저온플라즈마(Microwave Plasma)를 활용한 *Acidovorax citrulli* 감염 수박종자의 살균 효과 검정

Effect of Microwave Plasma on Sterilization of *Acidovorax citrulli* Infected Watermelon Seeds

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6417

Fax: +82-33-243-3314

E-mail: younslee@kangwon.ac.kr

김상우¹ · 주한준¹ · 권병현¹ · 마헤시 아드히카리¹ · 김현승¹ · 박미리² · 이윤수^{1*}¹강원대학교 식물자원응용공학과, ²(재)철원플라즈마산업기술연구원Sang Woo Kim¹, Han Jun Ju¹, Byeong Heon Gwon¹, Mahesh Adhikari¹, Hyun Seung Kim¹, Mi-Ri Park², and Youn Su Lee^{1*}¹Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea²Cheorwon Plasma Research Institute, Cheorwon 24047, Korea

This study was conducted to check the sterilization efficacy of microwave plasma (MWP) against the watermelon seeds infected with *Acidovorax citrulli* 11-251. Watermelon seeds were artificially vacuum inoculated to produce *A. citrulli* 11-251 infected seeds. Aac ImmunoStrip and scanning electron microscope (SEM) results suggests that, seeds (coat and endosperm) were infected under the concentration of 1×10^7 /30 min. MWP sterilization process was carried out at 50 W (3 min, 5 min, and 10 min), 80 W (3 min, 5 min, and 10 min), and 100 W (3 min, 5 min, and 10 min). According to the results, MWP sterilized the artificially inoculated seed coats by 95.96% at 80 W/10 min and seed endosperms by 100% at 100 W/10 min respectively. Although, seeds were sterilized by MWP, germination rate of seeds were low as compared to non treated (negative control) seeds. Moreover, cell membrane of *A. citrulli* 11-251 was damaged while observed in SEM after sterilized with MWP. Further studies regarding the appropriate sterilization condition by MWP against *A. citrulli* infected seeds for germination will be conducted in our next study.

Keywords: *Acidovorax citrulli*, Bacterial fruit blotch, Plasma, Sterilization, Vacuum inoculation

Received November 6, 2020

Revised February 24, 2021

Accepted February 24, 2021

서 론

박과 작물은 세계적으로 100속 8,860종이 알려져 있으며, 주요 재배지역은 열대지방과 아열대 지방에 많이 재배된다. 우리나라의 경우 수박, 호박, 박, 오이 등 약 70여 종의 박과 작물을 재배되고 있다. 수박은 세계 90여 개국에서 생산되는 중요

한 과채 작물로 통계청 “농작물생산조사” 자료에 따르면 우리나라의 수박재배 현황은 2019년 기준 재배면적은 11,972 ha이고 생산량은 475,815톤의 중요 재배작물이다. 수박은 박과(Cucurbitaceae)의 덩굴성 한해살이 식물로 수박에서 발병되는 주요 병해는 탄저병, 덩굴마름병, 오이녹반모자이크바이러스병(cucumber green mottle mosaic virus), 과실썩음병(bacterial fruit blotch, BFB) 등 25가지 병해가 발생한다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 수박 재배 시 가장 문제가 되는 BFB의 경우 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*에 의해 발생하는 병해로 1차 전염의 주요 전염원은 종자전염으로 알려져 있

