

유해 화학물질 처리에 의한 녹농균과 포도상구균의 성장저해최소농도 측정

안지선, 김진경, 김재성, 이창수*

충남대학교 응용화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99

(2023년 4월 25일 접수; 2023년 5월 23일 수정본 접수; 2023년 5월 23일 채택)

Measurement of Minimum Inhibitory Concentration of Toxic Chemicals against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*

Jiseon An, Jingyeong Kim, Jae Seong Kim, and Chang-Soo Lee*

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University,
99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Republic of Korea

(Received for review April 25, 2023; Revision received May 23, 2023; Accepted May 23, 2023)

요 약

*Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*는 만성 창상 감염의 원인이 되는 주요 병원체이며 상처부위에서 공존한다. 이러한 감염은 단일 감염에 비해 독성이 높아 환자에게 바람직하지 않은 결과를 초래한다. 복합미생물 감염 내에서 미생물 간의 상호작용은 질병 진행을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 호흡기, 상처, 당뇨병 발과 같은 질병 내 복합 미생물 감염은 다양한 미생물들을 포함하나, 녹농균과 황색포도상구균이 가장 일반적으로 확인된다. 본 연구는 그람음성균 *P. aeruginosa*와 그람양성균 *S. aureus*를 중심으로 독성화학물질의 농도구배에 따른 성장양상을 비교하고자 하였다. 세균 성장이 억제되는 농도를 의미하는 최소 억제 농도(MIC)는 특정화학물을 함유한 배지를 연속적으로 희석하여 성장 곡선을 평가하여 결정한다. 두 균주 모두 상기 방법을 통해 성장곡선을 확인하였고, 지수성장기를 적용하여 세균의 배가시간을 계산하였다. 각 독성 물질에 대한 MIC 결과로부터 그람양성균과 그람음성균 사이의 성장 속도 차이와 각 독성 물질에 대한 내성 차이를 식별하였다. 우리는 이 접근 방식이 세균 관련 감염의 혁신적인 치료법 개발에 대한 강력한 잠재력을 가지고 있다고 기대한다.

주제어 : 유해 화학물질, 액체 배지 미량 희석법, 성장 저해 최소 농도

Abstract : *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are the two most frequently encountered pathogens responsible for chronic wound infections, often coexisting in such cases. These infections exhibit heightened virulence compared to single infections, leading to unfavorable patient outcomes. The interaction among microorganisms within polymicrobial infections has been shown to exacerbate disease progression. Polymicrobial infections, prevalent in various contexts such as the respiratory tract, wounds, and diabetic foot, typically involve diverse microorganisms, with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* being the most commonly identified pathogens. This study aimed to compare the growth patterns of bacteria under a concentration gradient of toxic chemicals, focusing on a Gram-negative strain of *Pseudomonas aeruginosa* and a Gram-positive strain of *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration (MIC), which signifies the concentration at which bacterial growth is inhibited, was determined by performing broth microdilution and assessing the bacteria's growth curves. The growth curves of both *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were confirmed, and the exponential growth phases were applied to calculate the doubling times of bacteria. The MIC value for each toxic chemical was determined through broth microdilution. These results allowed for the identification of disparities in growth rates between Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as differences in resistance to individual toxic substances. We expect that this approach has a strong potential for further development towards the innovative treatment of bacteria-associated infections.

Keywords : Toxic chemicals, Broth micro-dilution (BMD), Minimum inhibitory concentration (MIC)

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rhadum@cnu.ac.kr; Tel: +82-10-6455-5346; Fax: +82-42-822-8995

doi: 10.7464/ksct.2023.29.2.135 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

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.

1. 서 론

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)는 호기성 그람 음성균으로, 흔한 식중독 원인균으로 주로 육류 제품과 음용수에서 발견된다. 녹농균은 외독소와 내독소를 생산할 수 있어 식품 오염 및 인체 건강을 위협할 수 있다[1]. 병원 내에서의 가장 흔한 병원체 중 하나로, 특히 면역 방어가 손상된 환자에서 다양한 급성 및 만성 감염을 일으킬 수 있는 세균성 병원균이다. *Pseudomonas aeruginosa*는 수많은 항생제에 자연적으로 내성이 있고 다제 내성 균주의 수가 전 세계적으로 증가하고 있어 치료하기가 점점 더 어려워지고 있다. 또한, 아미노글리코사이드, 세팔로스포린, 플루오로퀴놀론 및 카르바페넴을 포함하여 거의 모든 종류의 항생제에 내성을 갖는 균주가 보고되었다. 미국에서는 녹농균 감염의 약 13%가 다제 내성 균주에 의해 발생한다[2-4].

그리고 그람 양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 다양한 임상 질환을 일으키는 세균이다. 황색포도상구균은 본 성상이 포도알이 밀집해 있는 모습처럼 보여서 이러한 이름이 붙여졌다. *Staphylococcus aureus*는 피부와 점막 등에서 발견되며 인간은 이러한 유기체의 주요 저장소이다. 의료 종사자, 정기적으로 바늘을 사용하는 사람(당뇨병 환자 및 정맥 주사(IV) 약물 사용자), 장기 입원 환자 및 면역력이 약한 사람들이 이에 속한다. *Staphylococcus aureus*는 직접적인 접촉이나 어떠한 매개체를 통해 사람 대 사람으로 전염될 수 있다. *Staphylococcus aureus*도 마찬가지로 다제 내성 균주로 인해 치

료를 관리하기가 여전히 어려운 실태이다. 다제 내성 균주는 여러 항생제에 내성이 있어 이러한 병원체로부터의 감염은 병원과 지역사회 환경 모두에서 심각한 문제로 부상하고 있다 [5]. 특히 약물 내성 병원균에 의해 유발되는 피부 감염은 이환율과 사망률의 빈번한 원인으로 인해 임상적 문제를 나타낸다. 치유되지 않는 상처로 인한 합병증으로는 패혈증, 장기 입원, 만성 통증 또는 사지 절단 등이 있다. 상처 감염은 훨씬 더 심각한 합병증과 높은 사망률과 관련이 있다. 여러 박테리아 종이 상처 감염의 원인이 될 수 있으며 녹농균과 황색포도상구균이 가장 흔하다[6].

최근 수십 년 동안 산업, 농업, 의료 및 일반 가정의 편의를 개선하는 수많은 의약품의 생산, 사용 및 폐기로 인해 인간 및 생태계 건강에 미치는 잠재적인 악영향에 대한 우려는 점점 커져가고 있다. 따라서 의약품에 대한 위험성 평가가 꾸준히 필요한 실태이다. 화학물질이 환경 유기체에 미치는 영향을 평가하기 위한 표준화된 테스트가 이러한 목적으로 널리 사용되었다. 박테리아와 같은 환경 유기체에 대한 화학물질의 영향을 평가하기 위한 테스트는 그 결과가 환경 위험 평가에 사용될 수 있기 전에 평가되어야 할 것이다. 항생제는 인간 및 수의학, 축산업 및 양식업에 사용되는 가장 중요한 화합물 중 하나로 투여 후 항생제는 종종 활성 화합물로 그대로 배설된다. 활성 화합물은 병원 폐수 및 도시 하수를 통해 하수 처리장(STP)에 도달하는데, 그 주변의 토양에서도 항생제가 검출되고 양식업에 사용된 후 퇴적물에도 존재한다. 항생제는 이렇게 물, 퇴적

