

비열 유전체장벽방전 플라즈마 발생기의 풍량에 따른 결핵균 성장억제 효능

손은순^{1,3} · 김용희² · 백남원² · 이일영² · 김은화² · 박해룡³ · 이종석^{1*}

¹(재)국제결핵연구소, ²(주)신영에어텍 공기과학연구소, ³경남대학교 바이오융합학부

Effect of Non-thermal Dielectric Barrier Discharge Plasma by Air Volume against *Mycobacterium Tuberculosis*

Eun-Soon Son^{1,3} · Yonghee Kim² · Namwon Paik² · Ilyong Lee² · Eunhwa Kim² · Hae-Ryoung Park³ · Jongseok Lee^{1*}

¹International Tuberculosis Research Center

²Institute of Air Science, Shinyoung Airtech

³School of Bioconvergence, Kyungnam University

ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD) plasma by air volume against *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Methods: Plasma generators (TB-300, Shinyoung Airtec, Seongnam-si, Korea) were operated in a 2A type biosafety cabinet. The plasma generator was set to a wind flow rate of 14 (80 m³/h), 18 (110 m³/h), and 22 (150 m³/h), and exposure times were set to 0 hours, 3 hours, 6 hours, 9 hours, and 24 hours.

Results: The inhibitory effects of plasma at air volume 14 with prolonged exposure time of three hours was 20%, 64% at six hours, 82.3% at nine hours, and 100% after 24 hours exposure. With air volume of 18, the inhibitory effects upon plasma exposure were 36% for three hours, and 100% from 24 hours. Greater air volume resulted in greater inhibition of tuberculosis bacterial growth. In particular, the maximum inhibitory effect (100%) was shown in air volume of 22 (150 m³/h) after three hours of plasma exposure.

Conclusions: The results showed the correlating inhibitory effects of plasma on the growth of MTB in combination with increasing plasma exposure time and air volume.


Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, plasma, Non-thermal dielectric barrier discharge


I. 서 론


우리나라의 결핵 발생율이 경제협력개발기구 (Organization for economic co-operation and development, OECD) 가입국 평균인 십만 명당 12.9 명보다 높은 97명이고, 사망률 또한 OECD 가입국 중 여전히 1위에 머물고 있다(WHO, 2018).


결핵균은 활동성 결핵 환자가 기침이나 재채기, 대화 하는 동안 공기 중에 퍼지게 된다. 이때 공기 중에 있는 결핵균은 호흡기를 통해서 감염을 일으키는 질환이다 (Islam et al., 2017). 이 질환은 공기로 퍼져나가며, 폐를 통해 감염이 시작되고 이외의 우리 몸의 여러 장기 등을 침범하여 각 기관에 결핵을 일으킨다(Tomioka & Namba 2006). 대부분의 결핵균 감염자들은 증상이 없


*Corresponding author: Jongseok Lee, Tel: 055-246-1131, E-mail: cosmosljs@gmail.com
International Tuberculosis Research Center, 236 Gaposunhwan-ro, Masanhappo-hu, Changwon-si, Gyeongsangnam-do, 51755
Received: June 19, 2019, Revised: July 20, 2019, Accepted: August 25, 2019


 Eun-Soon <https://orcid.org/0000-0003-1732-1938>


 Namwon Paik <http://orcid.org/0000-0001-5411-1871>

 Eunhwa Kim <https://orcid.org/0000-0002-6636-7740>

 Jongseok Lee <http://orcid.org/0000-0002-4340-9856>

 Yonghee Kim <http://orcid.org/0000-0003-3037-9122>

 Ilyong Lee <https://orcid.org/0000-0001-7190-1816>

 Hae-Ryoung Park <https://orcid.org/0000-0003-2168-7393>

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

으며, 면역력이 약해졌을 때 일부분의 사람들에게 결핵이 발생한다(Bird et al., 1996). 결핵을 효과적으로 관리하기 위해서는 예방, 진단, 치료 등 이 복합적으로 고려되어야 한다. 이 중에서 예방은 백신을 이용한 관리방법이 채택되고 있으나, 그에 앞서 결핵균이 존재할 수 있는 환경을 회피할 수 있는 방법을 채택하는 것이 필요하다.