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

며(Sowell과 Schaad, 1979; Webb과 Goth, 1965), 옥묘장의 접목이나 이병 잔재물에 의한 토양전염 등에 의해 확산되는 병으로 세계적인 피해를 보인다(Demir, 1996; Hamn 등, 1997; Hopkins 등, 2003; Lessl 등, 2007; Martin와 Harlock, 2002; Somodi 등, 1991). 수박 BFB는 1965년 미국에서 처음 발생 보고되었으며(Sowell과 Schaad, 1979), 1990년대에는 미국 전역으로 확산되어 큰 피해를 주었다가(Hopkins 등, 1996; Latin and Rane, 1990; Somodi 등, 1991; Wall 등, 1990) 1999년 이후 종자, 실생묘(유묘), 과실 등을 매개로 하여 전 세계적으로 널리 전파되었다(Langston 등, 1999; Martin 등, 1999; Walcott 등, 2000). 국내의 경우 수박 BFB는 1991년 전라북도 고창에서 처음 보고되었으며(Song 등, 1991), 최근까지 계속되는 BFB는 박과 작물의 주요 병해로 대두되고 있습니다. 하지만 BFB 방제를 위해 등록된 농약은 없으며 일반적으로 차아염소산나트륨, 초산, 염산 등이 사용되고는 있으나 그 효과는 경미한 것으로 보고되어 있다(Rane과 Latin, 1992). 현재 수박 종자에서 유래하는 BFB균을 살균하기 위하여 물리적 처리방법인 건열처리 방법으로 85°C에서 3-5일 처리 시 효과가 있다는 것이 보고되어 있으나 급격한 온도 변화로 인한 기형 식물체 발생 및 종자 발아에 악영향을 주는 것으로 종자 살균처리에 많은 문제점들을 가지고 있다(Kubota 등, 2012). 따라서 현재까지의 종자소독 방법의 문제점을 개선하고 효과적인 종자소독의 방법으로 플라즈마를 이용하여 수박 BFB 방제에 활용하고자 한다. 플라즈마란 제4의 물질로 기체상태의 물질이 외부에서 가해진 전기장에 의해 생성된 이온, 전자, 라디칼 등과 중성입자로 구성된 물질로 거시적 중성을 이루고 있는 물질상태를 말한다(Adhikari와 Khanal, 2013). 플라즈마는 자연 상태의 원자 또는 분자 상태의 물질을 이온화시켜 생성되며 원자, 분자 상태의 물질을 이온화시키기 위해서는 수십만도에서 수백만도의 높은 에너지와 압력이 필요하다. 이러한 플라즈마의 종류는 저온 플라즈마(low-temperature plasma)와 고온 플라즈마(thermal plasma)로 나눌 수 있으며, 저온 플라즈마는 비교적 낮은 온도인 수백 도에서 발생하는 플라즈마를 말하며, 반도체, 형광등 제조, 금속나노물질 제조, 상하수도 유해물질 제거 및 미생물 살균 등에 이용할 수 있다. 플라즈마 방전 방법에 따라 여러 종류의 플라즈마가 있는데 마이크로웨이브에 의해 플라즈마를 방전시키는 마이크로웨이브 플라즈마(microwave plasma, MWP)가 저온 플라즈마에 속한다. 고온 플라즈마는 플라즈마를 생성하기 위하여 높은 온도 즉 수만도 이상의 온도가 필요하며 금속의 절단, 난분해성 기체 처리, 세라믹 나노 입자 제조 등에 이용되고 있다. 저온 플라즈마를 이용하여 식물 종자에 처리하여 표면의 오염물 제거, 발아촉진, 식물 생장촉진 등 작물의 종자 품질을 향상시

키는 잠재력을 가지고 있다고 보고되어있으며(Ohta, 2016), 저온 플라즈마 생성 시 발생하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 및 질소종(reactive nitrogen species)들은 박테리아의 세포막 파괴와 손상을 일으키며, DNA 및 단백질을 변형시켜 미생물을 비활성화시키는 살균 효과가 있다고 보고되었다(Patil 등, 2016). 병아리콩(Mitra 등, 2014), 알팔파, 양파, 무, 유채(Butscher 등, 2016) 및 렌즈콩 종자(Waskow 등, 2018)에 대해 저온 플라즈마 처리 시 토착 미생물이 효율적으로 비활성화된다고 보고되었으며, 다른 연구에서는 다양한 식물 종자의 표면에 저온 플라즈마 처리 시 *Aspergillus* spp.의 병원성 미생물이 효과적으로 살균된다고 보고되었다(Selcuk 등, 2008).

본 연구에서는 1 급 MWP를 이용하여 수박 종자의 종피와 종자 내부에 존재하는 과실썩음병균(*Acidovorax citrulli*)을 효과적으로 살균하는 최적 살균조건과 플라즈마 처리 시 수박 종자 발아에 미치는 영향을 알아보려고 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

MWP 장치. 플라즈마를 이용한 종자소독 실험을 위하여 MWP를 (재)철원플라즈마산업기술연구원(Cherwon Plasma Research Institute, CPRI)에서 제작한 1급 MWP 장치를 이용하였다. 플라즈마 발생 장치의 인가 전력은 30 W-1 kW이며, 챔버의 플라즈마 방전의 안정화를 위하여 아르곤:공기(9:1) 혼합 기체를 주입하여 공정 가스로 사용하였다. 플라즈마 발생 장치의 내부 진공압력은 0.3 kPa로 설정하여 실시하였다. 종자처리 시, 처리 대상 종자의 석영 챔버내 분산력을 향상시켜 많은 양의 종자가 일정하게 플라즈마 처리가 될 수 있도록 회전식 챔버를 적용하고, 또한 석영 챔버 내부에 날개를 추가하였다. 실험에 사용한 MWP 장치는 Fig. 1과 같다.

