



초음파 조사에 의한 항생제 내성균 불활성화 및 감수성 변화

Comparison of inactivation and sensitivity of antibiotic resistance bacteria by ultrasound irradiation

이성훈·남성남*·오재일

Sunghoon Lee·Seong-Nam Nam*·Jeill Oh

중앙대학교, 토목공학과, 서울특별시 동작구 흑석로 84, 06974

Department of Civil and Environmental Engineering, Chung-Ang University, 84, Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul, Republic of Korea, 06974

pp. 177-190

pp. 191-204

pp. 205-213

pp. 215-224

pp. 225-234

ABSTRACT

The 20-kHz ultrasonic irradiation was applied to investigate bacterial inactivation and antibiotic susceptibility changes over time. Applied intensities of ultrasound power were varied at 27.7 W and 39.1 W by changing the amplitude 20 to 40 to three bacteria species (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus*). By 15-min irradiation, *E. coli*, a gram-negative bacterium, showed 1.2- to 1.6-log removals, while the gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, showed below 0.5-log removal efficiencies. Antibiotic susceptibility of penicillin-family showed a dramatic increase at *E. coli*, but for other antibiotic families showed no significant changes in susceptibility. Gram-positive bacteria showed no significant differences in their antibiotic susceptibilities after ultrasound irradiation. Bacterial re-survival and antibiotic susceptibility changes were measured by incubating the ultrasound-irradiated samples. After 24-hour incubation, it was found that all of three bacteria were repropagated to the 2- to 3-log greater than the initial points, and antibiotic inhibition zones were reduced compared to ones of the initial points, meaning that antibiotic resistances were also recovered. Pearson correlations between bacterial inactivation and antibiotic susceptibility showed negative relation for gram-negative bacteria, *E. coli*, and no significant relations between bacterial re-survival and its inhibition zone. As a preliminary study, further researches are necessary to find practical and effective conditions to achieve bacteria inactivation.

Key words: Antibiotic susceptibility test, Bacterial inactivation, Diffusion disk, *Escherichia coli*, Ultrasound irradiation

주제어: 항생제 감수성 시험, 세균 불활성화, 디스크 확산법, 대장균, 초음파 조사

1. 서론

항생제(antibiotics)는 생물을 죽이거나 성장을 억제시키는 물질로 만든 약물로서, 사멸시키고자 하는 생물(세균, 곰팡이, 바이러스 등)에 따라 항세균제, 항진균제, 항바이러스제 등으로 일컫는다. 항생(혹은 항균) 효

과는 크게 5가지 기전, 즉, (1) 세포벽 합성 억제, (2) 세포막의 구조와 기능 변화, (3) 세균의 단백질 합성 억제, (4) 세균의 대사 억제, (5) 세균의 핵산대사 방해 등에 의해 나타난다 (Bouki et al., 2013). 항생제 내성은 항생제에 노출된 미생물이 자기복제 과정에서 내성 혹은 저항성(resistance)을 갖는 형질 발현하고, 이 형질을 다른 미생물들에게도 전달해, 동일 항생제에 대하여 미생물들에게 더 이상의 항생 효과가 나타나지 않게 되는 상태

Received 16 April 2019, revised 3 May 2018, accepted 10 May 2019.

*Corresponding author: Seong-Nam Nam(E-mail: namsn76@gmail.com)

를 의미한다. 가장 강력한 항생제에도 약리효과가 나타나지 않는, 이른바 ‘슈퍼박테리아’와 같은 항생제 내성균, 혹은 내성유전자(antibiotics resistance genes, ARGs)의 출현으로 사망률 증가와 치료기간 및 치료비 증가 등과 같은 문제가 국내외적으로 크게 대두되고 있다.

영국 정부가 발표한 ‘항생제 내성 보고서’에 의하면, 세계적으로 연 70만명 이상이 항생제 내성균으로 인하여 목숨을 잃고 있으며, 2050년에는 서울의 인구와 맞먹는 약 1000만명이 사망할 것으로 예측된다 (AMR, 2016; Calero-Cáceres et al., 2014). 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 항생제 내성균을 방지할 경우 인류사회에 큰 재앙이 될 것으로 경고하였으며, ‘글로벌 행동계획(Global Action Plan)’을 제시하고 국가를 초월한 국제사회의 공조를 촉구하였다 (WHO, 2015).

우리나라의 경우, OECD 평균보다 50%이상 많은 항생제가 처방되고 있는데, 이로 인한 내성 세균 발생률도 최근 7년간 최대 3배 이상 증가한 것으로 나타났다. 또한, 축산 업계의 항생제 사용량은 2013년부터 지속적으로 증가하여 현재 연간 약 1,004톤에 이른다. 이처럼 과다한 항생제 사용은 인간 및 가축의 질병치료에 악영향을 미치는 내성균을 촉진하여 심각한 피해를 초래할 것으로 예상된다. 따라서, 우리 정부도 ‘국가항생제 내성 관리대책(2017~2021년)’을 발표하고, 항생제 오남용과 적정사용 등을 포함한 내성균 확산 방지를 위한 노력을 기울이고 있다 (Ministry of Health and Welfare, 2016).

