 약한 기구의 변형과 금속의 경우에는 부식을 일으켜 기구의 내구연한을 단축시키므로, 사용에 제한이 따른다. EtO (ethylene oxide)를 사용하는 멸균법은 멸균온도가 낮아 변형되기 쉬운 의료기구 및 용품의 멸균이 가능하나, 호흡기와 피부를 통해 일정량 이상의 EtO gas가 인체에 흡수되면 신체적인 장애를 일으키므로, 잔류가스를 장시간에 걸쳐 완전히 제거해야만 하는 한계를 가지고 있어 안전성 및 경제적 측면에서 일반 중·소 의료기관에는 실용적이지 못하다는 단점도 있다[8]. 하지만 플라즈마에 의한 멸균법은 상대적으로 낮은 온도에서 멸균과정이 이루어져 열과 습기에 취약한 기구 및 재료의 멸균이 가능하고, 멸균 시간이 크게 단축될 뿐만 아니라 멸균 조작자에게도 안전하다[9, 10]. 안전성과 효율성 및 경제성을 모두 갖춘 새로운 멸균법으로 부상하여 이를 위한 대안으로 최근에 관심이 증대되고 있다.

Lee 등[11]에 의한 이전 연구에서는 대기압 상태에서 유전체장벽방전(dielectric barrier discharge, DBD)을 기본 형태로 하는 유연전극 케이블과 고전압 전원장치를 제작하여 플라즈마 발생장치 개발 등의 시스템 설계 및 제작에 중점을 두었고, 그람음성막대균인 *E. coli*를 이용하여 간략하게 살균기기로서의 응용성을 확인하였다. 이전 연구와 유연전극 구조 자체는 동일하지만, 대기압상태에서 미생물 살균에 영향을 줄 수 있는 중요한 요소인 플라즈마 방전전압과 반응 chamber 용적, 유연전극 배치 방식, 방전시간, 방전거리, 세균들을 이전 연구 조건과 다르게 설계하였다. 또한 추가로 광촉매제인 이산화티타늄(titanium dioxide, TiO_2)을 이용하여 살균에 효과가 있는지 확인하였다. 이전 연구보다 세포벽이 훨씬 두꺼우며, 항균제 내성균으로 알려진 그람양성알균인 *Staphylococcus aureus*와 기회감염균으로 의료기관에서 많이 분리되며, 항균제에 내성이 높은 그람음성막대균인 *Pseudomonas aeruginosa*로 박테리아의 살균효과를 관찰하였다.

는 대조군 생균수의 로그값, B는 시험군 생균수의 로그값이다. 로그값은 소수점 둘째자리까지 표기하였다.

실험은 동일 조건으로 5회 실시하였으며, 평균(Mean, M)과 표준편차(Standard deviation, SD)를 산출하였고 대조군은 동일하게 접종하고 플라즈마를 방전시키지 않았다.

스프레이타입의 광촉매제(Ecokimera, SKB Tech, Korea)인 TiO_2 를 사용하여 플라즈마 방전에 따른 살균효과를 확인하기 위해 1.5×10^6 CFU/mL 농도의 *S. aureus* 부유액 100 μL 를 tryptic soy agar plate (TSA)에 균일하게 접종하고 배지 위에 TiO_2 를 도포한 그물망을 위치시키고 플라즈마 발생기로부터 3 cm 이격하여 5분, 10분간 방전하였다. 또한 1.5×10^6 CFU/mL 농도의 *P. aeruginosa* 부유액 100 μL 를 TSA에 균일하게 접종하고 그 위에 TiO_2 를 도포한 그물망을 위치시키고 플라즈마 발생기로부터 3 cm 이격시켜 105초, 120초간 방전하였다. $35 \pm 1^\circ\text{C}$ incubator에서 24 ± 2 시간 배양하고, 형성된 균의 colony를 자동집락계수기를 이용하여 확인하였다. 세균이 증식한 경우 배지에 형성된 colony 수에 희석배수(10)를 곱하여 CFU/mL로 산정하였고, 각 균주에 대한 LR 값을 확인하였다.