***Acidovorax citrulli* 인공감염 종자 생산.** 인공감염 종자 생산을 위해 사용한 *A. citrulli* 균주는 수박에서 분리한 균주로 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 분양받은 11-251 균주를 사용하였으며, 공시 종자는 Koregon (Anseong, Korea)에서 받은 BN44 수박 품종을 사용하였다. 11-251 균주는 감압처리에 사용하기 위해 tryptic soy broth (MBCell, Kisan Bio Co., Ltd., Seoul, Korea) 배지에 150 rpm/30°C/48시간 배양 후 1× phosphate buffer (pH 7.4±0.1) 1×10¹, 1×10³, 1×10⁵, 1×10⁷ cells/ml 농도로 각각 희석하여 수박 종자와 함께 25 kPa의 감압조건에서 30분 처리하여 인공감염 종자를 제조하여 실험에 사용하였다.

인공감염 종자의 Aac ImmunoStrip test 및 PCR 검정. 감압

Fig. 1. Schematic diagram of microwave plasma sterilizer: microwave plasma sterilizer system (A), plasma chamber (B), inner quartz chamber in plasma chamber (C), and plasma controller (D).

처리로 얻어진 인공감염 종자의 *A. citrulli* 11-251 감염 여부를 확인하기 위해 *Aac* ImmunoStrip test (Agdia, Elkhart, IN, USA) 을 이용하여 종피와 종자 내부의 감염 여부를 확인하였다. 인공 접종하여 건조한 이병 종자를 무작위로 0.5 g 선별하여 SEB4 extraction buffer에 넣고 5분간 침지 후, *Aac* ImmunoStrip 을 이용하여 30분 동안 반응하여 strip의 밴드를 확인하여 감염 여부를 확인하였다. 종자 내부의 경우 70% EtOH을 이용하여 1분 동안 표면 살균하여 멸균수를 이용하여 3회 세척 후, 종 피를 제거하여 같은 방법으로 *Aac* ImmunoStrip test를 실시 하였다. 또한, PCR 검정은 표면 살균된 인공감염 종자의 종피 를 제거 후, 종자 내부를 마쇄하여 tryptic soy broth (MBCell) 배지에 150 rpm/30°C/16시간 배양하여 Fast DNA kit (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA)를 사용하여 배양액으로부터 DNA를 추출하였다. PCR primer는 *A. citrulli*-F: 5'-GACCAGC-CACACTGGGAC-3', *A. citrulli*-R: 5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3'을 사용하였으며, PCR 조건은 아래 그림과 같다(Fig. 2).

PCR composition		PCR condition	
2 µl	Sample	95°C	5 min
5 µl	10× buffer	95°C	20 sec
3 µl	2.5 mM dNTP	55°C	30 sec
0.5 µl	25p <i>A. citrulli</i> F primer	72°C	50 sec
0.5 µl	25p <i>A. citrulli</i> R primer	72°C	5 min
0.5 µl	R taq (Takara, R001B)	12°C	∞
38.5 µl	3d H ₂ O	×30 cycles	
50 µl	Total volume

MWP 처리 감염 종자의 *A. citrulli* 11-251 살균 효과 실험. *A. citrulli* 인공감염시킨 수박 종자를 대상으로 플라즈마를 활용 하여 살균 효과를 검정하였다. 인공감염 종자를 각 처리별 100 립씩 0.3 kPa, 50 W, 80 W, 100 W의 조건에서 3분, 5분, 10분 플라즈마 살균처리를 진행하였다. 무처리 종자 및 플라즈마 처리 한 종자는 5 ml 1× phosphate buffered saline에 0.5 g씩 넣고 4시간 배양하여 tryptic soy agar (MBCell) 배지에 30 µl씩 도 말 접종하여 30°C 배양기에 48시간 동안 배양하여 3반복하여 colony 수를 조사하였다. 종자 내부는 플라즈마 처리된 종자를 1% sodium hypochlorite를 이용하여 1분 동안 처리하고 멸균수로 3회 세척 표면하여 살균 후, 종피를 제거하여 위와 같은 방법으로 실시하였다. 측정된 colony를 집락형성능(cfu/ml) 계산 식으로 계산하고 log로 표현하였다.

