한국어병학회지 제33권 제1호 (2020)
J. Fish Pathol., 33(1) : 091~095

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2020.33.1.091
단 보

저온 대기압 플라즈마를 이용한 해수 및 어류 병원성 세균 3종에 대한 살균소독효과

김수진* · 박신후* · 지보영* · 김영재** · 권문경*†

*국립수산과학원 수산방역과, **㈜한국방역기술

Low frequency plasma disinfectant effect in seawater and three major fish bacterial disease pathogens

Soo-Jin Kim*, Shin-hoo Park*, Bo-young Jee*, Yong-jae Kim and Mun-Gyoeng Gwon*†**

Aquatic Disease Control Division, National Institute of Fishery Science (NIFS), Busan 46083, Republic of Korea
**Korea Aquatic Biosecurity Technology (KABT)*

Fish bacterial diseases have spread and caused serious problem for cultured marine fish in Korea. The important bacterial disease affecting mariculture such as olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) are caused by *Edwardsiella tarda, Vibrio scophthalmi* and *Streptococcus parauberis*. For the bacterial disease protection in aquaculture industry, the water treatment is needed in aquaculture system. During the last decades atmospheric pressure non-thermal plasma in contact with liquids have received a lot of attention of environmental and medical application. In this study, we determined the disinfectant effect in seawater and three major fish bacterial disease pathogens by using low frequency plasma treatment. Three fish bacteria (*E. tarda, V. schophthalmi, S. parauberis*) were not detected within 16 min, 150 min and 270 min of 20 L, 500 L and 1 ton seawater post low frequency plasma treatment, respectively. Three major fish bacterial disease pathogens were not detected within 2 min after the low frequency plasma treatment, suggesting that the low frequency plasma possess disinfectant effectiveness.

Key words: disinfection, plasma treatment, seawater, fish bacterial disease

서 론

국내 어류 양식산업에서 넙치를 비롯한 수산양식 품종 및 수산양식기술의 다양화에 따른 국내 양식 생산량이 매년 증가하고 있으며, 각종 질병에 의한 폐사 또한 증가하고 있다. 이 중 넙치는 2019년 기준 43,320톤이 생산되었으며, 국내 주요 양식 어종으로 알려져 있다. 국내 양식 넙치에 지속적인 경제적 손실을 야기하는 세균성 질병으로는 *Vibrio* 속, *Streptococcus* 속 그리고 *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium* 속이 있으며, 전체 세균 감염율의 약 81.9%를 차지하는 것으로 보고된다 (Jo *et al.*, 2007; Kim *et al*., 2010; 2012). 세균성 질병에 의한

†Corresponding author: Mun-Gyoeng Gwon
Tel: +82-51-720-3044, Fax: +82-51-720-3039
E-mail: mgkwon@korea.kr

폐사를 저감하기 위한 방법 중 하나로 환경 요인인 사육수에 존재하거나 상존하는 병원체를 인위적으로 관리하는 방법의 필요성이 대두되며, 현재 해수 소독에 사용되는 방법은 약품 투입, 오존(O_3), 자외선(UV) 조사 등의 방법이 고안되어 사용되고 있으나, 약품의 투입은 환경으로의 2차적 오염, 오존과 자외선 조사의 경우는 다량의 물처리에 어려움이 있다는 단점이 있다. 이러한 문제의 해결을 위하여, 저온 수중 플라즈마의 활성화된 전자에너지를 이용한 물의 살균이 친환경적인 살균으로 평가 받고 있으며, 살균소독효과 또한 뛰어난 것으로 알려져 있다 (Huh *et al.,* 1998; Song *et al*., 2005; Lee *et al*., 2012). 플라즈마는 기체가 보다 높은 에너지를 가지게 되었을 때, 이온과 전자로 분리되면서 이들이 갖는 에너지가 서로 평행을 이루는 상태를 의미하고, 하전 입자 뿐만 아니라 화학적 반응성이 큰 활성 라디칼, 자외선 및 적외선 등이 포함되어 물리, 화학적 처리가 동시에 가능한 살균 기술로 주목 받고 있다. 최근 플라즈마 장치를 이용한 수처리에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 화학 용품을 따로 첨가할 필요가 없기 때문에 어류 혹은 사육수 내에 독성이 없으며, 살균 작용 후 물로 환원되어 용존 산소에 기여하는 등 2차적 오염이 발생하지 않는다. 따라서 본 연구에서는 저온 플라즈마의 살균소독효과를 조사하기 위하여 양식 생물에서 병원성을 나타내는 대표 세균 3종 (*E.tarda, V. scophthalmi, S. parauberis*)을 대상으로 차세대 친환경적 살균 기술로 주목 받고 있는 저온 대기압 플라즈마 기술을 사용하여 해수 용량에 따른 세균 처리 시간 비교 및 어류 병원성 세균 3종에 대한 저온 대기압 플라즈마 처리를 통한 살균소독효과를 조사하였다.