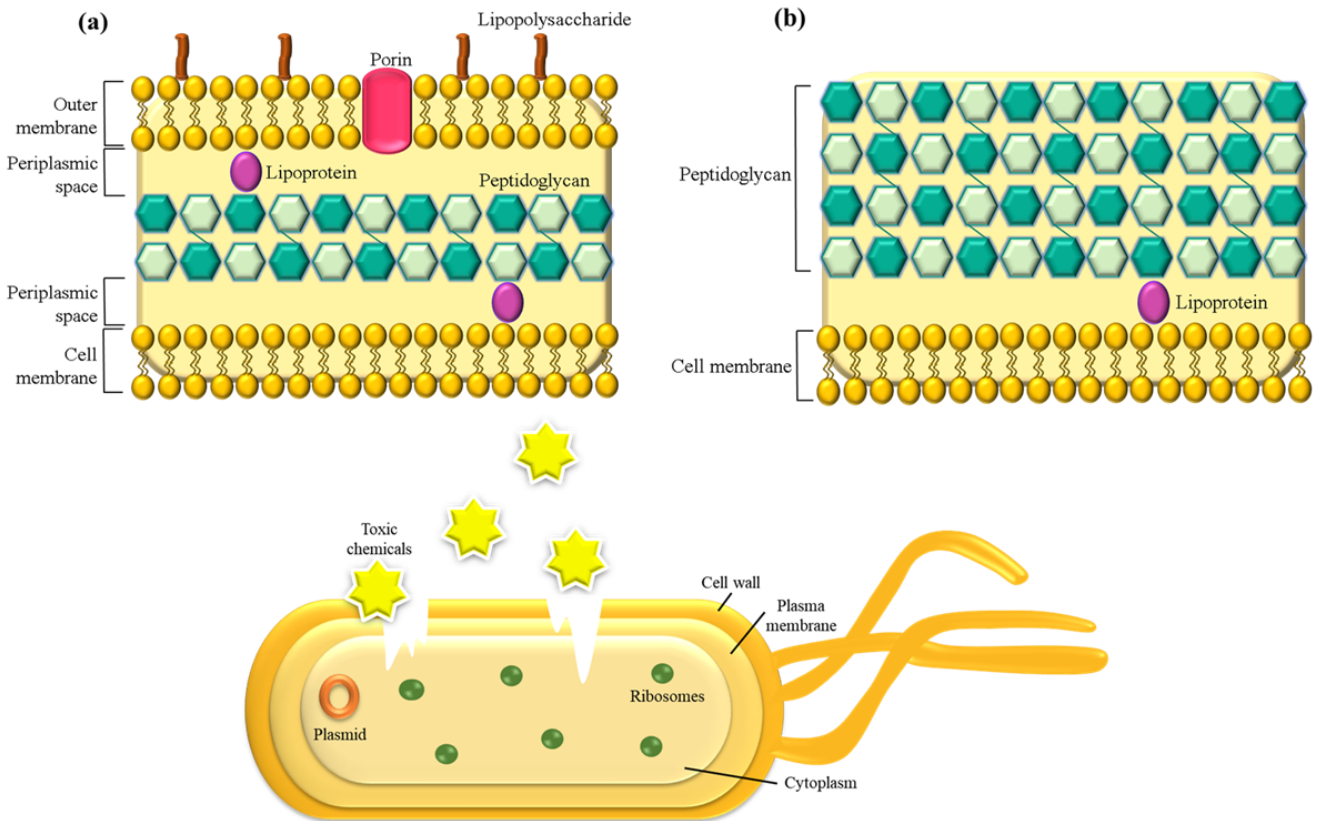


Figure 1. (a) Cell wall of gram-negative bacteria, (b) Cell wall of gram-positive bacteria, (c) Bacterial cell wall damaged after reaction with toxic chemicals.

물, 토양에서는 쉽게 생분해되지 않는다는 단점을 가지고 있다 [7]. 유해 화학물질은 막 구조와 기능에 대한 제노바이오틱스의 비특이적 작용을 통해 박테리아의 성장에 영향을 미칠 수 있다. 박테리아 막은 세포 외 환경과 접촉하기 때문에 독성 효과가 먼저 발휘될 수 있는 취약한 지점이다. 유해 화학물질이 있는 환경에서 성장하는 동안 박테리아 배양은 성장 속도와 생존 능력이 감소할 뿐만 아니라, 막 유동성과 전도도의 변화를 야기할 수도 있다[8]. 프로피온산, 벤조산, 소르브산과 같은 강력한 항진균 특성을 가진 유기산은 해리되지 않은 형태로 세포막을 통과하고 세포질에서 수소를 방출하게하는 능력에서 비롯되는데, 결과적으로 세포질 pH의 감소 또는 pH 감소에 저항하고 항상성을 유지하기 위한 ATP의 사용은 세포의 성장을 감소시키거나 멈추게 한다[9]. 이처럼 유해 화학물질의 사용은 세포막을 투과하여 성장을 저해하고 활성을 잃게 만든다.

이로부터 본 연구에서는 박테리아를 살균할 수 있는 가능성을 제시하기 위해서 박테리아에 각각의 유해 화학물질을 농도별로 처리했을 때 박테리아가 자랄 수 없는 성장 저해 최소 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 정량적인 데이터로 구하기 위한 실험을 진행하였다. 가장 널리 사용되는 박테리아 내성 검출 방법으로는 디스크 확산 검사(Disk diffusion), 액체 배지 미량 희석법(Broth micro-dilution method, BMD) 및 자동화 기기와 같은 방법들이 있다. 항균제 감수성 테스트(Antimicrobial susceptibility test, AST)는 일반적으로 박테리아 집락의 성장을 얻는 데 최소 24시간이 걸리고 생화학적 식별 및 표현형 AST를 얻는 데 추가로 24시간이 걸린다. MIC은 배양 후 미생물의 성장을 억제하는 최소 약물 농도로 정의된다 [10,11]. AST에 가장 일반적으로 사용되는 방법은 디스크 확산 검사 또는 BMD에서의 배양에 기반한 기존의 표현형 방법이다 [12]. 여기서 BMD는 박테리아의 성장을 저해시키는 최소 농도인 MIC뿐만 아니라 박테리아의 99.9%를 사멸시킬 수 있는 최소 농도인 최소 살균 농도(Minimal bactericidal concentration,

MBC)를 동시에 찾을 수 있다는 장점이 있다. 또한, MIC 농도에서는 박테리아의 생장이 이루어지지 않기 때문에 실험이 끝난 후 육안으로도 MIC을 파악하기 쉽다는 점에서 접근성도 우수하다. 이로부터 본 연구에서는 BMD 방법을 이용하여 박테리아의 MIC 값을 알아낼 수 있었고, 육안으로도 쉽게 확인이 가능하였다.