LR은 $\log(A) - \log(B)$ 에 따라 계산하였는데 A는 대조군 생균수의 로그값, B는 시험군 생균수의 로그값이다. 로그값은 소수점 둘째자리까지 표기하였다. 동일 조건으로 5회 실시하였으며, 대조군은 동일하게 도말하고 플라즈마를 방전시키지 않았다.

결 과

1. 3 cm 거리에서 방전 시간에 따른 *S. aureus*의 colony 형성

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 균 부유액 50 μL 을 BAP에 접종하고 플라즈마 발생기에서 3 cm 이격하여 방전 후 형성된 colony를 관찰하였다(Table 1, Figure 1). 120초에서 178 ± 17 (3.56×10^3 CFU/mL), 3분에서는 98 ± 13 (1.96×10^3 CFU/mL), 5분에서는 46 ± 10 (9.2×10^2 CFU/mL), 10분에서는 4 ± 3 (8.0×10 CFU/mL)으로 확인되었다.

2. 9 cm 거리에서 방전 시간에 따른 *S. aureus*의 colony 형성

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 균 부유액 50 μL 을 BAP에 접종하고 플라즈마 발생기에서 9 cm 이격하여 방전 후 형성된

Table 1. Number of colony and log value of *S. aureus* after plasma discharge

	Distance	Discharge time	Control log value	Number of colonies	Log value	LR
<i>S. aureus</i>	3 cm	3 min	6.18	1.96×10^3	3.29	2.89
		5 min		9.2×10^2	2.96	3.22
		10 min		8.0×10	1.90	4.28
	9 cm	3 min	6.18	4.28×10^3	3.63	2.55
		5 min		2.16×10^3	3.33	2.85
		10 min		2.4×10^2	2.38	3.80

Abbreviation: LR, log reduction.

Figure 1. The colonies of *S. aureus* formed after plasma discharge at 3 cm distance.

Figure 2. The colonies of *S. aureus* formed after plasma discharge at 9 cm distance.

Table 2. Number of colony and log value of *P. aeruginosa* after plasma discharge

	Distance	Discharge time	Control log value	Number of colonies	Log value	LR
<i>P. aeruginosa</i>	3 cm	105 sec	6.18	1.18×10^3	3.07	3.11
		120 sec		4.2×10^2	2.62	3.56
		3, 5, 10 min		0	0	6.18
	9 cm	120 sec	6.18	7.68×10^3	3.89	2.29
		3 min		6.0×10^2	2.78	3.4
		5, 10 min		0	0	6.18

colony를 관찰하였다(Table 1, Figure 2). 120초까지는 계수가 어려웠고 3분에서 214 ± 13 (4.28×10^3 CFU/mL), 5분에서는 108 ± 10 (2.16×10^3 CFU/mL), 10분에서는 12 ± 4 (2.4×10^2 CFU/mL)로 확인되었다.

3. 3 cm 거리에서 플라즈마 방전 시간에 따른 *P. aeruginosa*의 colony 형성

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 균 부유액 50 μ L를 Nutrient agar plate에 접종하고 플라즈마 발생기에서 3 cm 이격하여 방전 후 형성된 colony를 관찰하였다(Table 2, Figure 3). 105초에서는 59 ± 6 (1.18×10^3 CFU/mL), 120초에서는 21 ± 5 (4.2×10^2 CFU/mL)가 확인되었으며, 3분, 5분, 10분에서는 colony가 형성되지 않았다.

4. 9 cm 거리에서 플라즈마 방전 시간에 따른 *P. aeruginosa*의 colony 형성

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 균 부유액 50 μ L를 Nutrient agar plate에 접종하고 플라즈마 발생기에서 9 cm 이격하여 플

라즈마 방전 후 형성된 colony를 관찰하였다(Table 2, Figure 4). 3분에서는 30 ± 10 (6.0×10^2 CFU/mL), 5분, 10분에서는 colony가 형성되지 않았다.

