

Sterilization Effect of Microbial Strains by using Non-ionizing Radiation

Kyeonghwan Jeong¹, Jeongmin Seo^{2,*}

¹Department of Radiological Science, Daegu Health College

²Department of Radiological Science, Catholic University of Pusan

Received: November 01, 2020. Revised: November 27, 2020. Accepted: November 30, 2020

ABSTRACT

Globally, infection prevention and social awareness have been greatly changed by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, and as a result, the infection control guidelines and procedures for patients with high exposure to hospital-acquired infection are further strengthened and management and monitoring are more thorough. In order to prevent infection, sterilization should be carried out with the highest priority, and we will find a sterilization method that is low in cost, easy to install, and easy to operate, to present appropriate sterilization effects. In this study, the UV sterilizer was used to contaminate the caries bacteria with an output of 4 W and irradiation time of 60, 150, and 300 sec, and the laser was irradiated with outputs of 0.8 and 1.5 W at wavelengths of 266 and 355 nm, respectively. Ultraviolet sterilizer showed safety in infection prevention at over 150 sec, and laser showed safety in prevention at 1.5 W, 0.8 W, and 266 nm. As a result, the higher the output and the wavelength closer to 253.7 nm, the better the sterilization effect.

Keyword: Sterilization, Laser, Ultraviolet sterilizer, Non-Radiation

I. INTRODUCTION

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 19(COVID-19; SARS-CoV) 감염증의 장기화에 따른 감염병 인식과 사회적 영향이 많이 미치고 있으며, 세계보건기구(WHO)에서는 감염병 대유행을 경고하는 최고 등급인 팬데믹(Pandemic)을 선포하면서 코로나바이러스19 유행의 장기적 국면에 접어들었다^[1]. 빠른 전파속도와 치료의 어려운 점 때문에 세계인은 감염예방과 멸균에 관심이 높아지고 있으며, 임상 의료에서는 원내감염 노출이 높은 일반 환자의 치료와 수술 등을 여전히 진행하고 있다. 이러한 과정에서 감염관리 지침 및 과정을 더 강화하고 관리감시를 더 철저히 하고 있다^[2,3].

감염예방을 위해서는 첫 번째로 의료기기 및 제품에 멸균을 시행하여 생존해 있는 미생물을 비활성화시켜 감염 및 오염도의 안전성을 가지는 것이

필요하다^[4]. 멸균법의 종류로 고압증기, 산화에틸렌 가스, 고에너지 방사선 조사 등의 방법이 사용되며 특히 의료분야의 멸균에 많이 적용되고 있다. 하지만, 모든 의료 멸균에 동일하게 적용되는 것이 아니라 각 방법의 장단점에 따라 그 적용 범위가 다르다. 고압증기는 고온과 수증기로 멸균을 시행하는데 짧지 않은 건조시간이 필요하며 고온에 취약한 의료제품에는 사용하지 못한다. 산화에틸렌 가스는 고농도의 가스를 이용하여 단시간에 멸균이 가능하나 발암성 화학 잔류물이 존재하여 환기 시간이 필요하고 국제적으로도 제한하는 실정이다. 고에너지 방사선을 이용한 멸균은 제품에 대한 화학적 물리적 변화가 크지 않으나 설치 부대비용 및 사고 발생 시 사회적 여파는 매우 크다고 할 수 있다. 기존 방법들의 이러한 문제점에 비해 전자파 자외선을 이용한 방법의 살균 및 멸균 효과는 매우 탁월하여 국제연합식량농업기구, 국제원자력기구,

세계보건기구(FAO/IAEA/WHO) 등의 국제기구에서 의료기기를 포함한 여러 분야에서 살균 및 멸균에 이용할 것을 권고하고 있다^[3-5]. 최근에는 자외선 분야와 함께 레이저를 이용한 멸균효과 연구도 매우 활발히 이루어지고 있다^[6-8].