환경 스트레스는 일반적으로 박테리아의 생리학적 상태에 부정적인 영향을 미치는 외부 인자로 정의된다. 박테리아는 온도 변화, pH 변화, 배고픔 등의 다양한 스트레스 조건에 노출된다. 이러한 스트레스는 박테리아의 성장 속도를 감소시킨다 [13]. 본 실험에서는 다양한 유해 화학물질을 활용하여 박테리아에게 의도적으로 스트레스를 주어 그 영향력을 관찰하고 물질에 따른 각각의 감수성을 파악하고 분석하는 실험을 진행하였다. 먼저 성장 곡선을 이용하여 박테리아의 성장 양상을 관찰하였고, 이를 토대로 BMD를 이용하여 유해 화학물질에 대한 박테리아의 생장이 어떤 농도에서 얼마나 저해되는지를 그래프로 그려보았다. MIC 측정을 통해 박테리아에 대한 유해 화학물질의 독성을 평가하였고, 이러한 결과로부터 자연 환경에서 쉽게 접할 수 있는 유해 박테리아에 대한 살균 메커니즘을 제시하고 각 유해물질의 종류와 농도에 대하여 박테리아의 성장저해최소농도에 대한 기준을 확립할 수 있었다.

이러한 각 유해 화학물질이 동물 및 인간에게 미치는 영향에 대해서 알아보았다. 첫 번째, 과산화수소는 인간이 일반적으로 마시는 여러 음료(녹차, 홍차와 인스턴트 커피 등)에 100 μM 이상의 농도로 함유되어 있다. 음료 섭취 시, 과산화수소는 구강과 상부 위장관의 세포로 확산될 것으로 추정된다. 구강 세균도 과산화수소를 생성한다. 침으로 방출된 과산화수소가 Salivary peroxidase에 의해 CNS-를 특정 세균 균주에게 독성이 있는 생성물로 산화시키는 것이 제안되었다. 또한, 인간이 호흡하여 내뿜은 공기에도 과산화수소가 존재한다. 인간의 소변에서도 때로 100 μM를 초과하는 농도의 과산화수소가 감지된

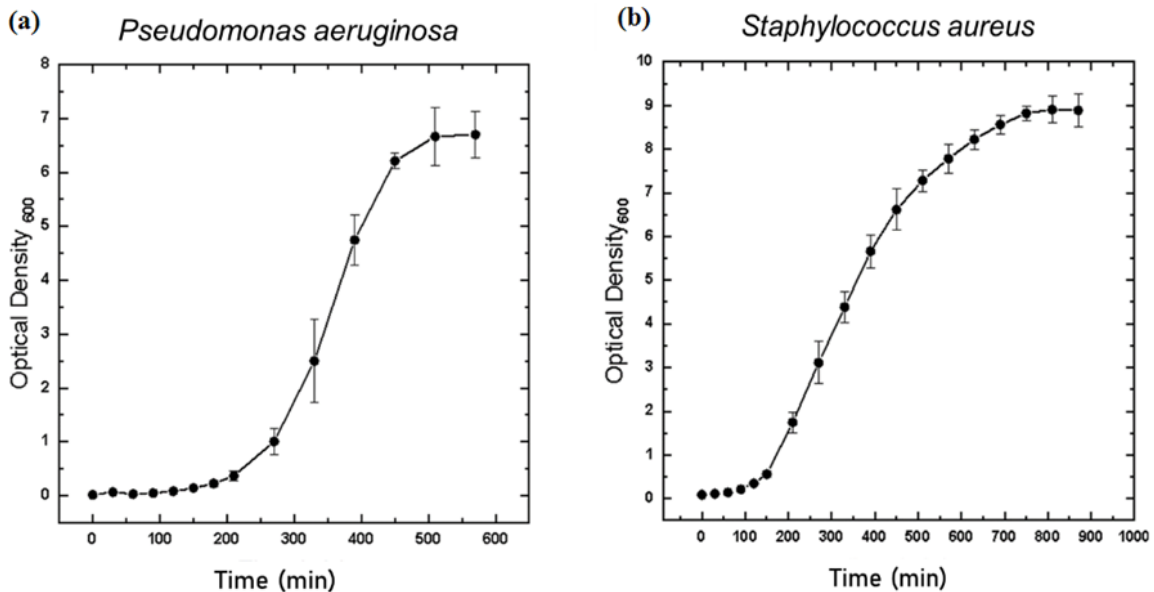


Figure 2. (a) Growth curve result of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, (b) Growth curve result of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4.

다. 결론은, 과산화수소는 유비퀴티스 분자로서 인간은 과산화수소에 노출되어 있고 심지어 몸 안에서 생성하기도 한다[14].

두 번째, 아세트산은 인간의 음식이나 음료에도 일반적으로 포함되어 있다. 2세 이상 사람의 평균 일일 섭취량은 아세트산 2.1 g으로 계산되었다. 아세트산은 더 나아가 에탄올의 주요 대사산물로서 알코올 음료를 통한 인간의 일일 섭취량은 아세트산의 식이 섭취량을 몇 배나 초과하기도 한다. 흡입 노출에 대한 인체 독성 데이터가 없는 경우 최대 노출 수준은 $2 \text{ h} \times 10 \text{ ppm}$ (25 mg/m^3)으로 선택되었다. 이는 폐 환기를 25°C 로 가질 때 최악의 경우 아세트산 0.075 g의 흡수 선량에 해당한다. 따라서, 아세트산의 체내 부담에 대한 흡입에 의한 기여는 식이 섭취에 의한 것보다 적고 정상적인 대사 및 음용 후 에탄올의 생물학적 변환에 의해 내생적으로 생성되는 양에 비해 무시할 만한 양이다[15].

세 번째, 포름산은 실제로 물 사료 및 사일리지에 첨가제로서의 유용성을 가지고 있어 농업에 응용되어 왔다. 고체 및 액상 형태의 소듐포르메이트산은 모든 동물종과 소비자, 환경에 대해 안전하다고 여겨졌다. 평가에 따르면, 사료당 최대 10,000 mg 포름산 당량/kg의 농도는 모든 동물종에 대해 안전하다고 판단되었으며, 12,000 mg 포름산 당량/kg의 농도는 돼지에 대해 안전하다고 여겨졌다[16].

네 번째, 아이소프로필알코올(IPA)의 독성은 일반적으로 섭취 후 발생하지만(성인의 치사량은 240 mL로 보고됨) 흡입 및 피부 흡수 후의 독성이 보고되었다. IPA 중독의 증상 및 징후에는 두통, 현기증, 운동 실조, 저혈당증, 복통, 메스꺼움, 구토 및 토혈이 포함된다. 급성 독성과는 별개로, 동물 연구(*in vivo*)에 따르면 IPA에 대한 노출은 인체 건강에 대한 잠재적 위험이 낮다. 생식에 악영향을 미치지 않으며, 유전 독성, 태아 독성 또는 발암성의 위험은 없다[17].

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

그람 음성균과 그람 양성균에 대한 물질의 MIC를 측정하기 위하여 비교균으로 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*를 사용하였다. 세포 배양을 위해 LB 배지(Luria-Bertani broth)를 사용하였다. 20 g/L 비율에 맞게 14 g을 정량하고 700 mL의 삼차 증류수를 섞어 배지를 만들었다. 그리고 유해 화학물질 검사를 위해서는 22 g/L Mueller Hinton 배지(Mueller Hinton Broth, MHB)를 사용하였다. MIC 측정을 위한 박테리아 샘플 준비 시에는 충분한 워싱 과정을 통해 MHB 배지로 배지 교환을 하였다. 본 실험에서 사용된 네 가지의 유해 화학물질은 과산화수소(Hydrogen peroxide (Roam Chemie)), 아세트산(Acetic acid(Sigma-Aldrich)), 포름산(Formic acid(Sigma-Aldrich)), 아이소프로필 알코올(Isopropyl alcohol, IPA(Sigma-Aldrich))이다. 각 물질은 제조된 후 4°C 에서 냉장 보관되었다. 생장 곡선에서의 박테리아의 성장 정도는 UV-Vis Spectrophotometer(OPTIZEN)를 사용하여 측정되었다. 그리고 20시간 동안 배양한 BMD의 결과 측정을 위해서 615

에서 다기능 효소 면역 분석기(Multi Label Reader, HTS(Perkin Elmer))를 사용하였다.