5. TiO_2 를 이용한 플라즈마 방전 시간에 따른 colony 변화

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 균 부유액 100 μ L를 TSA에 균일하게 접종하고 그 위에 TiO_2 를 도포한 그물망을 위치시키고 플라즈마 발생기로 부터 3 cm 이격시켜 5분, 10분간 방전시킨 *S. aureus*와 105초, 120초간 방전시킨 *P. aeruginosa* 결과는 Table 3, Figures 5~7과 같았다. *S. aureus*는 5분 방전에 17 ± 6 (1.7×10^2 CFU/mL)가 관찰되었고 10분에서는 colony가 형성되지 않았다. *P. aeruginosa*는 105초에서 3 ± 1 (3.2×10 CFU/mL)가 관찰되었고, 120초에서는 colony가 형성되지 않았다.

고 찰

상압 플라즈마의 발생은 대기압 하에서 여러 가지 방법의 전

Figure 3. The colonies of *P. aeruginosa* formed after plasma discharge at 3 cm distance.

Figure 4. The colonies of *P. aeruginosa* formed after plasma discharge at 9 cm distance.

Table 3. Number and log value of living bacteria after plasma discharge using photocatalyst TiO_2

	Discharge time	Control	Log value	Number of colonies	Log value	LR
<i>S. aureus</i>	5 min	1.5×10^6	6.18	1.7×10^2	2.23	3.95
	10 min	1.5×10^6		0	0	6.18
<i>P. aeruginosa</i>	105 sec	1.5×10^6		1.6×10	1.20	4.98
	120 sec	1.5×10^6		0	0	6.18

기방전을 이용하며, 플라스마를 구현하는 방전형태에 따라 아크방전(arc discharge), 코로나방전(corona discharge), 유전체장벽방전(DBD), 마이크로웨이브방전(microwave discharge) 등이 있다. 이중에서 유전체장벽방전은 시스템이 비교

적 간단하면서도 고출력 방전이 가능하고 복잡한 펄스 전력 공급기가 없어도 쉽게 방전할 수 있어 산업체 전반에 널리 이용되고 있다[1, 12]. 유전체장벽방전은 기본적으로 두 전극의 한쪽 또는 양쪽 전극의 표면을 세라믹이나 유리 등의 유전체(dielectric)

Figure 5. The colonies of *S. aureus* formed on tryptic soy agar plates by plasma discharge time (a: photocatalyst TiO_2 is not used, b: photocatalyst TiO_2 is used).

Figure 6. The colonies of *P. aeruginosa* formed on tryptic soy agar plates by plasma discharge time (a: photocatalyst TiO_2 is not used, b: photocatalyst TiO_2 is used).

Figure 7. The inactivation of *S. aureus* and *P. aeruginosa* formed on tryptic soy agar plates by plasma discharge time using photocatalyst TiO_2 .

가 덮거나, 삽입되는 형태를 기본으로, 고전압 전극을 평판형 또는 선형으로 제작하여 교류전압을 인가하면 전극과 유전체 간극 사이에서 방전이 일어나 플라즈마가 발생된다. 일반적으로 고전압 전극과 접지전극 사이에 유전체가 위치하고 있으므로, 유전체 특성에 따라 플라즈마 특성도 바뀌게 되며, 많은 양의 라디칼들이 생성된다.

플라즈마 방전에 생성되는 다양한 활성화종들은 미생물의 세포벽이나 세포막을 통해 확산되면서 주요 구성성분인 다당류, 지질, 단백질 그리고 세포 내의 DNA와 같은 거대 분자들과 반응하여 구조를 변화시켜 세포를 손상시키는 것으로 보고되었다 [13-16].