자외선 살균방식과 레이저 조사를 통한 멸균효과에 대한 기존 연구는 특정 파장을 이용하여 균주 멸균을 시행하고 해당 파장 에너지에서 세균 제거의 가능성 및 멸균에 관한 내용을 다룬 것이 일반적이다. 동일한 파장일 경우에도 그 출력 및 조사 시간에 따라 멸균 정도의 차이가 나타날 것이며 이에 본 연구는 동일한 파장에서 출력과 조사 시간 변화에 의한 멸균효과를 비교 분석하였으며 자외선 살균기와 레이저를 조사하여 세균의 생존율 및 통계적 분석 후 멸균 유효성을 평가하고자 한다.

II. MATERIAL AND METHODS

본 연구의 대상은 인체 내 가장 많이 이식되고 있는 치아 임플란트 소형 의료기기의 멸균 효과를 검증하기 위하여 구강질환으로 많이 발생하는 연쇄상구균 중 충치균(*S. mutans*; *Streptococcus mutans*)을 이용하였다. 충치균을 실험용 플레이트에 도포 후 자외선 및 레이저를 조사 후 세균 수를 측정하였으며, 통계적 검정을 실시하였다.

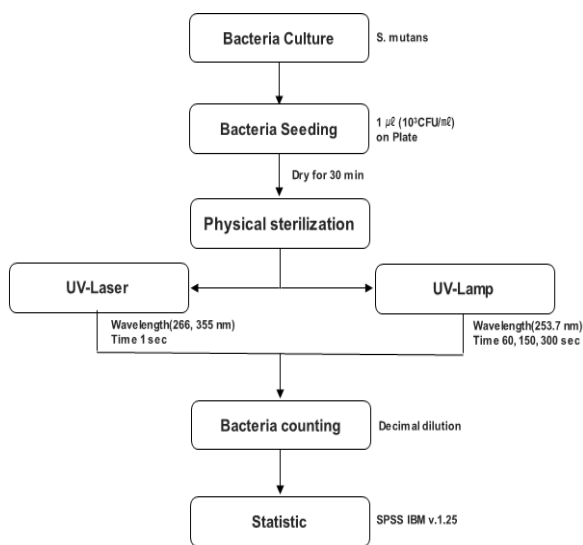


Fig. 1. Flow chart of the entire experiment procedure.

1. 실험 재료 및 방법

1.1 세균 배양 및 도포

멸균을 분석하기 위해 사용된 시험 균주는 치아 우식의 원인균인 충치균(KCTC 3065)을 한국식품정보원(Daejeon, South Korea) 미생물센터에서 Brain Heart Infusion agar(BHI) 배지에서 접종 후, 온도 31 °C, 습도 17 %에서 3일간 배양 후 10³ CFU/mL 균액을 제조하여 공급받았다. 제조한 충치균을 피펫을 사용하여 플레이트 표면에 중앙에 각각 1 µl씩 직경 1 cm로 도포시켰으며, 30 min 건조한 후 비전리 방사선을 조사하였다.

1.3 자외선 살균기

자외선 살균기(CM-1-1, Cupmate, Korea)를 이용하여, 파장 253.7 nm, 출력 4 W, 조사 시간 60, 150, 300 cm로 충치균 도포된 플레이트를 중심인 깊이 11, 높이 13 cm에 위치시켜 실험자의 안전을 위해 살균기의 문을 닫고 조사하였다.

1.4 레이저

멸균시간을 줄이기 위해 에너지 밀도가 높은 고출력 레이저를 사용하였으며, 레이저 응용 기술센터(Daegu, South Korea)에서 Q-switch Nd:YAG 레이저(Nedium YAG laser: NL315, EksPLA, Lithuania) 고조파(Harmony) 분리기로 파장 266, 355 nm로 자외선만 분리하여 출력 0.8, 1.5 W, 반복률 10 Hz, 직경 1 cm로 각각 조사하였다.

1.5 충치균 수 측정

Nd:YAG 레이저와 자외선 살균기가 조사된 플레이트에 생리식염수 1 ml에 균질화 후 회수하여, 희석 배양법으로 추정, 확정, 완전시험을 수행하고 십진 희석법으로 검체 1 ml의 충치균을 측정하였다.