2.2 유해 화학물질(Toxic chemicals)

본 실험에서 사용된 첫 번째 유해 화학물질은 과산화수소(Hydrogen peroxide)이다. 과산화수소는 소독에 특화된 용도로 일반적으로 낮은 생태 독성을 가지고 있고 살균제나 방부제로 사용할 수 있는 강력한 산화제이다. 과산화수소는 강력한 살균 작용과 표백 작용으로 여러 종류의 식품 공업에도 이용될 뿐만 아니라, 물과 산소로 분해되어 생태 환경에 악영향을 미치는 부산물의 발생이 없고 2차 공해의 염려가 없으므로 용수 및 폐수 처리, 양식 등 수질 환경 개선 분야에도 널리 이용되고 있다. 또한, 과산화수소는 그람 양성 및 그람 음성 박테리아, 진균 및 내생포자에 대해 작용하며 넓은 범위에 대한 활성을 가진다[18-20].

두 번째 유해 화학물질은 아세트산(Acetic acid)이다. 저농도의 아세트산은 강력한 방부제로 사용된다. 살균제로 약유기산을 이용하는 것은 박테리아에서 약물 내성 발달을 유발하지 않기 때문에 항생제에 비해 많은 이점이 있다. 이 연구의 결과는 화학적 치료가 효과적이지 않거나 상처 치유를 방해하는 극심한 상처 감염의 치료를 위한 새로운 방법론의 개발에 유용하게 쓰일 것이다[21].

세 번째 유해 화학물질은 포름산(Formic acid)이다. 포름산은 pka 값이 3.75인 약산으로 액상으로 존재하며 물에 쉽게 용해된다. 또한, 인간의 공중 보건 문제와 관련된 병원성 유기체를 제한할 수 있다[22]. 2006년 유럽에서 가축사료 첨가제로 항생제 사용을 금지한 이후로 유기산이 대안으로 떠올랐고 현재까지도 널리 사용되고 있다. 이 중 포름산은 몇 년 동안 가축 사료 첨가제 및 사일리지 산성화제로 쓰여 왔고, 가축 사료에서 병원균을 제한하는 용도로 사용되었다. 포름산은 살모넬라 종 및 기타 병원체에 대해 비교적 효과적인 항균제인 것으로 나타났다. 포름산은 효모를 억제하거나 죽일 수 있으며 대장균에도 효과를 보이는 것으로 나타났다[23,24].

네 번째 유해 화학물질은 IPA(Isopropyl alcohol)이다. 알코올은 소독제 및 방부제로 쓰이는 화학 약품으로, 세포의 대사를 억제하는 단백질을 빠르게 변성시키고 세포의 용해를 유도하는 막을 파괴함으로써 작용한다. 이 중 에틸알코올(ethanol)과 이소프로필알코올(Isopropyl alcohol, IPA)는 소독용으로 유용하게 쓰이는 두 가지 알코올이다. 1947년 에틸 알코올이 환자의 가래에 있는 결핵균을 죽이는데 효과적인 약제임이 입증되었다. 이소프로필알코올은 제약 회사, 병원 및 살균실에서 쓰이며 박테리아를 효과적으로 제거할 수 있다[25].

2.3 액체 배지 미량 희석법(Broth-micro dilution, BMD)

BMD는 96-웰 플레이트(well plate)에 연속 희석법(serial dilution method)을 이용한 유해 화학물질의 농도 구배를 주어 박테리아의 생장을 저해시킴으로써 생장이 저해되는 정도를 비교하여 MIC를 구하는 방법이다. 유해 화학물질을 취한 플레이트에

각각 같은 양의 세포 용액을 넣어주고 37°C 배양기에서 20시간 동안 배양해준 뒤, 플레이트를 꺼내면 박테리아가 자란 부분은 탁해진 것을 육안으로도 쉽게 확인할 수 있다. 실험을 진행하기에 앞서, 박테리아에 여러 농도의 유해 화학물질을 처리했을 때 자라는 양상을 확인하기 위해서 연속 희석법을 통해 각 유해 화학물질별로 다른 농도를 만들어주었다. 농도 범위에 대한 설정 기준은 박테리아의 종류와 유해 화학물질의 종류에 따라 달라지며 BMD에서의 MIC 값이 그래프의 중앙에 오도록 설정해주었다.

96-웰 플레이트와 네 가지의 유해 화학물질들, OD₆₀₀에서 흡광도가 0.002로 맞춰진 세포 용액을 준비했다. 먼저 플레이트에 가장 고농도의 물질을 각각 100 µL씩 넣어주고 그 밑 행부터는 차례대로 배지(MHB)를 50 µL씩 넣어주었다. 그리고 다시 고농도의 물질을 멀티 피펫로 50 µL씩 차례대로 연속 희석법을 진행해주었다. 실험은 고농도로부터 차례대로 10번 희석된 물질들과 대조군이였다. 대조군은 실험 결과가 제대로 나왔는지 진위를 파악하기 위해 넣은 화학물질이 포함되지 않은 상태이다. 박테리아의 성장이 어느 정도부터 저해되기 시작하는지를 측정하여 그 시작 농도를 MIC으로 선정했다. 플레이트는

20시간 동안 37°C 배양기에서 배양되며 이의 결과는 615 nm에서 다기능 효소 면역 분석기(Multi Label Reader, HTS)를 사용하여 정확한 수치적 데이터를 얻을 수 있었다. 각 물질에 대해 오차를 줄이고 정확한 값을 얻기 위하여 수는 3으로 하였고 그로부터 평균값을 구해 MIC를 계산하였다.

2.4 Growth curve

실험에 앞서 오염(contamination)의 위험을 방지하기 위해 각 플라스크에 Mueller Hinton 액체 배지를 19 mL씩 넣어주고, 배지를 포함한 플라스크를 멸균 처리를 해주었다. 플라스크에 들어가는 총 용량은 20 mL, 액체 배지를 19 mL만 넣어주는 이유는 나머지 1 mL는 처리할 독성 물질과 세포 용액이 채워질 것이기 때문이다. 먼저 플라스크의 총 부피 20 mL에 대해서 흡광도(optical density, O.D) 값이 0.02가 될 수 있도록 맞춰 세포 용액을 넣어주었다. 박테리아의 순수한 성장 양상을 파악하기 위해 독성 물질이 들어가지 않은 상태로 성장 곡선을 그려보았다(Figure 3). 이로부터 박테리아의 시간에 따른 성장하는 정도를 실시간으로 관찰할 수 있으며 바로 값을 대입하면 그래프가 나온다는 장점이 있다. 계대 배양한 세포 용액은 O.D 값이 1.0-2.0