일반적으로 대기압 저온 플라즈마 방전에 Ar, He, N_2 등과 같

은 다양한 종류의 기체가 사용되고 있으며, 살균 목적으로는 반응기 내부에 H_2O_2 , O_2 등이 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 Ar, He과 같은 불활성 기체를 사용하거나, 반응기 내부에 H_2O_2 와 같은 촉매제를 이용하지 않는 대기압 상태에서 유연전극 구조를 가진 플라즈마 발생기에 고전압을 인가하여 플라즈마를 발생시키는 형태이다. 플라즈마의 특성과 주입하는 방전가스의 종류나 양에 따라 발생하는 radical의 종류와 농도가 달라지며, 이에 따라 플라즈마 반응기의 성능도 달라진다[17]. 이번 연구에서는 Lee 등[11]이 실시했던 연구와 달리 플라즈마를 발생시키기 위한 방전 인가 전압을 2.5 kV에서 9 kV로 변경하였고 이에 알맞게 유연전극의 길이 등을 재설계하였다. 인가되는 방전 전압에 따라 플라즈마 반응이 달라졌다. 2.5 kV보다 플라즈마

반응이나 생성되는 오존농도가 더 높았으나, 높은 전압에 따른 유전전극의 절연문제로 인하여 발화가 발생하면서 전극손상이 빈번하게 발생되었다. 이처럼 방전전압이 달라짐에 따라 유전전극의 설계 사양도 달라짐을 확인하였다. Son과 Lee [12, 18]의 연구에 따르면 입력전압에 따라 플라즈마 방전에 영향을 미친다고 보고하였다.

플라즈마 방전 시 방출된 라디칼이나 이온을 확인하고자 광방출분광진단기에 의해 나타난 스펙트럼을 분석한 결과 생성된 활성화종들 중에는 O_2^- , OH 같은 활성산소종과 N_2^- , N_2^+ 와 같은 활성질소종들이 주로 생성됨을 확인할 수 있었는데 이는 대기압 상태에서 이루어진 방전 결과로 생각된다. 또한 고농도의 오존이 생성됨을 확인할 수 있었다. 대기압 유전체장벽방전의 경우 2개의 전극사이에 유전체가 삽입되고 교류형 고전압을 인가하면 전극과 유전체 사이에서 방전이 일어나고 이 간극 사이에서 생성된 산소라디칼(O^*)이 공기 중의 다른 산소분자(O_2)와 결합하여 활성종인 오존이 생성된다[19]. 오존을 발생시키는 방법은 전기분해, 광화학식 등의 방법이 있으나, 유전체장벽방전을 이용한 플라즈마 방전은 다양한 라디칼들을 생성하는 동시에 오존의 생성량이 크므로 오존 생성 기술로도 이용된다[20].

오존은 강한 산화력과 살균력을 가지고 있으며, 반감기가 매우 짧고 열과 자외선, 촉매 등에 의해 간단하게 분해되어 최종적으로 산소로 환원되기 때문에 다른 화학약품과는 달리 유해 반응 생성물을 잔류시키지 않아 다른 살균제보다 적용범위가 넓다. 또한 부가적인 화학제의 첨가 없이 미생물을 빠르게 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 플라즈마 방전에 의해 chamber 내에 생성되는 오존의 농도를 측정하였다. 오존은 산소보다 무겁기 때문에 chamber 바닥에서부터 축적되므로 바닥에서 약 3 cm 정도의 높이에서 측정하였다. 생성되는 오존 농도는 플라즈마 방전 시간에 비례하게 상승하였는데 방전 후 약 3분 정도에 1,000 ppm까지 도달하였다. 오존계측기가 최대 1,000 ppm까지만 측정 가능하여 3분 이후의 오존농도에 대해서는 정확히 확인할 수 없었다. Son과 Lee [12, 18]의 연구에 의하면 상압 플라즈마 반응기에서 생성되는 오존의 농도는 혼합기체 내의 산소 비율과 인가전력이 증가할수록 오존 농도도 증가하는 경향을 보였다고 하였다. Ryu 등[21]은 대기압 유전체장벽방전 플라즈마 처리에서 인가전력, 노출 시간이 증가될수록 활성종인 오존, 일산화질소 등의 농도가 증가된다고 하였다. 이번 연구에서도 Lee 등[11]의 연구보다 플라즈마 방전 전압을 높였을 때 생성되는 오존의 농도는 더 높았다. 따라서 고농도의 오존을 생성하기 위해서는 가압적 산소 비율이 높은 혼합기체와 높은 인가전력이 필요할 것으로 생각된다. Son과 Lee [12]는 살균효과를 극대화시

키기 위해서는 오존 발생 농도를 높이거나 오존과의 살균 유효 시간을 늘리는 것이라 하였다.