1.6 통계

자외선과 레이저 조사 후 충치균의 생존을 통계적 비교분석을 위해 SPSS(IBM Ver. 25, USA) 프로그램을 사용하였으며, 통계 방법은 모집단 간의 중심위치를 비교하기 위해 비모수 검정법에서 Mann-Whitney-Wilcoxon 순위 합 검정법으로 수치화 시켰다. 연속이며 분포가 같은 두 집단의 독립

적인 모집단을 확률표본으로 각각 추출하였다 (p<0.05).

III. RESULT

자외선 253.7 nm, 출력 4 W, 조사 시간 60, 150, 300 sec 각각 조사 후 총치균 멸균은 Table 1에 생존 결과를 나타내었다. 자외선 살균기는 253.7 nm로 조사되었으며, 조사 시간 60 sec는 대조군과 차이를 보였으나 감염예방 안전성을 보장하는 수치는 아니며, 150, 300 sec는 대조군과 차이를 나타내었다. Table 2 비모수 검정 방법에서 조사 시간 60 sec는 근사유의확률(양측)이 0.018로 두 집단간의 유의한 차이를 나타내었으며, 150, 300 sec는 근사유의확률(양측)이 0.006으로 두 집단간의 유의한 차이를 나타내었다.

Table 1. The comparison of survived *S. mutans* depending on the UV exposure time(253.7 nm).

4 W Time (sec)	Sample Number						Mean ± SE
	1	2	3	4	5	6	
Control	-	-	-	-	-	-	53,666 ± 1.2×10 ⁴
60	21,000	<10	<10	<10	20	160	3,530 ± 3.5×10 ³
150	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10 ± <10
300	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10 ± <10

Values are mean ± standard Error(n=6)
a : Colony forming unit/ml

Table 2. The test statistic of *S. mutans* depending on the UV exposure time(253.7 nm).

Mann-Whitney Test		
Time (sec)	Result	P-value
60	-2.364	0.018
150	-2.761	0.006
300	-2.761	0.006

P<0.05

출력 4 W의 자외선 살균기의 조사 시간에 따른 총치균 생존율은 Fig. 2에 나타내고 있다. 조사 시간 60 sec는 93.42 % 멸균되었으나, 150, 300 sec는 99.99 % 멸균하였다.

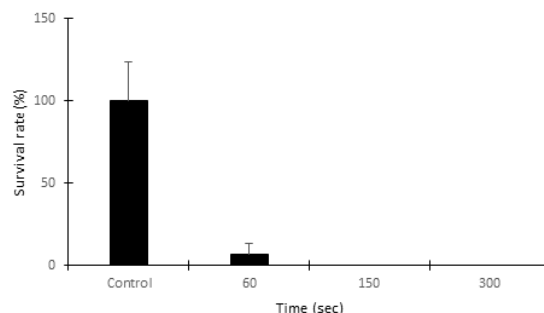


Fig. 2. The survival rate of *S. mutans* according to the UV exposure time(253.7 nm).

레이저 출력 0.8 W로 조사 후 총치균 멸균은 Table 3에서 나타나듯이 UV-C 파장 266 nm에서 총치균 생존을 나타내지 못하였다. UV-B 파장 355 nm는 대조군과 차이를 조금 나타내었지만, 총치균의 생존이 많았다. Table 5 비모수 검정 방법에서 파장 266 nm는 근사유의확률(양측)이 0.011로 유의한 차이를 나타내었으며, 파장 355 nm는 근사유의확률(양측)이 0.052로 두 집단간의 유의한 차이가 없었다. 그리고 266 nm와 355 nm는 자외선 영역이 다르기 때문에 통계 비교분석에서 근사유의확률(양측)이 0.003으로 두 집단간의 유의한 차이가 있었다.

Table 3. The comparison of survived *S. mutans* depending on the wavelength by the output of 0.8 W.