$$\text{집락형성능(cfu/ml)} = \frac{\text{미생물 집락수(colony)}}{\text{희석배수(dilutions)} \times \text{접종량(ml)}}$$

MWP가 처리된 수박 종자의 발아율 실험. 플라즈마 처리가 종자에 미치는 영향을 보기 위하여 수박 종자 발아실험을 진행 하였다. 인공 감염된 종자를 각각 50 W, 80 W, 100 W, 시간은 3 분, 5분, 10분 조건으로 플라즈마 처리한 후, 플라즈마 처리된 수박 종자를 105구 tray에 원예 범용상토(Baroker, Seoul Bio, Eumseong, Korea)에 각각 처리별 수박 종자 100립씩 파종하여 유리 온실에서 25–28°C, 하루 2회 관주하면서 14일 경과 후, 발 아된 수박 종자 수를 개수하여 발아율을 조사하였다.

인공감염된 수박 종자의 MWP 처리 후 종자 및 *A. citrulli* 11-251 형태 변화. 플라즈마 처리 후, *A. citrulli* 형태변화를 확인 하기 위하여 scanning electron microscope (SEM)를 이용하여 종피와 종자 내부를 관찰하였다. 종자는 살균 효과가 가장 높 았던 80 W/10분, 100 W/10분의 처리 종자를 사용하였으며 플 라즈마 처리하지 않은 인공감염 종자인 대조구와 비교하였다. 플라즈마가 처리된 인공감염 종자를 카본테이프(carbon tape)

Fig. 2. PCR composition and the PCR reaction condition used for hot-start PCR.

Fig. 3. Screening result for the detection of *Acidovorax citrulli* 11-251 on watermelon seed using Aac ImmunoStrip test.

가 부착된 알루미늄 스티브(aluminum stub)에 올려놓고 ION-COATER (COXEM, Daejeon, Korea) 기기를 이용하여 백금으로 코팅하여 SEM (S-3500N, Hitachi Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 10 kV 가속전압으로 관찰하였다. SEM 관찰은 강원대학교 기초과학연구소(Korea Basic Science Institute)에서 관찰하였다.

결 과

인공감염 수박 종자의 생산 및 감염 여부 확인. 수박 종자를 감압처리 장치를 이용하여 인공감염 종자를 제작하였다. 감압 처리된 인공감염 종자의 감염 여부 확인을 위하여 Aac ImmunoStrip을 사용하여 확인하였다. 그 결과 *A. citrulli* (11-251)의 농도를 1×10^7 cells/ml로 감압처리하였을 때 종피와 종자 내부 모두에서 *A. citrulli*가 감염된 것을 확인하였으나, *A. citrulli* 배양액의 희석 농도가 1×10^5 cells/ml 이하로 낮아지게 되면 인공감염이 제대로 감염되지 않음을 확인하였다. 그래서 실험에 사용한 모든 인공감염 종자는 *A. citrulli*의 농도를 1×10^7 cells/ml 농도로 제작하여 실험을 진행하였다(Fig. 3). 또한, PCR 검

정을 통하여 감염 여부를 확인하기 위하여 *A. citrulli* specific primer를 이용하여 확인한 결과, 무처리 종자에서는 밴드를 확인하지 못하였으나, 종피 및 종자 내부에서 360 bp의 밴드를 확인하였다(Fig. 4). 인공감염 종자의 종자 표면 및 종자 내부에 *A. citrulli* 존재 여부를 확인하기 위하여, SEM 관찰을 통하여 확인하고자 하였고, *A. citrulli* 농도 1×10^7 cells/ml/30분 처리하여 인공감염 종자를 만들고, 종자 내부의 경우 종자 표면을 살균하고 종피를 제거하여 사용하였다. SEM 관찰 결과, 수박 종자에서는 감압처리 후 종피와 종자 내부에 모두 *A. citrulli*균의 균체를 발견하였으며, 건전 종자를 감압처리법을 이용하여 이병 종자로 제작이 가능하다는 것을 확인하였다(Fig. 5).