방전 전압이 이전 연구보다 높아졌으므로, 플라즈마 방전에 따른 온도를 배지가 놓이는 부위에서 측정하였다. 방전 전 chamber 내의 온도는 20.3°C, 방전에 따른 플라즈마 발생기 자체 온도 변화는 5분에 52.4°C, 10분에는 61.9°C였고, chamber 내 온도는 1분에 22.2°C, 5분에 25.3°C, 10분에는 28.4°C로 변화됨을 확인하였다. 방전에 따른 플라즈마 발생기 온도는 약 41.6°C 정도 상승하였고 chamber 내 온도는 약 8.1°C 상승하였다. Son과 Lee [12]의 연구에서도 초기에 측정된 실내 온도는 27°C, 5분 후에 40°C, 10분 후에는 43°C였다고 보고하였다. Ryu 등[21]의 연구에서도 플라즈마 방전 시간이 길어질수록 온도가 증가되어 10분까지 방전하였을 경우 52°C까지 상승하였다. 발생기에서 발생한 열에 의한 온도 변화는 작아서 직접적으로 실험 균주에 작용했다고 보기는 어렵다. 따라서 열에 의한 살균 효과는 배제되어도 될 것으로 생각되며, 방전으로 생성된 여러 라디칼 작용에 기인된 것으로 사료된다.

살균능 확인을 위해 두 균주 모두 1.5×10^6 CFU/mL 농도의 부유액으로 조제하여 배지에 도말 후, 플라즈마 발생기로부터 3 cm 이격하여 15초 간격으로, 30초부터 120초까지 그리고 3분, 5분, 10분 동안 플라즈마 처리하고 형성된 colony를 대조군과 비교하였다. *S. aureus*는 3 cm 120초에서 3.56×10^3 , 3분에서 1.96×10^3 , 5분에서 9.2×10^2 , 10분에서는 8.0×10 CFU/mL이 형성되어 플라즈마 방전시간이 증가할수록 colony 형성이 감소하였다. 9 cm 이격하여 동일하게 방전시켰을 때 120초까지는 계수할 수 없었고, 3분에서 4.28×10^3 , 5분에서 2.16×10^3 , 10분에서는 2.4×10^2 CFU/mL를 보였다. *P. aeruginosa*는 3 cm 105초에서는 1.18×10^3 , 120초에서 4.2×10^2 CFU/mL이 형성되었으며, 3분, 5분, 10분에서는 colony가 형성되지 않았다. 9 cm 이격하여 동일하게 방전시켰을 때 120초까지는 계수할 수 없었고, 3분에서 6.0×10^2 , 5분, 10분에서는 colony가 형성되지 않았다. 실험 결과처럼 두 균주 모두 방전시간이 길수록 형성되는 colony 수가 적었고, 플라즈마 발생기로부터 배지 거리가 멀어질수록 살균력이 현저히 떨어져 colony 형성에 많은 차이를 보였다. 또한 세포벽이 두꺼운 그람양성균보다는 그람음성균의 살균력에 효과적임을 확인할 수 있었다. 플라즈마에 노출되는 시간이 증가하게 되면 미생물의 손상 정도는 증가하고 그에 따라 사멸률이 증가하는 것으로 보고하였다[22-24]. 기체의 이온화, 여기, 해리 등의 과정이 더욱 빈번히 일어나기 때문에 활성종의 발생과 농도가 증가한 결과로 살균력이 증대되었을 것으로 생각된다. 추가로 *S. aureus*를