재료 및 방법

저온 대기압 플라즈마 장치

본 연구에 사용된 저온 대기압 플라즈마는 low frequency plasma로 석영관이 절연체로 쓰였다. 유동 전력 공급 장비를 이용하여 42W의 전압을 가하여 일반 해수에 대한 살균소독능 및 주요 어류 병원성 세균 3종에 대한 살균소독능을 비교하였다.

일반 해수 내 총 세균수 측정 및 저온 대기압 플라즈마 살균소독능 비교

총 세균수 측정을 위해 각각의 멸균 수조에 20 L, 500 L 및 1 ton의 일반 해수를 준비하여 저온 대기압 플라즈마 살균소독처리장치를 설치하였다. 20 L의 경우 2 min, 4 min, 8 min, 16 min, 30 min 간격으로 해수를 100 μL 채취하였고, 500 L의 경우, 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 2 h 30 min, 3 h 간격으로 해수를 채취하였다. 마지막으로 1 ton의 경우, 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 2 h 30 min, 3 h, 4 h, 4 h 30 min, 5 h 간격으로 해수 100 μL를 채취하였다. 채취한 해수는 1% NaCl이 첨가된 TSA(Tryptic Soy Agar, BD)배지에 도말 한 뒤 25˚C에서 24시간 배양하였다. 배양된 세균 집락(colony)을 계수하여 총 세균수를 산출하였다.

어류 병원성 세균 3종 배양

저온 대기압 플라즈마 살균소독능 시험을 위한 균주는 각각 1.5% NaCl를 첨가한 Tryptic soy broth (TSB)를 사용하여 25˚C에서 24시간동안 배양한 후 사용하였다. 국립수산과학원 수산방역과에서 제공한 어류 병원성 세균 3종(*E. tarda*, *S. parauberis*, *V. scophthalmi*)이 본 실험에 사용되었으며, 모두 Phosphate saline buffer (PBS)로 최종 농도가 1.2×10^{10} colony-forming units (CFU)/mL가 되도록 희석하였다. 플라즈마 살균소독처리 후 0 min, 3 min, 6 min, 9 min, 12 min, 15 min, 21 min, 30 min 간격으로 시료를 100 μL씩 채취하였으며, 1% NaCl이 첨가된 BHIA (Brain heart infusion Agar, BD)배지에 도말 한 뒤 25˚C에서 24시간 배양하였다. 배양된 세균 집락(colony)형성 유무를 통하여 저온 대기압 플라즈마 처리를 통한 세균의 사멸효과를 확인하였다.

결과 및 고찰

저온 대기압 플라즈마처리 효과는 암세포 사멸이나 박테리아 살균에 있어 매우 효과적인 것으로 보고되고 있다 (Nosenko *et al.,* 2009; Heinlin *et al.,* 2010). 또한, 곰팡이(Ryu *et al.,* 2013), 식중독 세균 (Lunov *et al.,* 2016), 노로바이러스와 간염바이러스