0.8 W Wave length (nm)	Sample Number						Mean ± SE
	1	2	3	4	5	6	
Control	-	-	-	-	-	-	4,533 ± 9.7×10 ²
266	<10 ^a	<10	590	<10	<10	<10	98 ± 9.8×10 ¹
355	2,400	2,200	740	3,500	2,000	3,100	2,323 ± 3.9×10 ²

Values are mean ± standard Error(n=6)
a : Colony forming unit/ml

Table 4. The test statistic of *S. mutans* depending on the wavelength by the output of 0.8 W.

Mann-Whitney Test		
Wavelength (nm)	Result	P-value
266	-2.546	0.011
355	-1.945	0.052

P<0.05

레이저 출력 1.5 W로 조사 후 총치균 멸균은 Table 5에서 나타나듯이 UV-C 파장 266 nm에서 총치균 생존을 나타내지 못하였다. UV-B 파장 355 nm는 대조군과 차이를 조금 나타내었지만, 총치균의 생존이 많았다. Table 6 비모수 검정 방법에서 파장 266 nm는 근사유의확률(양측)이 0.015로 두 집단간의 유의한 차이를 나타내었으며, 파장 355 nm는 근사유의확률(양측)이 0.038로 의미상 차이가 없었다. 그리고 266 nm와 355 nm는 자외선 영역이 다르기 때문에 통계 비교분석에서 근사유의확률(양측)이 1.000으로 두 집단간의 유의한 차이가 없었다.

Table 5. The comparison of survived *S. mutans* depending on the wavelength by the output of 1.5 W.

1.5 W Wavelength (nm)	Sample Number						Mean ± SE
	1	2	3	4	5	6	
Control	-	-	-	-	-	-	4,666 ± 8.3×10 ²
266	<10 ^a	<10	<10	<10	<10	<10	<10 ± <10
355	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10 ± <10

Values are mean ± standard Error(n=6)
a : Colony forming unit/ml

Table 6. The test statistic of *S. mutans* depending on the wavelength by the output of 1.5 W.

Mann-Whitney Test		
Wavelength (nm)	Result	P-value
266	-2.777	0.005
355	-2.777	0.005

P<0.05

출력 4 W 자외선 살균기의 조사 시간에 따른 총치균 생존율은 Fig. 3에 나타내고 있다. 출력 0.8 W, 파장 266 nm는 99.99 % 멸균되었으나, 파장 355 nm에서는 48.75 %로 멸균하였다. 그리고 출력 1.5 W, 파장 266, 355 nm는 모두 99.99 % 멸균하였다.

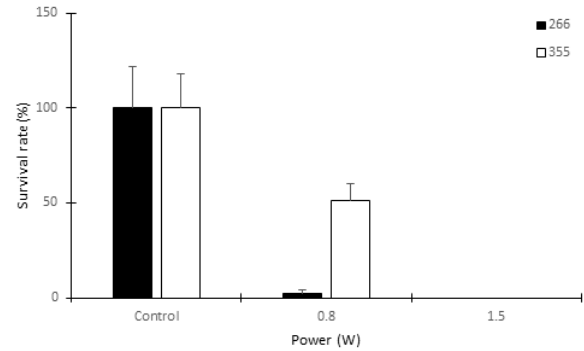


Fig. 3. The survival rate of *S. mutans* according to the wavelength by the output.

IV. DISCUSSION

최근 세계적으로 코로나바이러스 때문에 세계보건기구에서 팬데믹 선언한 후 국가 간의 이동이 제한되었으며, 이로 인해 의료분야 감염예방의 관리와 체계가 강화되어 감염예방을 위한 멸균을 우선으로 시행하고 있다^[9].