환경 내에 존재하는 결핵균 및 전염성 세균 등의 감염을 예방하기 위해 과산화수소(Kyi et al., 1995), 질산은 살균소독액 등 화학제재를 공기 중에 분사하여 소독하는 방법들이 사용되고 있으나, 화학제재의 경우는 인체에 유해하여 일상생활에 적용하기는 어렵다(Huahua et al., 1991). 최근에는 플라즈마 저온 멸균기 등을 사용하여 살균하는 방법 등이 사용되고 있다. 플라즈마 살균기는 그람양성, 그람음성 세균, 바이러스 곰팡이 등에 탁월한 살균효과를 나타냄으로 미용, 치료 등에도 유용하게 사용되고 있다(Lloyd et al., 2010). 또한 농식품 분야에서도 플라즈마 기능을 이용하여 살균, 촉매기능을 통해 식품 유통기간 연장에 활용하고 있다(Kim et al., 2013, Yoo, 2015). 플라즈마는 이온화된 기체 중 집단적인 움직임을 보이는 극성과 비극성의 입자들로 이루어진 기체를 말하며 매우 큰 반응성을 가진다. 이러한 특성 때문에 플라즈마는 미생물의 세포막과 DNA를 파괴하여 살균한다고 알려져 있고(Venezia et al., 2008), 플라즈마 기술을 활용한 다양한 의료가 개발이 될 것으로 기대하고 있다.

본 연구에서는 비열유전체장벽 대기압 방전플라즈마(TB300)에서 발생하는 플라즈마에 의한 공기 중에 존재하는 결핵균 저해 효과를 확인하고, 더불어 풍량에 따라 결핵균 성장 억제효과를 평가하여 생활환경 내에서의 감염예방에 활용하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 연구 대상

1) 결핵 균주 배양

본 연구에서 수행한 모든 실험은 약독화된 결핵균주 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra(ATCC 25177)로 국제결핵연구소(Changwon, Korea)에서 보유하고 있는 것으로 사용하였다.

2) 플라즈마 장치

결핵균의 성장억제 효능에 의한 정량적인 감소여부를

측정할 목적으로 선택한 것은 비열 유체장벽방전 플라즈마 발생기(non-thermal DBD plasma generator, Model; TB-300, Shinyoung Airtech, Korea)을 이용하였고, 기기 운용 조건은 plasma 발생량을 “Turbo”에 위치하였다. 이때 풍량의 조건은 기체의 약(14; 80 m³/h),중(18; 110 m³/h),강(22; 150 m³/h)으로 조정 후 실험을 실시하였다.

2. 연구 방법

1) 균주 배양 및 접종

결핵균은 10% OADC가 포함된 결핵균 배양용 액체 배지(Middlebrook 7H9 broth, BD, NJ, USA)에서 최소 3주간 배양하여 사용하였다.

본 연구의 실험에서는 균액 탁도(turbidity)를 McFarland 0.50($1.5 \times 10^8 \sim$ CFU/ml)기준으로 하였다(Bollela et al., 1999). 이때 사용된 현탁액용매는 무기용액으로 비교적 오랫동안 균이 생존할 수 있지만, 증식하지 않는 PBS용액(gibco)으로 탁도 0.50(colorimeter Densi. CHEK, BioMe'rieux, Etoile, France)에 맞추어 원액을 준비하였다. 준비된 원액을 단계별로 희석하여, 37℃배양기(WIS-20, Daihan, Korea)에서 15분 정치 후, 0.1 ml을 고체배지(Middlebrook 7H10 agar, BD, NJ, USA)에 접종하고, 1회용 스프레더(spreader)로 도말하여 실험에 사용하였다(Sutton, 2011; Fontes et al., 2012).

2) 플라즈마 노출

결핵균이 접종된 고체 배지는 BSC(Biohazard safety cabinet, JSCB-1800SB, Korea) 내에서 뚜껑을 열어 플라즈마에 노출이 될 수 있도록 하였다. 풍량을 중(18; 110 m³/h)으로 고정하고 플라즈마 발생기(TB-300, Shinyoung Airtec, Seongnam-Si, Korea)를 배지로부터 1피트(30.4 cm)거리에 위치시켰으며, 플라즈마의 노출 시간은 비노출(0시간 노출)과 3시간, 6시간, 9시간, 24시간으로 하고, 풍량을 약(14; 80 m³/h), 중(18; 110 m³/h), 강(22; 150 m³/h)으로 하여 플라즈마에 노출 시켰다. 플라즈마 노출이 끝난 배지는 뚜껑을 닫고 생물안전팩에 밀봉 후 37℃배양기에서 4주간 배양하였다.