MWP 처리 후 *A. citrulli* 살균 효과 검정. MWP 장치의 살균 효과를 확인하기 위해서 인공감염 종자를 50 W (3분, 5분, 10

Fig. 4. Detection of *Acidovorax citrulli* 11-251 with PCR analysis using specific primer at 360 bp. M, marker; 1, seed coat; 2, seed endosperm; 3, non-treated seed; 4, bacterial fruit blotch culture broth.

Fig. 5. Scanning electron microscope of watermelon seed coat and seed endosperm artificially inoculated with *Acidovorax citrulli* 11-251 (Inoculation condition of 1×10^7 cells/ml for 30 min). (A) Non-treated seed coat. (B) Seed coat after inoculation. (C) Non-treated seed endosperm. (D) Seed endosperm after inoculation.

Table 1. Effect of microwave plasma sterilizer treatment on survival of *Acidovorax citrulli* 11-251 inoculated on seed coat and internal parts of seed^a

Watt	Seed coat				Internal parts of seed			
	Control	Time (min)			Control	Time (min)		
		3	5	10		3	5	10
50	6.42a	5.44 b ^a (89.71) ^b	5.09 bc (95.41)	4.88 cd (97.13)	5.77 a	5.38 ab (59.02)	4.89 ab (86.93)	2.27 cd (99.97)
80		4.97 bc (96.45)	4.96 bc (96.58)	4.07 e (99.56)		4.80 ab (89.33)	3.02 c (99.82)	0 d (100)
100		5.35 bc (91.64)	4.88 cd (97.12)	4.39 de (99.08)		3.97 b (98.43)	2.35 cd (99.96)	0 d (100)

Values are presented as log cfu/ml.

^aSame alphabetic superscript values are not different significantly at $P \leq 0.05$ levels according to Duncan's multiple range test. Data are means of three replications.

^bInhibition rate (%).

Fig. 6. Effect on the survival of *Acidovorax citrulli* 11-251 on seed coat with microwave plasma sterilizer treatment of 50, 80, and 100 W for 3, 5, and 10 min, respectively. Non-treated and plasma-treated seeds (0.5 g each) were shaken with stirrer and submerged in 5 ml 1× phosphate buffered saline buffer for 4 hr before an aliquote of 30 μ l of mixture was spread on tryptic soy agar medium followed by an incubation at 30°C for 48 hr.

분), 80 W (3분, 5분, 10분), 100 W (3분, 5분, 10분) 처리조건으로 처리 후, 종피와 종자 내부의 *A. citrulli* 생존 균수를 측정하여

log값으로 나타내었다. 종피의 무처리구 생존 균수는 6.42 log cfu/ml로 확인되었으며, 플라스마 처리 후 50 W/3분 처리를 제외한 나머지 처리구에서 91% 이상의 살균 효과를 확인하였으며, 50 W, 80 W, 100 W 처리 시 다른 처리구와 비교해보면 살균 효과가 비교적 높은 것으로 확인되었다(Table 1, Fig. 6). 종자 내부의 경우 50 W/3분 처리에서 59.02%의 가장 낮은 살균 효과를 나타내었으며, 80 W, 100 W/10분 처리에서 100%의 가장 높은 살균 효과가 있는 것으로 확인되었다. 플라스마를 이용하여 인공감염된 수박 종자의 *A. citrulli* 살균력은 종자 내부에서 80 W, 100 W/10분 처리할 경우 100%의 가장 높은 살균력을 확인하였으나 높은 에너지의 플라스마 처리는 발아율에 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Table 1, Fig. 7).

MWP 처리 후 수박 종자의 발아율 검정. 플라스마 처리가 종자 발아에 미치는 영향을 확인하기 위하여 인공감염 종자를 각각 50 W, 80 W, 100 W/3분, 5분, 10분 조건으로 처리하여 발아율을 조사한 결과, 무처리구(negative control)의 경우 93%의 발아율이 확인되었으며, 50 W 처리 시 69%, 51%, 41% (3분, 5분, 10분)의 발아율을 확인하였고, 80 W의 경우 77%, 53%, 4% (3분, 5분, 10분)의 발아율을 확인하였으며, 100 W는 55%, 5%, 0% (3분, 5분, 10분)의 발아율을 확인하였다. 전체적으로 무처리구와 비교해보면 상대적으로 낮은 발아율을 보였다. 플라스마 처리 에너지가 높아지고 처리 시간이 늘어남에 따라서 발아율은 큰 차이를 보이며 낮아진다는 것을 확인하였으며, 100 W/10분 처리 시 종자의 발아가 되지 않은 것을 확인하였다. 또한, 플라스마 처리하지 않은 인공감염 종자(positive control)의 경우 67%의 발아율을 보였으며, 대조구에 비해 발아율이 26% 정도 낮은 것을 확인하였는데 이는 감압처리 시 압력에 의