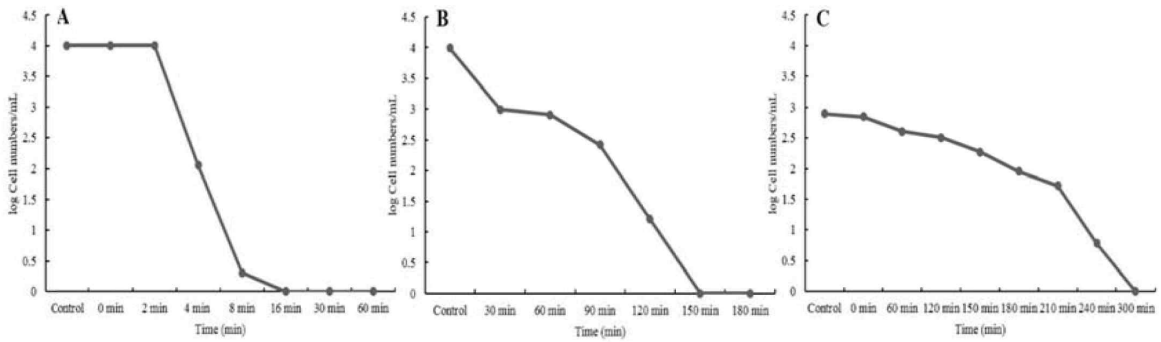

Fig. 1. Disinfectant effect of seawater bacteria by using plasma treatment.(A) 20L of seawater; (B) 500L of seawater; (C) 1ton of seawater.

(Ahlfeld *et al.,* 2015) 등의 항미생물효과가 입증되었다. 하지만, 국내 수중 플라스마 발생과 처리 장치 개발은 실용화 단계까지는 미진한 상태이다. 양식어류 질병의 경우, 전염성이 빠르고 높은 폐사율로 단시간에 이루어지는 특성이 있으므로, 양식 조건 내에서의 수처리 혹은 사육수의 살균 처리는 필수적이라고 할 수 있다. 특히 해수 내 병원성 세균 및 바이러스에 의해서 대부분의 어류 병원성 질병이 야기되므로 다량의 해수 살균소독 처리방법에 대한 연구가 필요한 실정이다. 양식 어류의 사육수의 효율적인 살균 소독을 위해서는 어체에 독성 혹은 스트레스를 주지 않는 범위 내에서 이루어져야 하며, 사육수는 환경 중으로 직접 배출되는 경우가 다수이므로 친환경적인 수처리 시스템의 구축이 필요하다. 본 연구에서 해수에 상존하며, 양식 어류에 세균성 질병을 일으키는 대표적인 세균 3종을 사용하여 저온 대기압 플라즈마의 살균소독 효과를 비교하였다. 용량에 따른 플라즈마의 살균소독 효과를 비교한 결과, 20 L의 해수용량에서는 플라즈마 처리 4분 후부터 해수 내 세균 수가 50% 이상 감소하는 결과를 확인할 수 있었으며, 약 16분 후 해수 내 세균이 검출되지 않는 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 500 L 해수 용량에 대한 플라즈마 살균소독 효과는 30분부터 해수 내 세균이 감소하기 시작하여 90분 후 약 50% 이상 감소하는 것으로 확인되었다. 플라즈마 처리 2시간 30분 처리 후에는 해수 내 세균이 검출되지 않음이 확인되었다 (Fig. 1B). 1 ton의 해수에 대하여 플라즈마의 살균소독효과를 조사한 결과, 3시간 30분 처리 후 해수 내 세균이 50%이상 감소하는 것으로 확인되었으며, 4시간 30분 후 해수 내 세균이 검출되지 않았다(Fig. 1C). 플라즈마 처리의 해수 내 세균에 대한 살균소독능의 효과를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 이는 저온 대기압 플라즈마 처리 후 해수 내 세균 등에 대한 살균처리 효과가 우수함을 나타내는 결과이며, 해수 중의 세균에서도 유사한 효과를 나타내는 것이 본 연구를 통하여 확인되었다. 대부분의 세균의 경우, 개체가 분열하는 생성 시간은 15분에서 1시간 이내로 알려져 있으며, 저온 대기압 플라즈마처리 후 발생되는 활성종들이 이러한 재생능을 억제하는 것이 보고되고 있으며(Eguia & Chambers, 2003; Kim *et al*., 2004), 플라즈마 이온 발생 장치로 그람 양성, 음성균에 대한 살균소독효과를 확인한 결과, 그람 양성균의

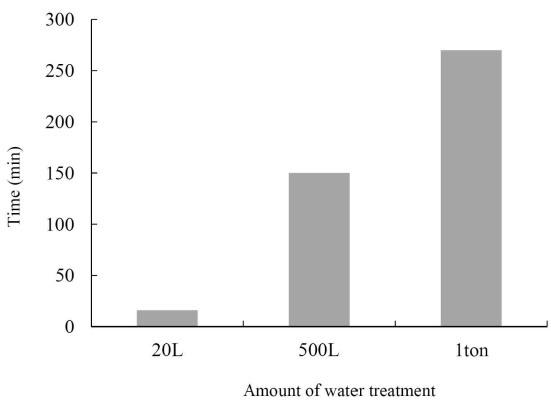

Fig. 2. Disinfection of bacteria according to seawater capacity by using plasma treatment.