3) 집락 계수(colony count)

플라즈마 효율성의 미생물학 검증은 플라즈마에 의해

서 유도된 미생물 살균 효과의 평가는 생화학 확산어세이(assay)에 의해서 이루어진다. 즉, 플라즈마로 처리된 미생물이 배양액이나 배지에서 자라면서 형성하는 집락수를 세어서 오염제거 및 살균효과를 평가한다. 이때 단위는 CFU(colony forming unit)를 사용하였다. 실험시 플라즈마발생기와 7H10배지와는 플라즈마의 잠재적 영역인 1피트(30.4 cm)이내에서 실시하였으며, 플라즈마 노출은 같은 조건으로 최소 3회 이상 반복하였다. 노출시킨 결핵균은 각각 37°C에서 3-4주 배양 후 생성된 집락수(colony counter: SCIO, finetec, Korea)를 사용하여 집락 형성 단위인 CFU/ml를 계수하였다. 감소효과 평가율은 플라즈마 처리 전 균집락수(N0)와 플라즈마 처리 후 세균 집락수(Nt)를 계수한 뒤, 아래의 식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{Sterilization rate (\%)} = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

III. 결 과

본 연구에서는 실험의 이해도를 높이기 위하여 실험의 흐름을 모식도로 나타내었다(Figure 1). 연구에 앞서 예비실험을 통해 적절한 배지, 플라즈마 노출 시간, 거리에 따라 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 결핵균에 사용하는 Middlebrook 7H10이 건조에 잘 견디는 결과에 따라 선택하였다. 플라즈마 노출시간은 0~72시간 실험한 결과 0, 1, 2시간에서는 정량적으로 산출하기가 어려

웠다. 또한 24시간 이후의 결과는 배지가 말라버리는 현상으로 결핵균 성장 억제 효과를 육안으로 확인하는 것이 불가능하였다(data not show). 따라서 실험에는 플라즈마 노출 시간을 0, 3, 6, 9, 24시간으로 하고, Middlebrook 7H10배지를 사용하여 실험을 실시하였다.

플라즈마 발생기를 이용한 결핵균 성장 억제 효과를 확인하였다(Figure 2). 그 결과 플라즈마 노출시간 3시간에서 colony를 셀 수 없을 만큼 확인하였으나, 6시간에서 99.97%, 9시간에서 99.99%의 결핵균 성장 억제율을 나타내었다. 따라서 플라즈마 발생기에서 발생하는 플라즈마가 시간에 따라 결핵균의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 플라즈마의 풍량에 따라서 결핵균 성장 억제효과가 증가할 것이라는 가정 하에 풍량의 세기를 달리하여 결핵균 성장 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 플라즈마 노출시간 및 플라즈마의 발생기의 풍량세기에 따라서 결핵균 성장 억제 효과를 증가하는 것을 확인하였고(Figure 3), 플라즈마 노출시간 및 풍량 별로 결핵균 성장 억제율을 평균과 표준편차로 결정 하였다. 결핵균의 성장을 풍량 약(14; 80 m³/h)으로 하여 플라즈마 3시간 노출 시 20%의 억제 효과를 보였으며, 6시간 노출 시는 64%, 9시간 노출 시는 82.3%, 24시간 노출 시는 100% 억제됨을 확인하였다.

풍량을 중(18; 110 m³/h)으로 고정하였을 때, 플라즈마 3시간 노출 시는 68%의 결핵균 성장 억제, 6시간, 9시간, 24시간 노출 시에는 100%의 결핵균 성장이 억제 되었다.