1.5×10^6 CFU/mL 농도의 부유액으로 조제하여 BAP에 접종하고 15분, 20분, 25분 동안 플라즈마를 방전시켜 colony 형성을 관찰하였다. 방전 5분까지 급격히 colony 형성이 감소하고 10분 정도까지는 완전히 감소하며, 15분 이후에는 모두 사멸됨을 확인하였다. Lee 등[23]의 연구에서도 노출시간에 따른 사멸률 경향은 5분의 플라즈마 노출시간까지 급격히 증가하고 이후 완만한 증가를 보였다. Kim 등[25]의 비열 대기압 유전체장벽 방전 플라즈마를 이용한 *E. coli*의 살균평가에서도 30분에 41%, 1시간에 79%, 2시간에 100% 사멸률을 보였다.

광촉매제는 빛을 에너지원으로, 촉매반응을 촉진시켜 각종 세균 및 오염물질을 분해 시켜주는 물질이다. 광촉매로 이용될 수 있는 다양한 물질 중에서 주로 TiO_2 가 이용되는데, 이는 높은 산화·환원력과 더불어 광촉매능이 우수하고, 화학적으로 매우 안정하고 광활성이 우수하며, 독성이 없어 인체에 무해한 물질로 알려져 다양한 분야에서 이용되고 있다[26]. TiO_2 에 자외선이 조사되면 표면에서 광 여기가 발생하여 표면의 전자가 산소와 반응하여 강력한 산화력을 가진 O_2^- 와 OH가 생성된다. 생성된 OH는 산화 분해능이 강력하기 때문에 박테리아를 분해한다[27]. 이는 염소나 오존보다 산화력이 높아 살균력이 뛰어나다. 광촉매 반응을 유도하기 위해서는 250~380 nm 파장 영역의 자외선이 필요하다. 본 연구에 사용된 플라즈마 발생기에서 방출되는 스펙트럼을 OES 방식으로 측정한 결과 300~400 nm 자외선 영역에서 방출 강도가 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 두 균주 모두 1.5×10^6 CFU/mL 농도의 부유액으로 조제하여 광촉매제인 TiO_2 를 이용하여 살균력을 확인하였다. *S. aureus*가 접종된 배지를 플라즈마 발생기에서 3 cm 이격하여 5분 방전시켰을 때 1.7×10^2 CFU/mL의 colony가 형성되어 LR은 3.95로 99.988%의 사멸률을 보였고, 10분간 방전시켰을 때는 모두 사멸되어 colony가 형성되지 않았다. *P. aeruginosa*는 105초 방전했을 때 1.6×10 CFU/mL의 colony가 형성되어, LR은 4.98로 99.998%의 사멸률을 보였으며, 120초 방전시켰을 때는 모두 사멸되어 colony가 형성되지 않았다. Yoon 등[28]에 의한 광촉매와 UVA를 이용한 *E. coli* 살균실험에서도 UVA 단독 사용할 때보다 광촉매를 동시에 사용했을 때 약 30% 높은 사멸률을 보였다. TiO_2 와 UV를 이용한 *Pseudomonas sp.*에 대한 광화학 살균실험에서 TiO_2 농도가 증가함에 따라 살균력이 증가하였다[29]. 본 연구에서도 플라즈마만 방전시켰을 때보다 광촉매제인 TiO_2 를 보조적으로 사용하여 방전시켰을 때 살균능력이 향상됨을 확인할 수 있었으며, 이는 플라즈마 방전에 의해 생성된 오존과 함께 광촉매에 의해 생성된 OH에 의해 살균력이 증대된 것으로 생각된다. 살균 효능에 가장 좋은 TiO_2

적정 농도에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

현재 일반적으로 시판되고 있는 제품들과 의료기관에서 주로 사용하고 있는 저온 플라즈마 방식의 멸균기는 chamber 내부를 진공상태로 유지시키거나, 과산화수소와 같은 산화제에 플라즈마를 방전시켜 멸균을 시키는 제품들이 대부분이다. 그러나 연구에 사용된 유연전극 구조의 플라즈마 발생기를 이용한 미생물 살균 시스템은 순수한 공기만을 이용하여 방전함으로써 시스템 구성이 간단하고 촉매제를 사용하지 않으므로 기존 제품들에 비해 경제적이며, 저온에서 짧은 시간에 살균이 이루어져 종래 살균법의 단점을 보완할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 유연전극을 편조방식으로 배치 제작이 가능하므로, 고농도의 오존보다는 인체에 무해한 다른 라디칼에 의한 살균 연구가 선행된다면 병원 내 기구, 물품 등을 손쉽게 멸균할 수 있을 것이며, 일반가정에서도 사용할 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