Fig. 7. Effect on the survival of *Acidovorax citrulli* 11-251 on seed endosperm with microwave plasma sterilizer treatment of 50 W, 80 W, and 100 W for 3, 5, and 10 min, respectively. Non-treated and plasma-treated endosperms (0.5 g each) were shaken with stirrer and submerged in 5 ml 1× phosphate buffered saline buffer for 4 hr before an aliquote of 30 μ l of mixture was spread on tryptic soy agar medium followed by an incubation at 30°C for 48 hr.

한 물리적 손상을 받은 것으로 판단된다(Fig. 8).

인공감염 수박 종자 플라즈마 처리 후 *A. citrulli* 형태변화 확인. *A. citrulli* 인공감염 종자를 대상으로 플라즈마를 활용한 살균 효과 검정 실험 후, 플라즈마 power와 시간에 따른 살균 효과를 확인 결과, 가장 좋은 살균 효과를 보인 80 W, 100 W/10 분 처리구 종자를 전자현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과 플라즈마 처리를 하지 않은 인공감염 종자 종피에서는 세균의 표면이 온전한 형태의 세포막을 가진 *A. citrulli*가 관찰되었지만 80 W에서 플라즈마 처리구는 세포막이 파괴되어 구멍이 뚫려있는 모습을 확인할 수 있었고, 100 W 플라즈마 처리구에서는 세포막이 완전히 파괴되어있는 모습을 확인할 수 있었다. 종자 내부의 경우 대조구와 다르게 80 W, 100 W 처리구에서 *A. citrulli*의 세포막 일부가 무너지거나 세포막이 파괴되어 구멍이 뚫려있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 플라즈마 처리가 종피뿐만 아니라 종자 내부에서도 충분히 *A. citrulli*의 세포를 손상시키며, 사멸 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 9).

고 찰

플라즈마는 1929년 Langmuir의 진공 튜브에 고전류를 가하는 과정에서 이온화된 가스를 플라즈마라는 용어로 최초 사용하였다. 플라즈마는 고온 플라즈마와 저온 플라즈마로 나눌 수 있는데 고온 플라즈마의 경우 평균 온도가 수만도에 이르고 저온 플라즈마의 경우 저압 적은 에너지를 이용하여 플라즈마 방전을 시킨다. 실험에 사용한 플라즈마 장치는 CPRI에서 제작

Fig. 8. Effect of microwave plasma treatments on watermelon seed germination. Negative control, non-treated seed; positive control, bacterial fruit blotch vacuum inoculated watermelon seeds. ^aSame alphabetic superscript values are not different significantly at $P \leq 0.05$ levels according to Duncan's multiple range test. Data are means of three replications. ^bDifferent conditions for the microwave plasma sterilizer treatment for watermelon seeds.

Fig. 9. Scanning electron microscope of watermelon seed coat and seed endosperm artificially inoculated with *Acidovorax citrulli* 11-251 (inoculation condition of 1×10^7 cells/ml for 30 min) after microwave plasma treatment: non-treated seed coat (A), 80W, 10 min (C), and 100W, 10 min (E); non-treated endosperm (B), 80W, 10 min (D), and 100W, 10 min (F).

한 MWP 장치를 사용하였다. 플라즈마에서 발생하는 마이크로웨이브와 플라즈마 방전 시 생성되는 ROS는 탄화수소 결합의 반응으로 세포막을 연화시킨다. 세포막이 파괴되면 ROS와 ultraviolet (UV)이 세포 내부로 침투하여 DNA와 내부구조물을 파괴한다. 그리고 발생된 원자 및 분자 radicals은 etching을 통하여 세포막의 파괴를 유발한다. 그람 음성 세균은 그람 양성 세균에 비해 막 구조가 더 얇기 때문에 etching에 의해 쉽게 불활성화되는 것으로 보인다(Stoffels 등, 2008). 또한, 생성된 radicals는 세포 내의 pH를 낮추어 세포가 항상성을 유지할 수 없어 세포가 불활성화된(Padan과 Schuldiner, 1987). 세포막은 미생물 표면에 하전된 입자의 축적으로 인한 정전기 파괴를 통해 손상될 수 있다(Laroussi 등, 2002). UV 광자는 박테리아 DNA 가닥에서 thymine bases의 dimerization을 유도할 수 있으며, 이는 박테리아의 복제 능력을 방해한다(Laroussi 등, 2002). UV 광자는 박테리아 포자의 DNA를 손상시킬 수 있다(Setlow, 2007). 하지만 다양한 기작이 존재하며 이러한 반응들이 동시에 이루어질 수 있고 세포가 파괴된 후 일어날 수 있기 때문에 주요 mechanism을 확인하기에는 어렵다. 본 연구는 플