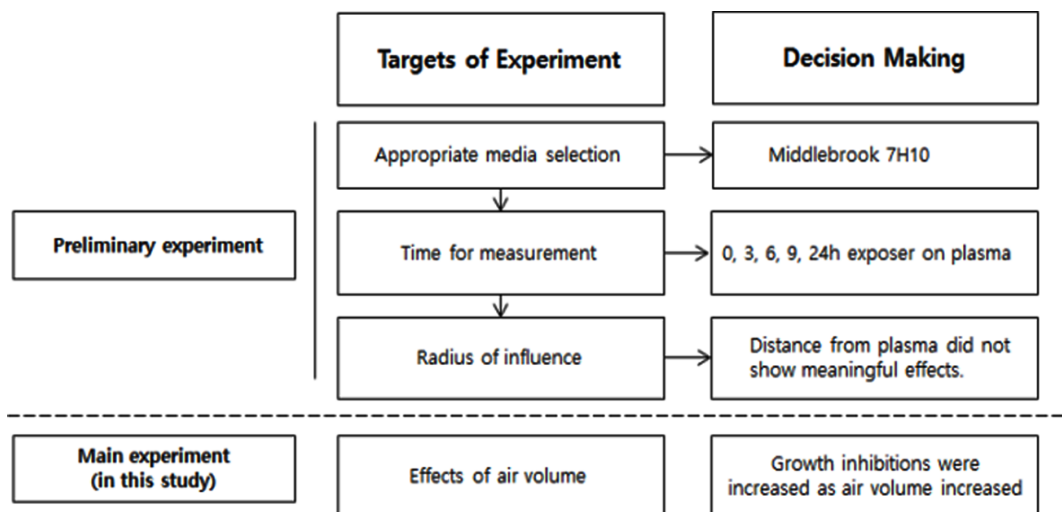


Figure 1. Schema of the study design



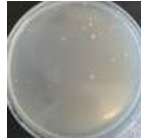
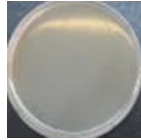
Air volume 18(110 m ³ /h)	Plasma exposure time(hour)			
	0	3	6	9
MTB growth				
Inhibition rate(mean±S.D, %)	0±0.00	NC	99.97±0.15	99.99±0.12

Figure 2. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by exposure time to plasma


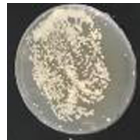







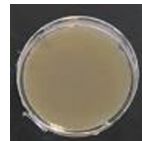
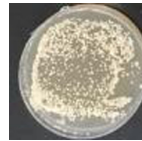


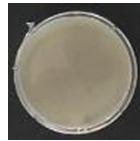
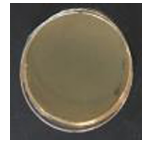
Air volume (m ³ /h)		Plasma exposure time(hour)				
		0	3	6	9	24
MTB growth	80					
	Inhibition rate (mean±S.D, %)	0.00±0.00	20.00±5.00	64.00±3.61	82.33±2.52	100.00±0.00
	110					
	Inhibition rate (mean±S.D, %)	0.00±0.00	66.00±5.29	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
	150					
	Inhibition rate (mean±S.D, %)	0.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

Figure 3. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by air volume and time of exposure to plasma

풍량 강(22; 150 m³/h), 플라즈마 3시간, 6시간, 9시간 24시간 노출 시 결핵균의 균집락수가 0으로 100%의 결핵균 성장 억제효과를 확인 하였다.

IV. 고 찰

결핵의 감염은 주로 감염된 환자의 기침, 재채기, 객담 배출에 의해 공기 중에 결핵균이 존재한다. 이러한 감염된 비말핵의 흡입을 통해서 사람에서 사람으로 전파되는 공기 감염이다. 전염성이 있는 결핵환자와 접촉을 한다고 해도 모두다 결핵에 감염 되지 않는다. 밀접 접촉자의 약 30%가 감염되고 감염자의 약 10%가 평생에 걸쳐 발병하게 되고 이 중 5%는 2년 이내에 나머지

는 면역력이 감소할 때 발병한다(Cho, 2017). 오염된 공기가 제한적인 공간에 있게 되면 오염물질의 농도가 높아져 인체에 영향을 미친다.

병원뿐만 아니라 학교에서 대규모로 감염이 이루어져 공기를 통한 결핵의 감염에 대한 예방 및 대책이 필요한 실정이다. 현재 결핵균을 제거하기 위하여 자외선, 클로린계 소독제가 사용되어왔다(Lee et al., 2010). 또한 과산화수소 훈증소독이 공기 중 결핵균 제거에 효과적이라는 연구결과도 발표되었다(Kahnert et al., 2005). 그러나 이러한 살균방법은 인체에 유해성으로 인하여 사람이 없는 공간에서 사용해야 하는 제한적인 부분이 있다. 이러한 제한점을 극복하기 위하여 많은 연구들이 현재 이루어지고 있다.

그 중 한 가지 방법인 플라즈마를 이용한 살균방법으로 많은 연구들이 되어왔다. 플라즈마는 적정조건에서 다른 물질과 반응하여 대상물질의 물리, 화학적인 상태를 변화시킨다(Heinlin et al., 2010). 따라서 인체에 다양하게 발생하는 활성종을 직접적으로 플라즈마가 세포에 작용하여 살균효과에 있어서 효과적이라는 보고가 되어 있다. 또한 그람양성 및 그람음성 세균의 살균효과, 결핵균을 비롯한 다양한 마이코박테리움 속의 세균에 억제효과가 보고되어 있다(Kim et al., 2018).

그러나 비열 유전체장벽방전 플라즈마의 풍량에 따른 결핵균 성장 억제 효과에 대하여 확인된 바는 없었다.