Table 1 Plasma disinfectant effect to fish bacterial disease pathogen *(E. tarda, V. scophthalmi, S. parauberius)*

	0 min	2 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	30 min
E. tarda	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V. scophthalmi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. parauberius	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

경우, 93.2%, 그람 음성균의 경우, 92.9%의 제거율이 확인되었다. 이를 통하여, 일반 해수를 이용한 플라즈마의 세균 살균효과를 확인할 수 있었으며, 물의 용량이 늘어남에 따라 플라즈마를 이용한 해수 처리 시간은 증가하지만 해수 내 세균에 대한 살균소독능에 대한 효과는 지속적 임을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 양식 넙치에 감염되어 경제적 손실을 일으키는 대표적인 세균성 질병 3종을 선정하여 멸균해수에서의 저온 대기압 플라즈마의 살균 효과를 비교하였다(Table 1). 본 연구에 사용된 대표적인 어류 세균성 질병원인 병원체 3종에 대하여 *E. tarda*의 경우, 저온 대기압 플라즈마 처리 2분후부터 배지상에서 세균이 검출되지 않았으며, *V. scophthalmi* 및 *S. parauberis*의 경우 2분 이내에 검출되지 않는 경향이 확인되었다. 현재 넙치 연쇄구균병의 원인체로 분리되는 균주 중 *Streptococcus parauberis*는 1996년 이래 스페인 Galicia 지역의 터봇(*Scophthalmus maximus*)에 연중 발병하며 특히 여름철 고수온기에 발병하며 높은 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있다(Domenech, *et al.,* 1996). 국내에서는 제주지역을 중심으로 국내 전역으로 확산되고 있으며, *S. parauberis*에 감염된 넙치는 체색흑화, 출혈 및 농양을 동반한 안구 돌출, 비장 및 간 비대, 복부와 복벽의 점상 출혈 등이 나타나는 것으로 보고되며, *S. parauberis*는 해수와 퇴적 내에서도 독성을 유지하고 있어 양식장 환경 및 자연 환경 인자가 병원체의 감염 및 확산에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Curras *et al*., 2002). *Vibrio scophthalmi*는 양식넙치에서 *Vibrio harheyi* (32%) 다음으로 가장 많이 상존하는 세균종 중 하나이며 (Kang, 2003), 비브리오 감염 넙치 중 *V. scophthalmi* (60.1%)가 가장 높은 비율로 넙치 어체에 존재하는 것이 확인되었다(Jo *et al*., 2006). 또한 국내 넙치 및 해수에서도 분리되었다(Kang *et al*., 2003; Jo *et al*., 2006). 넙치를 대상으로 인위 감염을 실시한 결과, *V. scophthalmi*의 병원성이 확인되었다(Qia *et al*., 2012, Kim *et al*., 2013). *Edwardsiella tarda*는 그람 음성의 장내 세균총 세균으로 넙치 등의 어류에서 분리되며, 감염 시 복부팽만, 장기 결절 등의 증상을 일으킨다(Kuboda *et al*., 1981). *E. tarda*의 감염은 양식 넙치에 발생하는 대표적인 세균성 질병으로 알려져 감염 시 복부팽만, 탈장, 간과 신장에 농양 형성 등 전신적 증상을 나타내며, 많은 담수어와 해산어에 질병을 일으킨다. 본 연구를 통하여 어류 주요 병원성 세균 3종 모두 멸균 해수에서는 약 2분 경과 후부터 세균이 검출되지 않는 것이 확인되었다. 본 연구 결과를 토대로 플라즈마를 이용한 해수 및 사육수 살균소독처리 기술이 항생제의 사용에 대한 박테리아 내성 메커니즘에 구속 받지 않은 범위 내에서 빠르고 효율적인 해수 살균 및 양식장 사육수 살균 기술에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(수산생물방역기술개발 및 프로그램운영 R2020060)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Ahlfeld, B., Li, Y., Boulaaba, A., Binder, A., Schotte, U., Zimmermann, J.L., Morifll, G., Klein, G. 2015. Inactivation of a foodborne norovirus outbreak strain with nonthermal atmospheric pressure plasma. The American Society for Microbiology. 6: 1-5.