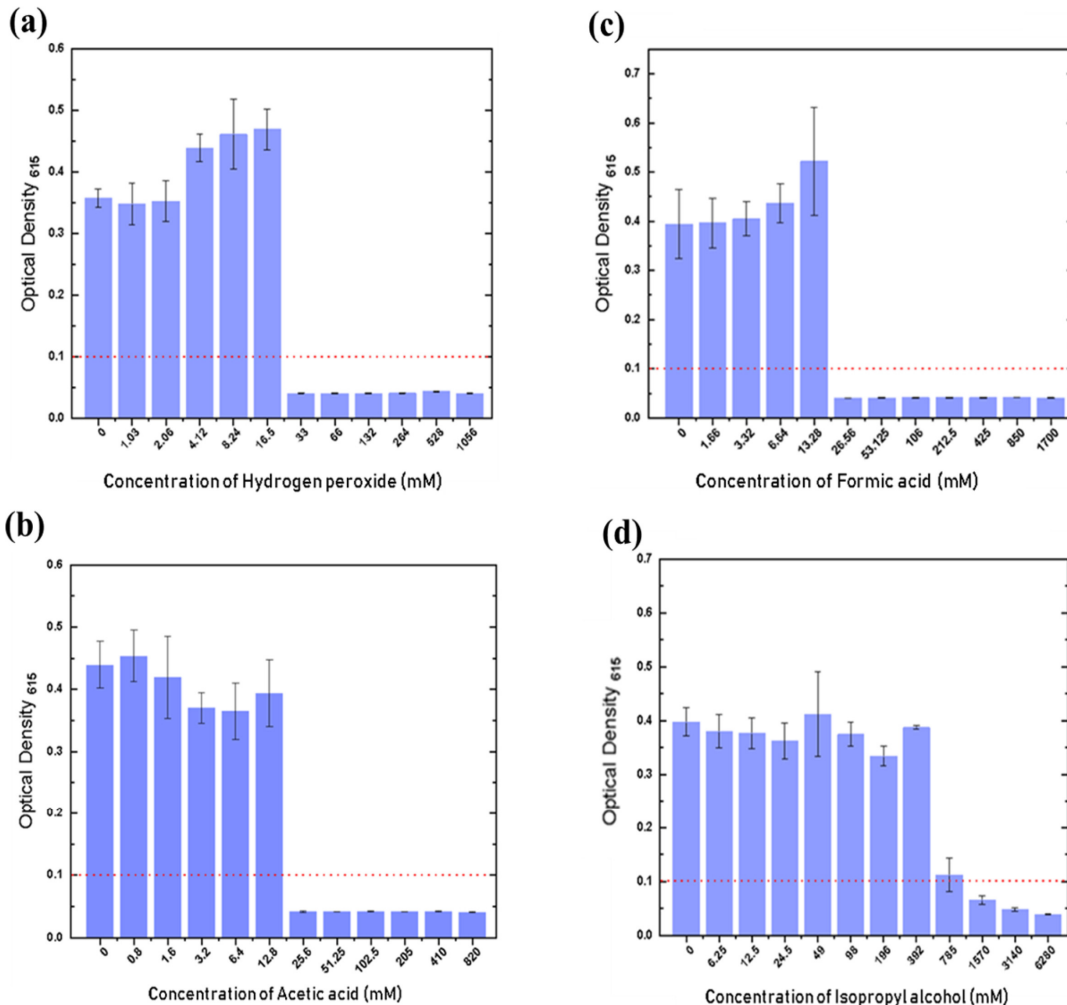


Figure 3. Broth micro dilution results of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 with (a) Hydrogen peroxide, (b) Acetic acid, (c) Formic acid, (d) Isopropyl alcohol.

사이 정도가 될 만큼 225 rpm의 37°C의 진탕 배양기(shaking incubator)에서 유도기(lag phase)로부터 정지기(stationary phase)까지 총 12시간 동안 실험이 진행되었다. 실험 초반에는 O.D 값은 30분마다 측정되었지만, 정지기로 입성하여 O.D 값이 1이 넘어가는 시점부터는 1시간마다 측정되었다. 흡광도를 측정하기 위해 플라스크와 큐벳(cuvette)을 준비하고 플라스크가 오염되지 않게 알루미늄 호일을 위로 뒤집지 않고 조심스럽게 열어 1 mL씩 큐벳 안에 넣어주었다. 여기서 O.D 값이 1을 넘어가면 세포의 양이 과다하여 서로 중첩되어 탁도가 심해져 빛 투과가 방해된다. 그로부터 오차가 커져 값이 정확하지 않을 수 있어 1/10으로 배지와 희석해서 사용하였다. 그리고 자외/가시선 분자 흡광기(UV-Vis spectrometer) 뚜껑을 열고 빛이 통과하는 방향에 맞게 큐벳을 준비한 n수 만큼 넣어주었다. 측정은 OD₆₀₀에서 진행되는데 이는 박테리아의 최대 흡광도가 600 nm에 있기 때문이다. 각 물질에 대해 정확한 값을 얻기 위하여 n수는 4로 하여 평균값을 구하고 표준편차를 상정해 성장 곡선을 그려주었다.

2.5 Doubling time

배가시간(doubling time)은 주로 미생물이나 배양 세포계에서 사용되는 용어로 세포 집단의 생물체량의 농도가 배가 되는데 필요한 시간을 일컫는다. 실험 초기의 미생물의 개체 수를 N_0 , t 분이 지난 후의 미생물의 개체 수를 $N(t)$, 배가시간을 d라고 하면 $N(t) = N_0 \times 2^{(t/d)}$ 가 성립한다. 초기 세포의 개수를 세고 특정 시간이 지난 후에 세포의 개수를 잰 후, 배가시간을 구할 수 있다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Growth curve의 결과 비교 및 분석

박테리아의 성장 곡선을 통해 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 성장 양상을 그래프로 나타낼 수 있었다. 두 성장 곡선으로부터 각각의 대수기(exponential phase)를 취득하여 그에 따른 배가시간을 계산하였다. 본 실험에서 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1의 성장 곡선에서는 시간(가로축)이 0-600 min이고 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 성장 곡선에서는 시간(가로축)이 0-1000 min으로 다르다. 이는 성장 곡선을 정지기(stationary phase)까지 측정했기 때문으로 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 정지기가 더 늦게 찾아왔기 때문이다. 배가시간을 계산하기 위하여 시간에 따른 흡광도를 이용하여 배가시간 T_d 를 도출하였다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1는 90분에서 450분까지의 타임 포인트를 대수기로 잡아서 배가시간은 44.43 min으로 도출되었다. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 150분에서 510분까지의 타임 포인트를 대수기로 잡아서 배가시간은 91.20 min으로 도출되었다. 이러한 결과로부터 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 배가시간이 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 비교했을 때 2배 가까이 느리다는 것을 알 수 있었다. 성장 곡선의 기울기에도 차이가 있었는데 이러한 기울기는 분열하는

속도에 연관되어 있으므로, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1이 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4보다 훨씬 빠르게 자랐다는 사실을 알 수 있었다.

3.2 Hydrogen peroxide에 대한 MIC 측정 및 비교

첫 번째 물질은 과산화수소(Hydrogen peroxide)이다. 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 대상으로 과산화수소에 대한 BMD를 수행하고 그 결과를 각각 Figure 3(a), 4(a)에 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1는 과산화수소 농도 16.5 mM까지는 잘 자라다가, 33 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 과산화수소 농도 16.5 mM까지는 잘 자라다가, 33 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. 결과적으로 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1의 Hydrogen peroxide에 대한 MIC 값은 33 mM로 확인되었다(Figure 3(a)). *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 Hydrogen peroxide에 대한 MIC 값은 33 mM로 확인되었다(Figure 4(a)).