본 연구에서 플라즈마를 이용한 결핵균 성장 억제효과를 확인 하였다. 그 결과 풍량을 14(80 m³/h)로 고정 하였을 때, 플라즈마의 노출시간 6시간일 때 결핵균 성장 억제율이 발생되었을 때 풍량에 따라 일정 공간 내에서 플라즈마에 대한 노출되는 빈도가 높은 것으로 가정하였고, 그 가정을 확인하기 위하여 풍량에 따라 살균효과를 확인하였다. 그 결과, 풍량의 증가에 따라 억제효과가 일찍 나타나는 것을 확인하였고, 약(14; 80 m³/h)일 때 24시간, 중(18; 110 m³/h)일 때 6시간, 강(22; 150 m³/h)일 때 3시간에서 100% 억제효과를 확인할 수 있었다.

따라서, 플라즈마에 노출되는 시간이 길어질수록, 풍량이 세어질수록 결핵균 성장 억제효과에 소요되는 시간이 단축되는 확인하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 인체에 유해하지 않은 비열 유전체장벽 방전 플라즈마가 기존에 알려진 포도상구균을 포함하는 일상생활에서 노출되기 쉬운 세균들뿐만 아니라 결핵균에도 성장억제 효과를 나타내는지를 확인하고자 하였다.

그 결과 플라즈마에 의해 결핵균의 성장이 억제됨을 확인하였고, 동일한 플라즈마에 노출시켰을 때 풍량을 증가시키면 따라 결핵균 성장 억제 효과가 현저히(40% 이상) 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과들은 비열 유전체장벽 플라즈마가 결핵균 감염관리에도 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 실험적으로 보여주고 있다. 하지만 실제 생활공간을 다양한 크기의 공간과 주변 환경들로 구성되어 있으므로, 플라즈마의 효과를 극대화시킬 수 있는 환경에 적합한 플라즈마 발생양과 풍량을

고려한 효과, 지표들을 구축하는 추가 실험들이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2018년 산자부 주요사업 중 디자인혁신역량강화사업 중 「병원 내 감염예방을 위한 공기질 관리 시스템」사업에서 지원 받아 수행된 연구임.

References

- Bird BR, Denniston MM, Huebner RE, Good RC. Changing practices in mycobacteriology: a follow-up survey of state and territorial public health laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):554-559
- Bollela VR, Sato DN, Fonseca BA. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(9):1073-1076
- Cho KS. Tuberculosis control in the republic of Korea. *Health and Social Welfare Review* 2017;37(4):179-212
- Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010;8(12):968-976
- Huachua T, Rudy J, Kunin CM. Effect of hydrogen peroxide on growth of *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts in simulated blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1991;29(2):328-332
- Islam MM, Hameed HM, Mugweru J, Chhotaray C, Wang C et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J Genet Genomics* 2017;44(1):21-37
- Kahnert A, Seiler P, Stein M, Aze B, McDonnell G et al. Decontamination with vaporized hydrogen peroxide is effective against *Mycobacterium tuberculosis*. *Lett Appl Microbiol* 2005;40(6):448-452
- Kim JE, Kim IH, Min SC. Microbial Decontamination of Vegetables and Spices Using Cold Plasma Treatments. *Korean Journal of Food Science and Technology* 2013;45(6):735-741
- Kim KY, Paik NW, Kim YI, Yoo KH. Bactericidal Efficacy of Non-thermal DBD Plasma on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Korean Society of Occupational and Environmental Hygiene* 2018;28(1):61-79
- Kyi MS, Holton J, Ridgway GL. Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma

- sterilization system. J Hosp Infect 1995;31(4): 275-284
- Lee ES, Yoon TH, Lee MY, Han SH, Ka JO. Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. Water Res 2010;44(5):1329-1334
- Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A et al. Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care. Plasma Processes and Polymers 2010; 7(3-4):194-211
- Tomioka H, Namba K. Development of antituberculous drugs: current status and future prospects. Kekkaku 2006;81(12):753-774
- Venezia RA, Orrico M, Houston E, Yin SM, Naumova YY. Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29(5):430-436
- Yoo SJ. Status of Plasma Technology Applied to Agriculture and Foods. Vacuum Magazine 2015;2(4):4-8
- World Health Organization(WHO). 2018. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva Switzerland. Available from: URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

<저자정보>

손은순(연구원, 대학원생), 김용희(대표), 백남원(임원), 이일영(이사), 김은화(대리), 박해룡(교수), 이종석(부장)