Ryu, Y.H., Uhm, H.S., Park G.S., Choi, E.H. 2013. Sterilization of Neurospora crassa by noncontacted low temperature atmospheric pressure surface discharged plasma with dielectric barrier structure. J. Korean Vacuum Soc. 22: 55-65.

Currás, M., Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde,

J.L. 2002. Dormancy as survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. Disease of Aquatic Organisms. 52: 129-136.

Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Pascual, C., Garca, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D., Dominquez, L. 1996. *Streptococcosis* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish Dis., 19: 33-38.

Eguia, J.M., Chambers, H.F. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: epidemiology and potential virulence factors. Curr Infec Dis Rep, 5(6): 459-466.

Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J.L. 2010. Plasma medicine: possible applications in dermatology. J. Dtsch Dermatol Ges. 8: 968-976.

Huh, M., Lim, J.S., Kim, B.G. 1998. Denitrification of ammonium nitrogen by ozone for a closed recirculating culture system. The Korean Environmental Sciences Society. 7(4): 493-500.

Jo, M.R., Kim, M.C., Song, C.B. 2006. Development of a rapid diagnostic kit for *vibrios* associated with the farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju Island. Journal of Fish Pathology F3.

Kang, B.J. 2003. A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* showing disease symptoms in Jeju Area of Korea (Ph.D. thesis). JeJu National University.

Kang, C.Y., Kang, B.J., Moon, Y.G., Kim, K.Y., Heo, M.S. 2007. Characterization of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in the Jeju island. Journal of Fish Pathology. 20: 109-117.

Kim, K.Y., Paik, N.W., Kim, Y.H., Yoo, K.H. 2018. Bactericidal efficacy of non-thermal DBD plasma on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Journal of Korean Society of Occupational and Environmental Hygiene. 28(1): 61-79.

Kim, M.S., Seo, J.S., Park, M.A., Cho, J.Y., Hwang, J.Y., Gwon, M.G., Jung, S.H. 2010. Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. Isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fish Pathology. 23(1): 37-45.

Kim, M.S., Cho, J.Y., Seo, J.S., Jung, S.H., Choi, H.S., Park, M.A. 2012. Distribution of MIC value of antibiotics against *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of Fish Pathology, 25(3): 181-188.

Kim, S.H., Woo, S.H., Lee, S.J., Park, S.I. 2013. The infection characteristics of *Vibrio scophthalmi* isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish. Pathol., 26(3): 207-217.

Kubota, S. S., Kaige, N., Miyazaki, T., Miyashito, T. 1981. Histopathological studies on edwardsiellosis of tilapias. Natural infection. Bull. Fac. Fish. Mie Univ. 9: 155-165.

Lee, Y.S., Kim, Y.B., Kim, K.S., Han, H.G. 2012. Disinfection properties and variation in the ozone concentration in seawater generated using a low-temperature dielectric barrier discharge plasma reactor. Journal of the Environmental Sciences. 21(10): 1181-1186.

Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polivka, L., Syková, E., Dejneka, A., Kubinová, Š. 2016. The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. Biomaterials. 82: 71-83.

Nosenko, T., Shimizu, T., Morfill, G.E. 2009. Designing plasmas for chronic wound disinfection. New Journal of Physics. 11: 1-20.

Park, S.Y. 2019. Antibacterial effects of atmospheric plasma against main foodborne bacteria on the surface of dried filefish(*Stephanolepis cirrhifer*) fillets. J. Food Hyg. Saf. 34: 178-182.

Qiao, G., Lee, D.C., Woo, S.H., Li, H., Xu, D.H., Park, S.I. 2012. Microbiological characteristics of *Vibrio Scophthalmi* isolates from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The Japanese Society of Fisheries Science. 78: 853-863.

Song, J.W. 2005. A study on the production of ozonized water for environment improvement by gaseous discharge, Master's D. Dissertation, Yeongnam University, South Korea.

Manuscript Received : Jun 5, 2020
Revised : Jun 15, 2020
Accepted : Jun 16, 2020