저농도의 과산화수소는 세포막을 파괴하고 DNA를 산화시키며 효소와 단백질을 불안정하게 만든다. 과산화수소는 약물 내성 박테리아가 서식하는 만성 상처 감염 부위에 처리되어 괴사된 조직을 제거하는데 사용되는 살생물제로 쓰인다. 상처 부위의 생물막은 살생물제의 치료 효능을 방해할 수 있지만 다양한 살생물제 중에서 특히 과산화수소는 생물막을 제거하고 상처 치유를 자극하는 고유한 잠재적 특성을 가지고 있다[26].

3.3 Acetic acid에 대한 MIC 측정 및 비교

두 번째 물질은 아세트산(Acetic acid)이다. 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 대상으로 acetic acid에 대한 독성 평가 실험을 수행하고 그 결과를 각각 Figure 3(b), 4(b)에 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1는 acetic acid 농도 12.8 mM까지는 잘 자라다가, 25.6 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 acetic acid 농도 25.6 mM까지는 잘 자라다가, 51.25 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. 결과적으로 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1의 acetic acid에 대한 MIC 값은 25.6 mM로 확인되었다(Figure 3(b)). *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 Acetic acid에 대한 MIC 값은 51.25 mM로 확인되었다(Figure 4(b)).

아세트산은 시트르산(Citric acid), 히알루론산(Hyaluronic acid), 하이포아염소산(Hypochlorous acid, HClO), 포름산(Formic acid)과 더불어 유기산의 한 종류로서, pH 민감성을 토대로 박테리아에 작용하여 생리 작용을 방해하고 유기산은 박테리아 내부 pH를 떨어뜨려 세균의 성장을 방해한다[27]. 유기산은 종류에 따라 병원성 박테리아 억제 효과에 차이가 있다. 유기산은 자연상에서 두 가지 형태를 가지는데, 비교적 안정한 구조체인 이합체 구조(dimeric form) 혹은 단량체 구조(monomeric form)

를 가진다. 유기산은 단량체 구조보다 이합체 구조가 더 안정적이기 때문에 대부분의 유기산은 이합체 구조를 띠고 있다. 하지만, 박테리아에 대한 살균력은 단량체 구조가 이합체 구조보다 더 우수하다. 또한, 단량체 구조는 불안정하기 때문에 수소 이온(H⁺)을 내놓아 해리된 상태로 쉽게 변할 수 있다. 이러한 해리 정도는 같은 물질에서도 pH가 높아짐에 따라 해리된 상태로 존재하는 경향성이 높아진다. 따라서, 유기산을 비교할 때 같은 pH에서의 해리된 정도를 비교하면 어떠한 유기산이 더 효과적으로 살균 작용을 할 것인지 짐작할 수 있다.

3.4 Formic acid에 대한 MIC 측정 및 비교

세 번째 물질은 포름산(Formic acid)이다. 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1과 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 대상으로 formic acid에 대한 독성 평가 실험을 수행하고 그 결과를 각각 Figure 3(c), 4(c)에 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1는 formic acid 농도 13.3 mM까지는 잘 자라다가, 26.6 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 formic acid 농도 26.6 mM까지는 잘 자라다가, 53.125 mM부

터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. 결과적으로 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1의 formic acid에 대한 MIC 값은 26.6 mM로 확인되었다(Figure 3(c)). *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 formic acid에 대한 MIC 값은 53.125 mM로 확인되었다(Figure 4(c)).

아세트산(acetic acid)과 더불어 포름산은 유기산으로서 박테리아와 같은 병원균의 살균에 효과적으로 사용될 수 있다. 대장균(E-coli), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 등의 유해 박테리아의 증식을 위한 최적 pH는 7.0 정도인 반면, 장내 유익균인 유산균(*Bifidobacterium Infantis*), 엔테로코키(*Enterococci*)와 소화 작용을 하는 부티리비브리오 피브리솔반스(*Butyrivibrio fibrisolvans*) 등의 증식을 위한 최적 pH는 6.0 정도로 유해 박테리아의 최적 서식 환경보다 더욱 산성 환경이다. 유기산제는 사료 및 위장관 내 pH를 낮추어 주어 유익한 박테리아가 증식하기 좋은 환경을 유지하는데 기여한다. 또한, 유기산은 비해리 상태에서 pH에 민감한 미생물(대부분의 유해 박테리아)의 내부로 침투하여 증식을 억제하고 독성을 유발하여 유해 박테리아를 죽인다. 그러나, pH에 민감하지 않은 미생물(대부분의 유익한 박테리아)에게는 독성을 나타내지 않으며 오히려 증식