본 연구에서 유연전극 구조의 플라즈마 발생기를 이용하여 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*의 살균 능력을 평가하였다. 두 균주 모두 1.5×10^6 CFU/mL 농도의 부유액으로 조제하여 배지에 도말 후, 플라즈마 발생기로부터 3 cm, 9 cm 떨어뜨려 15초 간격으로, 30초부터 120초까지 그리고 3분, 5분, 10분 동안 플라즈마를 방전하여 배지에 형성된 colony를 대조군과 비교 하였다. 3 cm 떨어뜨린 배지에서 형성된 *S. aureus*의 평균 집락은 5분 방전했을 때 9.2×10^2 (log 값 2.96) CFU/mL 이었고, 10분 방전했을 때는 8.0×10 (1.90) CFU/mL이 형성되었다. 9 cm 떨어뜨린 배지에 5분 또는 10분 동안 방전했을 때 형성된 *S. aureus*의 평균 집락은 각각 2.16×10^3 (3.33)과 2.4×10^2 (2.38) CFU/mL이 형성되었다. 3 cm 떨어뜨려 3분, 5분, 10분간 방전하였을 때 *P. aeruginosa*는 완전히 사멸되어 colony가 형성되지 않았다. 9 cm 떨어뜨려 3분 방전했을 때 *P. aeruginosa*는 6.0×10^2 (2.78) CFU/mL이 형성되었으나, 5분, 10분간 방전하였을 때는 완전히 사멸되어 colony가 형성되지 않았다. 또한 TiO_2 를 이용한 *S. aureus*와 *P. aeruginosa* 실험에서 더 나은 살균 효과를 확인할 수 있었다.

Acknowledgements: This paper was supported by Gwangju Health University in 2018 (3018008).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Park C, Professor; Lee HJ, Professor.