라즈마 발생 장치의 효과적인 살균조건을 찾기 위하여 50 W, 80 W, 100 W, 시간은 3분, 5분, 10분의 처리구를 실험하였고, 본 연구에서는 *A. citrulli*가 인공접종된 수박 종자에 MW 플라즈마를 처리하여 살균 효과를 검증하였다. 여기서 중요한 점은 종피 및 종자 내부까지 침투하여 살균됨을 확인하였다. 종피는 50 W/3분을 제외한 모든 처리에서 90% 이상의 높은 살균 효과를 확인하였으며, 특히 80 W/10분 처리에서는 99.56%의 가장 높은 살균 효과를 확인하였다. 종자 내부는 50 W/3분, 5분 처리에서 각각 59.02%, 86.93%로 낮은 살균을 보였지만 그 외 모든 처리에서 종피와 같이 90% 이상의 높은 살균을 확인하였다. 그리고 80 W, 100 W/10분 처리에서는 colony가 발견되지 않았고 이는 100%의 살균이 이루어졌다고 볼 수 있다. 전자현미경 분석은 이전 Stoffels 등(2008)의 연구에서 밝혀진 플라즈마 처리에 의한 세포막 파괴를 확인할 수 있었다. 대조구와 비교하여 80 W/10분 처리구에서는 종자에 감염된 *A. citrulli*의 모양에서 중간중간 구멍이 보였고 100 W/10분 처리조건에서는 *A. citrulli*가 완전히 파괴된 모습을 확인하였다.

본 연구는 기존의 종자소독 방법과는 다르게 단시간 소독이 가능하고 친환경적인 플라즈마를 이용하여 수박 BFB 방제에 활용 가능성을 확인하였다. 하지만 종자 전염성 병원균의 경우 소량의 병원균만으로도 작물에 막대한 피해를 줄 수 있으므로 현재 종피와 종자 내부에서 모두 100%의 살균조건 및 종자 발아를 저해하지 않는 수준의 플라즈마 처리조건을 찾는 실험이 진행되고 있다.

요 약

본 연구에서는 마이크로웨이브 플라즈마(microwave plasma)를 이용하여 종자에 감염된 *Acidovorax citrulli* 11-251의 살균 효과를 확인하였다. 감염처리를 통하여 수박 종자에 *A. citrulli* 11-251를 인공접종하여 이병 종자를 제작하였으며, Aac ImmunoStrip 및 scanning electron microscope 확인 결과, 종피 및 종자 내부에 $1 \times 10^7/30$ 분 처리한 조건에서 감염되었음을 확인하였다. 플라즈마 처리는 50 W (3분, 5분, 10분), 80 W (3분, 5분, 10분), 100 W (3분, 5분, 10분) 조건으로 실험 결과, 인공감염 종자를 플라즈마 처리 시 대조구와 비교해보면 종피의 경우 80 W/10분, 99.56%의 살균 효과를 보였고, 종자 내부는 80 W, 100 W/10분, 100%의 높은 살균 효과를 보였다. 인공접종 종자를 사용하여 플라즈마 살균장치의 종자살균 효과를 확인하였다. 하지만 발아율은 무처리구보다 플라즈마 처리 시 급격히 떨어지는 것을 확인하였다. 주사전자현미경 관찰 결과, 플라즈마 처리가 *A. citrulli* 11-251의 세포막을 파괴하는 것을 확인하였다. 또

한, *A. citrulli*가 접종된 수박 종자를 이용하여 플라즈마 처리 시 살균 및 발아율을 높일 수 있는 최적 조건에 대한 추가 실험이 수행될 예정이다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through Golden Seed Project (213006-05-4-SBS30), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Services (KFS). This research has been worked with the support of a research grant of Kangwon National University in 2019.