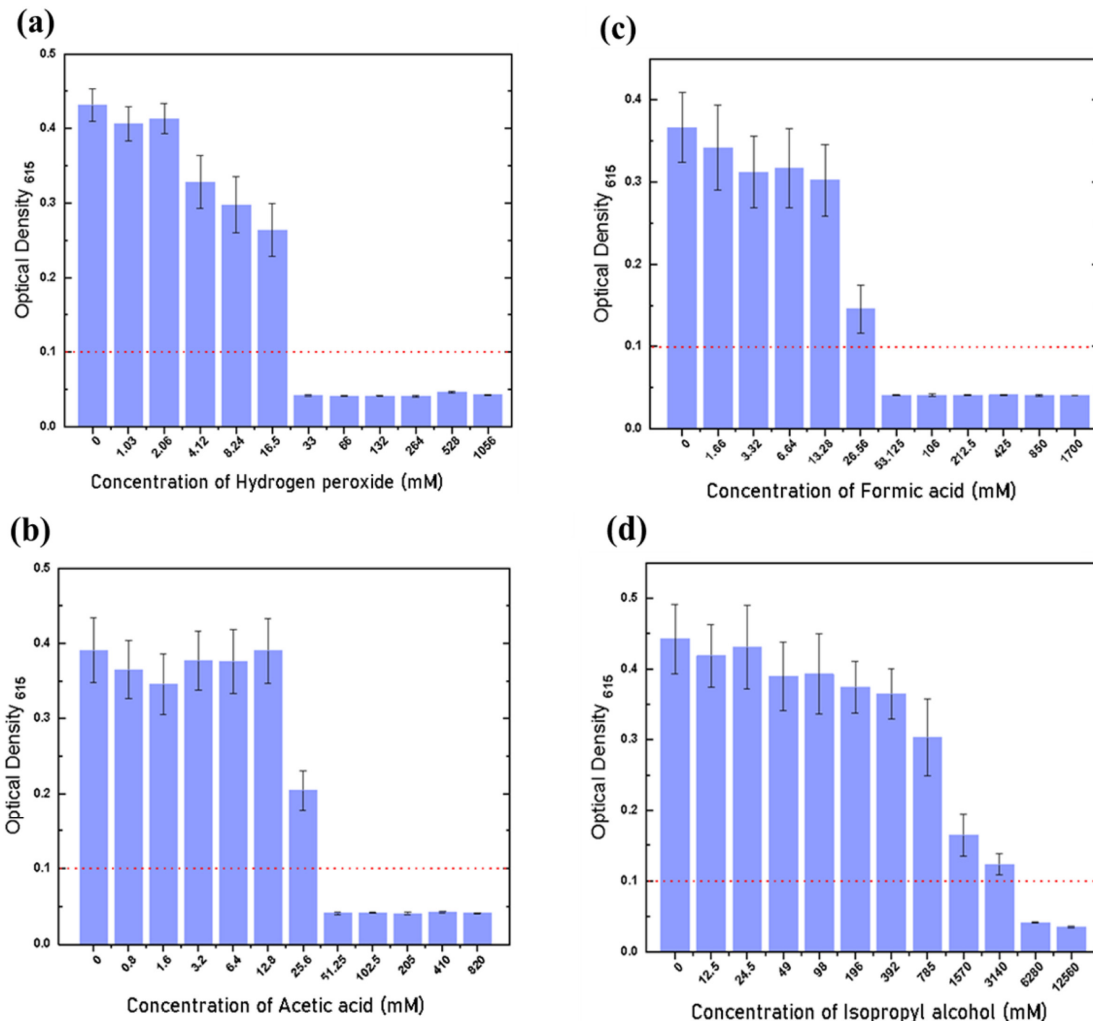


Figure 4. Broth micro dilution results of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4 with (a) Hydrogen peroxide, (b) Acetic acid, (c) Formic acid, (d) Isopropyl alcohol.

하기 좋은 환경을 만들어 준다. 이로부터, pH에 민감하지 않은 박테리아를 이용하여 유기산을 분해하는 방안이 제시될 수 있다. 본 실험에서 사용된 두 종류의 유기산인 아세트산과 포름산은 세균의 성장을 저해시키는 최대 농도인 MIC 결과값의 차이가 크지 않은 것으로 확인되었다.

3.5 Isopropyl alcohol(IPA)에 대한 MIC 측정 및 비교

마지막 네 번째 물질은 IPA(Isopropyl alcohol)이다. 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 대상으로 IPA에 대한 독성 평가 실험을 수행하고 그 결과를 각각 Figure 3(d), 4(d)에 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1는 IPA 농도 392 mM까지는 잘 자라다가, 1570 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 IPA 농도 3140 mM까지는 잘 자라다가, 6280 mM부터 거의 자라지 못하는 양상을 확인할 수 있다. 결과적으로 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1의 IPA에 대한 MIC 값은 1570 mM로 확인되었다(Figure 3(d)). *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4의 IPA에 대한 MIC 값은 6280 mM로 확인되었다(Figure 4(d)).

99.9%의 IPA는 순수한 이소프로판올이고 70%의 IPA는 30% 정제수로 희석된 순수한 이소프로판올이다. 70% IPA는 단백질을 변성시키고 지질을 용해시켜 유기체를 죽이고 대부분의 박테리아, 곰팡이 및 많은 바이러스에 효과적이다. 순수한 IPA 용액(99.9%)을 사용하면 표면 또는 세포벽 단백질이 바로 응고되어 알코올이 세포벽을 통과하지 못하고 막혀버리게 되므로 살균 효과를 거의 보지 못한다. 또한, 99.9% IPA는 휘발성이 매우 강하기 때문에 세포벽을 통과하기도 전에 매우 빠르게 증발하여 살균 효과를 거의 보지 못한다고 한다[28]. 이로부터 IPA에 대한 박테리아의 저항도는 그람 양성균과 그람 음성균 모두 다 강하다는 것을 알 수 있다. 이로부터 IPA는 다른 유해 화학물질에 비해 독성이 약하다는 것을 짐작할 수 있었다.

3.6 BMD에서의 MIC 결과 비교 및 분석

BMD 실험에서 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 독성 물질의 MIC 값은 각각 Acetic acid에서는 25.6 mM, Hydrogen peroxide에서는 33 mM, IPA에서는 1570 mM, Formic acid에서는 26.56 mM로 나왔다. 그리고 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*에 대한 독성 물질의 MIC 값은 각각 Acetic acid에서는 51.25 mM, Hydrogen peroxide에서는 33 mM, IPA에서는 6280 mM, Formic acid에서는 53.125 mM로 나왔다. BMD 실험에서 MIC 값은 Hydrogen peroxide를 제외하고는 각 독성 물질마다 2배에서 크게는 4배까지 차이가 나며, *Staphylococcus aureus*에서의 MIC 값이 *Pseudomonas aeruginosa*보다 전체적으로 더 높게 나왔다. 이러한 결과를 분석해보았을 때, 그람 양성균이 세포벽을 이루는 펩티도글리칸층의 두께가 두껍다는 점에서 그람 음성균에 비해 더 독성에 강할 것(toxic-resistant)임을 짐작할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구는 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 이용해 독성 물질의 농도 구배에 따른 박테리아의 성장 양상을 비교하고 성장 곡선을 그려봄으로써 그람 음성균과 그람 양성균의 성장 차이를 구분하고 BMD를 통해 어느 농도에서 박테리아의 생장이 저해되었는지 보여주는 MIC을 구하는 방법을 제시하였다.

먼저, 유해 화학물질의 농도 구배를 통해 MIC 값을 구하기 위해 BMD 방법을 채택하였다. 여기서 BMD는 박테리아의 성장을 저해시키는 최소 농도인 MIC뿐만 아니라 박테리아의 99.9%를 사멸시킬 수 있는 최소 농도인 최소 살균 농도(Minimal bactericidal concentration, MBC)를 동시에 찾을 수 있다는 장점이 있다. 또한, MIC 농도에서는 박테리아의 생장이 이루어지지 않기 때문에 실험이 끝난 후 육안으로도 MIC을 파악하기 쉽다는 점에서 접근성도 우수하다.

박테리아에 사용한 유해 화학물질은 Hydrogen peroxide, Acetic acid, Formic acid, IPA의 네 가지이다. 플레이트는 20시간 동안 인큐베이터 내에서 배양되며 배양 후에는 다기능 효소면역 분석기(HTS Multi Label Reader)를 사용하여 정확한 수치적 데이터를 얻을 수 있었다.

BMD 실험에서 MIC은 Hydrogen peroxide를 제외하고는 각 유해 화학물질마다 2배에서 크게는 4배까지 차이가 나며, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4에서의 MIC이 더 높게 나왔다. 이로부터 그람 양성균이 세포벽의 두께가 두껍다는 점에서 그람 음성균과 비교했을 때 더 독성에 강할 것(toxic-resistant)임을 짐작할 수 있었다. 따라서, 박테리아에 유해 화학물질을 처리했을 때 같은 물질이라 하더라도 세균의 종류에 따라 미치는 영향이 다른 것을 알 수 있었고, 그 핵심적인 원인이 세포벽을 이루는 펩티도글리칸층의 두께 차이임을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 그람 양성균과 그람 음성균의 성장 속도 차이를 비교 및 분석하고 각 독성 물질에 대한 저항률의 차이를 고찰하였다. 또한, 같은 환경적 스트레스 하에서도 더 잘 버틸 수 있는 박테리아의 특징에 대해 알 수 있었다.