선행논문에서는 자외선 LED 기반의 미생물 살균 분석을 하였으며, 출력 196 mW, 5 min 조사 시 99.99 % 멸균효과를 나타내었다. 그리고 자외선 외 미생물 저감화 효과 선행연구는 단일 출력밀도로도 멸균효과를 나타내었다^[10,11]. 두 선행연구에서는 단일파장을 이용하여 제시하거나, 저출력에서 장시간의 조사 후 멸균효과를 나타내었다. 본 연구에서는 단시간의 멸균효과를 검정하기 위해 선행연구보다 고출력과 조사 시간별 분석을 하였다. 그 결과 자외선 살균기 출력 4 W, 파장 253.7 nm, 150 sec 이상에서 총치균 멸균이 99.99 %가 이루어져 감염예방의 안전성을 나타내었다. 그리고 자외선 레이저에서는 출력 0.8, 1.5 W, 반복률 10 Hz, 파장 266 nm에서 99.99 %의 멸균을 하였다.

본 연구에서는 기존의 멸균법들은 과정과 조작이 쉽지 않으며 장시간이 소요되었다. 기존의 멸균법을 분석하여 적절한 조사 시간, 출력 및 파장을

제시하고자 한다.

V. CONCLUSION

본 연구에서는 자외선 살균기 조사 시간과 자외선 레이저의 출력변화에 따른 세균의 멸균 효과를 분석하였다.

자외선 살균기 출력 4 W, 파장 253.7 nm, 조사 시간 60 sec 조사 후 총치균 생존율은 6.58 %로 낮은 수치였지만 감염예방의 안전성을 보장하기에는 높은 수치였다. 조사 시간 150 sec부터 멸균 99.99 %로 나타내어, 자외선 살균기는 최소 거리 10 cm에서 150 sec 이상을 조사할 것을 권장한다. 또한 자외선 레이저는 살균 파장인 253.7 nm와 근접한 266 nm가 355 nm보다 멸균 효과를 확연히 다른 결과를 나타내었다. 그 원인은 같은 UV-B 영역인 355 nm에서 출력변화에 따른 멸균 효과가 달랐다. 0.8 W에서는 세균 생존이 51.25 %로 1.5 W와 확연한 차이를 보였으며, 통계 분석에서도 355 nm에서는 출력에 따라 차이가 있음을 보였다. 즉, 살균선에 근접한 파장과 고출력일수록 출력밀도가 높아져 멸균 효과가 높았다. 그리고 선행연구는 5분의 시간이 소요되었으나 본 연구는 자외선 살균기는 150 sec, 자외선 레이저는 1 sec에서 멸균효과를 나타내었다.

본 연구 결과에서 나타나듯이, 기존 멸균법과 비교해 단시간에 멸균 효과를 나타내었으며, 비용, 경제면에서 우수하였다. 의료기기 이용할 때 의료 종사자의 안전성이 보장되어 멸균법 다양성 확보에 도움을 줄 것으로 여겨진다. 비전리방사선 자외선 일 경우 단파장을 조사하기 때문에 에너지가 높다. 그러므로 에너지 높은 자외선 조사할 경우 라디칼 (Radical; -OH) 분해 산물이 발생할 가능성이 있어 변형에 영향이 따를 수 있으므로 추후 연구가 더 필요하다고 생각된다.

Reference

[1] H. J. Lee, H. Y. Lee, "COVID-19 Stress: Is the level of COVID-19 stress same for everybody? - Segmentation approach based on COVID-19 Stress level", Kor. Logistic research association, vol. 30,

no. 4, pp. 75-87, 2020.