References

- Adhikari, B. R. and Khanal, R. 2013. Introduction to the plasma state of matter. *Himalayan Phys.* 4: 60-64.
- Butscher, D., Van Loon, H., Waskow, A., Rudolf von Rohr, P. and Schuppler, M. 2016. Plasma inactivation of microorganisms on sprout seeds in a dielectric barrier discharge. *Int. J. Food Microbiol.* 238: 222-232.
- Demir, G. 1996. A new bacterial disease of watermelon in Turkey: bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al.). *J. Turk. Phytopathol.* 25: 43-49.
- Hamn, P. B., Spink, D. S., Clough, G. H. and Mohan, K. S. 1997. First report of bacterial of bacterial fruit blotch of watermelon in Oregon. *Plant Dis.* 81: 113.
- Hopkins, D. L., Cucuzza, J. D. and Watterson, J. C. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis.* 80: 529-532.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Hilgren, J. and Lovic, B. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Dis.* 87: 1495-1499.
- Kubota, M., Hagiwara, N. and Shirakawa, T. 2012. Disinfection of seeds of cucurbit crops infested with *Acidovorax citrulli* with dry heat treatment. *J. Phytopathol.* 160: 364-368.
- Langston, D. B. Jr., Walcott, R. D., Gitaitis, R. D. and Sanders, F. H. Jr. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83: 199.
- Laroussi, M., Richardson, J. P. and Dobbs, F. C. 2002. Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Appl. Phys. Lett.* 81: 772-774.
- Latin, R. X. and Rane, K. K. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74: 331.
- Lessl, J. T., Fessehaie, A. and Walcott, R. R. 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. *J. Phytopathol.* 155: 114-121.
- Martin, H. L., O'Brien, R. G. and Abbott, D. V. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. *Plant Dis.* 83: 965.
- Martin, H. L. and Harlock, C. M. 2002. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of Gramma in Australia. *Plant Dis.* 86: 1406.
- Mitra, A., Li, Y.-F., Klämpfl, T. G., Shimizu, T., Jeon, J., Morfill, G. E. et al. 2014. Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. *Food Bioprocess Technol.* 7: 645-653.
- Ohta, T. 2016. Plasma in agriculture. In: Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications, eds. by N. N. Misra, O. Schlutter and P. J. Cullen, pp. 205-222. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Padan, E. and Schuldiner, S. 1987. Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell. *J. Membr. Biol.* 95: 189-198.
- Patil, S., Bourke, P. and Cullen, P. J. 2016. Principles of nonthermal plasma decontamination. In: Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications, eds. by N. N. Misra, O. Schlutter and P. J. Cullen, pp. 143-177. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Rane, K. K. and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509-512.
- Selcuk, M., Oksuz, L. and Basaran, P. 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresour. Technol.* 99: 5104-5109.
- Setlow P. 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* 15: 172-180.
- Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kucharek, T. A., Hodge, N. C. et al. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Dis.* 75: 1053-1056.
- Song, W. Y., Kim, H. M., So, I. Y. and Kang, Y. K. 1991. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*: the causal agent of bacterial fruit blotch rot on watermelon. *Korean J. Plant Pathol.* 7: 177-182.
- Sowell, G. Jr. and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Dis. Rep.* 63: 437-441.
- Stoffels, E., Sakiyama, Y. and Graves, D. B. 2008. Cold atmospheric

- plasma: charged species and their interaction with cells and tissues. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36: 1441-1457.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5th ed. The Korean Society of Plant Pathology, Seoul, Korea. 119 pp.
- Walcott, R. R., Langston, D. B. Jr., Sanders, F. H. Jr., Gitaitis, R. D. and Flanders, J. T. 2000. Natural outbreak of a bacterial fruit rot of cantaloupe in Georgia caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 84: 372.
- Wall, G. C., Santos, V. M., Cruz, F. J., Nelson, D. A., and Cabrera, I. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana islands. *Plant Dis.* 74: 80.
- Waskow, A., Betschart, J., Butscher, D., Oberbossel, G., Klöti, D., Büttner-Mainik, A. et al. 2018. Characterization of efficiency and mechanisms of cold atmospheric pressure plasma decontamination of seeds for sprout production. *Front. Microbiol.* 9: 3164.
- Webb, R. E. and Goth, R. W. 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. *Plant Dis. Rep.* 49: 818-821.