박테리아의 종류뿐만 아니라, 같은 박테리아여도 처리된 유해 화학물질의 종류에 따라서 박테리아의 성장을 제한하는 농도가 모두 달랐다. 하지만 전체적으로 과산화수소와 아세트산, 포름산은 비슷한 경향을 보인 반면에 IPA는 다른 물질들과 비교했을 때 60배에서 100배까지도 더 높은 MIC 값을 보였다. 과산화수소, 아세트산, 포름산의 그래프에서 모두 급격한 성장 저해를 보이는데, 항생제를 이용한 균의 반응을 관찰할 때에도 감수성이 높은 경우에는 일정 농도 이상에서 급격한 성장 저해를 보인다. 반면에 내성균과 같이 항생제에 감수성이 낮은 경우, 농도가 증가함에 따라 성장 저해 양상이 점진적으로 증가하는 양상을 보인다. 이에 따라 급격한 성장 저해를 보이는 과산화수소, 포름산, 아세트산의 경우 녹농균과 포도상구균에 대해서 감수성이 높은 경우로 판단되었다[29].

이로부터 IPA는 다른 물질들과 비교했을 때 훨씬 높은 농도

에서 박테리아에 영향을 미침으로써 독성이 더 낮은 물질임을 짐작할 수 있었다. 또한, 본 실험에서 사용된 IPA는 99.9% 순수 IPA였다는 사실로부터 실험 도중 많은 양이 휘발되었을 것이다. 또한, 펩티도글리칸층이 바로 응고되어 알코올이 세포벽을 통과하지 못하고 막혀버리게 되므로 살균 효과를 거의 발휘하지 못했을 것이라고 추정된다.

결론적으로, BMD를 이용하여 빠른 시간 내로 각 유해 물질에 대한 그람 음성균과 그람 양성균의 MIC 값을 정량적으로 구해낼 수 있었다. 이로부터 각 유해물질의 종류와 농도에 따른 주변의 유해 박테리아에 대한 살균 메커니즘을 제시하고 박테리아를 살균하는 최소한의 농도에 대한 기준을 확립할 수 있었다.

감 사

본 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1A2C3004936, NRF-2021R1A5A8032895).

References

- Liu, X., Cai, J., Chen, H., Zhong, Q., Hou, Y., Chen, W., and Chen, W., "Antibacterial activity and mechanism of linalool against pseudomonas aeruginosa," *Micro. Pathog.*, **141**, 103980 (2020).
- Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D., "Antibacterial-resistant pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms," *Clin. Microbiol. Rev.*, **22**, 582-610 (2009).
- Moradali, M. F., Ghods, S., and Rehm, B. H., "Pseudomonas aeruginosa lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 39 (2017).
- Ciofu, O. and Tolker-Nielsen, T., "Tolerance and resistance of pseudomonas aeruginosa biofilms to antimicrobial agents how p. Aeruginosa can escape antibiotics," *Front. Microbiol.*, **10**, 913 (2019).
- Taylor, T. A. and Unakal, C. G., "Staphylococcus aureus Infection," *In Statpearls [internet]*, StatPearls Publishing (2022).
- Novickij, V., Lastauskienė, E., Staigvila, G., Girkontaitė, I., Zinkevičienė, A., Švedienė, J., Paškevičius, A., Markovskaja, S., and Novickij, J., "Low concentrations of acetic and formic acids enhance the inactivation of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa with pulsed electric fields," *BMC microbiol.*, **19**, 1-7 (2019).
- Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J., and Schöll, A., "Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria," *Water Res.*, **38**, 2111-2116 (2004).
- Denich, T., Beaudette, L., Lee, H., and Trevors, J., "Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes," *J. Microbiol. Methods*, **52**, 149-182 (2003).
- Queiroz, O., Arriola, K., Daniel, J., and Adesogan, A., "Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage," *J. Dairy Sci.*, **96**, 5836-5843 (2013).
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., and Ferraro, M. J., "Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices," *Clin. Infect. Dis.*, **49**, 1749-1755 (2009).
- Benkova, M., Soukup, O., and Marek, J., "Antimicrobial susceptibility testing: Currently used methods and devices and the near future in clinical practice," *J. Appl. Microbiol.*, **129**, 806-822 (2020).
- Lei, X., Liu, B., Huang, Z., and Wu, J., "A clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with pseudomonas aeruginosa," *Arch. Dermatol.*, **307**, 49-55 (2015).
- McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., and McDowell, D. A., "Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 211-217 (2007).
- Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H., "Hydrogen peroxide in the human body," *FEBS Lett.*, **486**, 10-13 (2000).
- Ernstgård, L., Iregren, A., Sjögren, B., and Johanson, G., "Acute effects of exposure to vapours of acetic acid in humans," *Toxicol. Lett.*, **165**, 22-30 (2006).
- Ricke, S. C., Dittoe, D. K., and Richardson, K. E., "Formic acid as an antimicrobial for poultry production: A review," *Front. Vet. Sci.*, **7**, 563 (2020).
- Turner, P., Saeed, B., and Kelsey, M., "Dermal absorption of isopropyl alcohol from a commercial hand rub: Implications for its use in hand decontamination," *J. Hosp. Infect.*, **56**, 287-290 (2004).
- Juven, B. J. and Pierson, M. D., "Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation," *J. Food Prot.*, **59**, 1233-1241 (1996).
- Mishra, S. and Imlay, J., "Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?," *Arch. Biochem. Biophys.*, **525**, 145-160 (2012).
- Kim, J. H., "The Toxicity Evaluation of Hydrogen Peroxide to Aquatic Organisms," *J. Environ. Manage.*, **14**, 189-195 (2008).
- Tawre, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Mulani, M. S., and Pardesi, K. R., "Antibiofilm and antipersister activity of acetic acid against extensively drug resistant pseudomonas aeruginosa paw1," *PLoS One*, **16**, e0246020 (2021).
- Ricke, S. C., Dittoe, D. K., and Richardson, K. E., "Formic acid as an antimicrobial for poultry production: A review," *Front. Vet. Sci.*, **7**, 563 (2020).
- Polycarpo, G. V., Andretta, I., Kipper, M., Cruz-Polycarpo, V. C., Dadalt, J. C., Rodrigues, P. H. M., and Albuquerque,

- R. d., "Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance-enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens," *Poult. Sci.*, **96**, 3645-3653 (2017).
24. Nordgren, C. and Berntsen, C., "The effect of formic acid on escherichia coli's susceptibility to different antibiotics," Student Paper, *Norwegian University of Life Sciences*, Viken (2020).
25. Frobisher, Jr, M. and Sommermeyer, L., "A study of the effect of alcohols on tubercle bacilli and other bacteria in sputum," *Am. Rev. Tuberc.*, **68**, 419-424 (1953).
26. Raval, Y. S., Flurin, L., Mohamed, A., Greenwood-Quaintance, K. E., Beyenal, H., and Patel, R., "In vitro activity of hydrogen peroxide and hypochlorous acid generated by electrochemical scaffolds against planktonic and biofilm bacteria," *AAC.*, 01966 (2021).
27. Nagoba, B., Gavkare, A., Rayate, A., Mumbre, S., Rao, A., Warad, B., Nanaware, N., and Jamadar, N., "Role of an acidic environment in the treatment of diabetic foot infections: A review," *World J. Diabetes*, **12**, 1539-1549 (2021).
28. Versalovic, J., "Manual of clinical microbiology," American Society for Microbiology Press (2011).
29. Kang, W., Sarkar, S., Lin, Z. S., McKenney, S., and Konry, T., "Ultrafast parallelized microfluidic platform for antimicrobial susceptibility testing of gram positive and negative bacteria," *Anal. Chem.*, **91**, 6242-6249 (2019).