- [2] U. Y. Choi, Y. M. Kwon, J. H. Choi, J. H. Lee, "Activities of an infection control surveillanceworking group for the infection control and prevention of COVID-19", J. of kor. Medical Association, vol. 53, no. 9, pp. 574-580, 2020. <https://doi.org/10.51234/jkma.202.63.9.574>
- [3] J. H. Nam, J. H. Shin, J. Y. Lee, D. H. Lee, "Effects of ionizing and ultraviolet radiation on microbial mutation and DNA damage", Kor. J. microbiology, vol. 53, no. 1, pp. 20-28, 2017. <https://doi.org/10.7845/kjm.2017.7004>
- [4] Y. R. Kim, J. Y. Kim, J. H. Lee, Y. C. Nho, "Establishing the Sterilization Dose of Electron Beam for Sterilization of Medical Devices", J. radiation industry, vol. 14, no. 2, pp. 203-211, 2020.
- [5] D. H. Kim, J. S. Kim, S. S. Park, "Ultraviolet Spectroscopic Test of Disposable Sterile Syringes", Society for Standards, Certification and Safety, vol. 10, no. 1, pp. 39-46, 2020. <https://doi.org/10.34139/JSCS.2020.10.1.39>
- [6] E. A. Boardman, L. S. W. Huang, J. J. Robson-Hemmings, et. al. "Deep ultraviolet(UVC) laser for sterilisation and fluorescence applications", J. Sharp Tech, vol. 104, pp. 33-35, 2012.
- [7] Fabio Belloni, Vincenzo Nassisi, Pietro Alifano, et al. "The Effects of UV Laser Radiation as Sterilizer for Cultural Heritage", J. Macromol. Symp. vol. 238, pp. 52-56, 2006. <https://doi.org/10.1002/masy.200650608>
- [8] H. B. Jang, M. J. Won, H. S. Jung, J. K. Kim, "Sterilization effect of UV laser irradiation on Bacillus atrophaeus", Kor. society of analytical sciences, vol. 63, pp. 276-276. 2019.
- [9] C. k. Kim, B. S. Kim, "Development of Sterilant for the Prevention of Infection of the Medical Institution Interior Space", J. kor. society of Mechanical Technology, vol. 17, no. 1, pp. 153-160, 2015. <https://doi.org/10.17958/ksmt.17.1.201502.153>
- [10] B. S. Kim, H. S. Lee, Y. K. Kim, "Analysis of Microbial Sterilization Based on Ultraviolet LEDs for Smart Farm", J. Kor. Institute of Illuminating and Electrical Installation Engineers, vol. 34, no. 4, pp. 11-16, 2020. <https://doi.org/10.5207/JIEIE.2020.34.4.011>

- [11] J. B. Choi, H. S. Cheon, M. S. Chung, W. IO. Cho, "Microbial reduction effect of steam heating, UV irradiation, and gamma irradiation on red pepper powder", *Kor. J. Food SCI. Technol*, vol. 52, no. 2, pp. 177-182, 2020, <https://doi.org/10.9721/KJFST.202.52.2.177>

비전리방사선을 이용한 미생물 균주 멸균효과

정경환¹, 서정민^{3,*}

¹대구보건대학교 방사선과

²부산가톨릭대학교 방사선학과

요 약

전 세계적으로 중증 급성 호흡 증후군 코로나바이러스에 의해 감염예방 및 사회적 인식이 크게 변화되었으며, 그로 인해 의료 원내감염 노출이 높은 환자에 관한 감염관리 지침 및 과정을 더 강화하고 관리감시를 더 철저히 하고 있다. 감염예방을 위해서는 멸균이 최우선으로 시행이 되어야 하며, 저비용, 쉬운 설치와 조작성이 쉬운 멸균법을 찾아 적절한 멸균효과를 제시하고자 한다. 본 연구에서는 충치균을 오염시켜 출력 4 W, 조사 시간 60, 150, 300 sec로 자외선 살균기를 이용하였으며, 레이저는 출력 0.8, 1.5 W로 각각 파장 266, 355 nm로 조사하였다. 자외선 살균기는 150 sec 이상에서 감염예방에 안전성을 나타내었으며, 레이저는 1.5 W와 0.8 W, 266 nm에서 예방의 안전성을 나타내었다. 결과에서 출력이 높고 253.7 nm에 가까운 파장일수록 멸균효과는 뛰어났다.

중심단어: 멸균, 레이저, 자외선 살균기, 비전리방사선

연구자 정보 이력

	성명	소속	직위
(제1저자)	정경환	대구보건대학교 방사선과	겸임
(교신저자)	서정민	부산가톨릭대학교 방사선학과	교수