REFERENCES

- Ryu YH, Uhm HS, Park GS, Choi EH. Sterilization of *Neurospora crassa* by noncontacted low temperature atmospheric pressure surface discharged plasma with dielectric barrier structure. *J Korean Vac Soc*. 2013;22:55-65. <https://doi.org/10.5757/JKVS.2013.22.2.55>
- Gaunt LF, Beggs CB, Georgiou GE. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2006;34:1257-1269. <https://doi.org/10.1109/TPS.2006.878381>
- von Woedtke TH, Reuter S, Masur K, Weltmann KD. Plasma for medicine. *Phys Rep*. 2013;530:291-320. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2013.05.005>
- Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym*. 2008;15:503-533. <https://doi.org/10.1002/ppap.200700154>
- Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process*. 2006;26:425-442. <https://doi.org/10.1009/PLASMA.2006.1707305>
- Daeschlein G, Woedtke TV, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jnger M. Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment. *Plasma Process Polym*. 2010;7:224-230. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900059>
- Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process*. 2007;27:163-176. <https://doi.org/10.1007/s11090-007-9048-4>
- Steelman VM. Ethylene oxide. The importance of aeration. *AORN J*. 1992;55:773-775.
- Laroussi M, Lu X. Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications. *Appl Phys Lett*. 2005;87:113902. <https://doi.org/10.1063/1.2045549>
- Moisan M, Barbeau J, Crevier MC, Pelletier J, Philip N, Saoudi B. Plasma sterilization methods and mechanisms. *Pure Appl Chem*. 2002;74:349-358. <https://doi.org/10.1351/pac200274030349>
- Lee HJ, Song HJ, Song MJ. A study on the effect of microbial sterilization using plasma generator with a flexible electrodes structure. *J Korean Inst Electr Electron Mater Eng*. 2020;33:71-78. <https://doi.org/10.4313/JKEM.2020.33.1.71>
- Son HH, Lee WG. Discharge properties of torch-type atmospheric pressure plasma and its local disinfection of micro-organism. *Korean Chem Eng Res*. 2011;49:835-839. <https://doi.org/10.9713/KCER.2011.49.6.835>
- Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom*. 2004;233:81-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.11.016>
- Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R, Joost van der Mullen. Gas discharge plasmas and their application. *Spectrochim Acta B*. 2002;57:609-658. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00406-2)
- Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, et al. Plasma medicine: possible application in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010;8:968-976. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x>
- Takenaka K, Okumura Y, Setsuhara Y. Plasma interactions with organic materials in liquid through plasma/liquid interface. *Jpn J Appl Phys*. 2013;52:1-5. <https://doi.org/10.7567/JJAP.52.11NE04>
- Du CM, Shi TH, Sun YW, Zhuang XF. Decolorization of acid orange 7 solution by gas-liquid gliding arc discharge plasma. *J Hazard Mater*. 2008;154:1192-1197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.032>
- Son HH, Lee WG. Treatment of Ar/O₂ atmospheric pressure plasma for sterilization. *Appl Chem Eng*. 2011;22:261-265.
- Kwon YH, Park HM, Song HG, Park WZ. Ozone production characteristics of the DBD discharge the electrode shape at the same electrode surface area. *J Korean Inst Illum Electr Install Eng*. 2016;30:71-77. <https://doi.org/10.5207/JIEIE.2016.30.2.071>
- Falkenstein Z. Application of dielectric barrier discharges. *Proceedings of the 12th International Conference on high-power particle beams*. 1998:117-120. <https://doi.org/10.1109/beams.1998.822399>
- Ryu YH, Uhm HS, Park GS, Choi EH. Sterilization of *neurospora crassa* by noncontacted low temperature atmospheric pressure surface discharged plasma with dielectric barrier structure. *J Vac Sci*. 2013;22:55-65. <https://dx.doi.org/10.5757/JKVS.2013.22.2.55>
- Jo JO, Lee HW, Mok YS. Sterilization of scoria powder by corona discharge plasma. *Appl Chem Eng*. 2014;25:386-391. <https://doi.org/10.14478/ace.2014.1046>
- Lee SJ, Song YS, Park YR, Ryu SM, Jeon HW, Eom SH. Sterilization of food borne pathogenic bacteria by atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *J Food Hyg Saf*. 2017;32:222-227. <https://doi.org/10.13103/jfhs.2017.32.3.222>
- Kim JE, Kim IH, Min SC. Microbial decontamination of vegetables and spices using cold plasma treatments. *Korean J food Sci Technol*. 2013;45:735-741. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2013.45.6.735>
- Kim KY, Paik NW, Kim YH, Yoo KH. Bactericidal efficacy of non-thermal DBD plasma on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Korean Soc Occup Environ Hyg*. 2018;28:61-79. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2018.28.1.61>
- Athanasekou CP, Moustakas NG, Morales-Torres S, Pastrana-Martinez LM, Figueiredo JL, Faria JL, et al. Ceramic photocatalytic membranes for water filtration under UV and visible light. *Appl Catal B: Environ*. 2015;178:12-19. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.11.021>
- Vautier M, Guillard C, Herrmann JM. Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of indigo carmine. *J Catal*. 2001;201:46-59. <https://doi.org/10.1006/jcat.2001.3232>
- Yoon YH, Nam SH, Joo JC, Ahn HS. Photocatalytic disinfection of indoor suspended microorganisms (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spore) with ultraviolet light. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*. 2014;15:1204-1210. <https://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2014.15.2.1204>
- Kim TY, Na JH, Min BJ, Cho SY. A study on sterilization of *Pseudomonas sp.* using titanium dioxide photocatalyst. *J Adv Eng and Tech*. 2011;4:129-133. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2014.15.2.1204>