인간 또는 가축 분뇨에 포함된 항생제 내성균은 하수관로를 통하여 하수 처리장으로 이동된 후, 폐수 처리 공정을 거쳐 수환경으로 배출된다. 그러나, 폐수처리 공정에 의해 처리되지 않은 항생제 내성균이나 내성유전자는 환경 중에서 증식 혹은 수평적 유전자 이동(horizontal gene transfer) 등을 통해 복제 등이 일어날 수 있다 (Fahrenfeld and Bisceglia, 2016). 따라서, 항생제 내성균의 완전한 제거를 위한 폐수처리 방안 마련이 더욱 중요하게 되었다.

폐수 처리 공정에서 미생물 불활성화 혹은 소독의 목적으로 쓰이는 공정은 염소 처리, 오존이나 UV 산화, 초음파 조사 등이 있다. 염소 소독이나 오존 산화는 트리할로메탄(Trihalomethanes, THMs)이나 할로아세트산(Haloacetic acids, HAAs), 브롬산염(Bromate, BrO_3^-)와 같은 발암성 소독부산물 생성이나 처리 비용 등의 문제가 있으며, UV 소독의 경우 입자 등의 탁도 물질의 존재

시 소독효과가 현저히 감소하거나 잦은 램프 교체 등의 문제가 있다.

최근 기존의 소독 방법으로 처리하기 어려운 항생제 미생물에 대한 소독 기술의 일환으로 초음파 공정이 연구되고 있으며, 낮은 강도의 초음파 처리를 통한 항생제 효율 증가 및 미생물 성장 억제가 효과적임이 관찰되었다 (Kim et al., 2010). 초음파 처리에 의한 미생물 처리는 수용액에 20~100 kHz의 주파수를 조사(irradiation)하여 형성된 공동현상(cavitation)을 통해 미생물의 불활성화를 야기하는 과정을 의미한다. 공동현상이란 음파처리(sonication) 과정에서 발생한 압축 및 팽창 에너지로 인해 형성된 미세기포(microbubble)가 임계 크기(critical size)에 도달해 붕괴하며 에너지를 액체에 전달하는 과정이다 (Lofrano et al., 2017). 또한 초음파 조사 과정 중 생성되는 수산화라디칼(OH^\bullet)이 미생물의 세포막을 박리시켜 균이 사멸되는 반응도 미생물 불활성화의 주요한 경로가 되기도 하여, 현재 음식물 살균(sterilization) 및 소독(disinfection)의 목적으로 많이 활용되고 있다. 그러나, 초음파 처리 과정은 염소 소독이나 오존, UV 등을 이용한 소독 혹은 산화공정에 비해 효율이 낮아, 그간 하수 처리에서의 연구는 상대적으로 미흡한 편이었다 (Barancheshme and Munir, 2018). 따라서, 최근에는 개별 소독 공정의 단점을 보완하기 위해 처리 과정을 조합하거나, 촉매 등을 활용하여 공정의 단점을 보완하여 소독제 사용량 감소, 병원성 미생물의 처리 효율 증대, 반응 시간 감소, 오염물질 제거 등의 효과에 대한 연구가 지속되고 있다. 그러나, 현재 대두되는 항생제, 항생제 내성균, 병원성균 등의 제거 효율에 대한 연구는 미흡한 편이다 (Lee, 2010).

본 연구의 목적은 항생제 내성균 제거를 위한 초음파 조사 공정의 기초 연구로서, 시간 및 강도를 달리 하여 그에 따른 제거효율을 비교하는 것이다. 또한 항생제 내성균의 내성도 차이를 조사하였으며, 이를 통하여 미생물 불활성화 및 내성도의 변화에 따른 초음파 소독 효율 및 성능 향상을 이해하고자 하였다.

2. 연구 방법

2.1 초음파 조사 실험

실험에 쓰인 생활하수는 중앙대학교내 기숙사 건물에서 배출되는 폐수를 채취하였으며, 원래 존재하던 균



들의 사멸을 위하여 고압 멸균(autoclave)시킨 후, -20°C 보관하였다가 사용하였다. 폐수의 기본적인 수질은, COD: 28.0 ± 2.1 mg/L, TOC: 2.5 ± 0.1 mg/L, DOC: 2.0 ± 0 mg/L, Total nitrogen: 15.2 ± 0.8 mg/L, Total phosphorous: 0.9 ± 0.1 mg/L, Conductivity: 162.7 ± 6.7 μ S/cm, pH: 7.51 ± 0.2 로 조사되었다. 초음파 조사를 위해 제작된 원통형 반응기(Double-jacketed Pyrex reactor)에 폐수 290 mL 및 미생물 배양액 10 mL를 분주하여, 총 부피 300 mL가 되게 하고, pH 7.2, 25°C 항온 조건에서 초음파를 조사하였다. 초음파 조사는 주파수 20 kHz (MISONIX S-4000, USA)를 이용하였으며, 조사 강도(amplitude)는 20과 40으로 변화시켰다. 두 강도에서 실제 수용액으로 전달된 에너지의 양은 calorimetric power 방법(식-(1))을 이용하여 계산하였으며 (Kimura et al., 1996), 각각 27.7 W (강도 20)와 39.1 W (강도 40)로 측정되었다.

$$P = mC_p (\Delta T / \Delta t) \quad (1)$$

여기서, C_p 는 물의 열 용량(heat capacity, 4.18 J/g·K), m 은 물의 질량, ΔT 는 초음파 조사시 증가하는 온도의 변화, Δt 는 초음파 조사 시간의 변화를 의미한다.

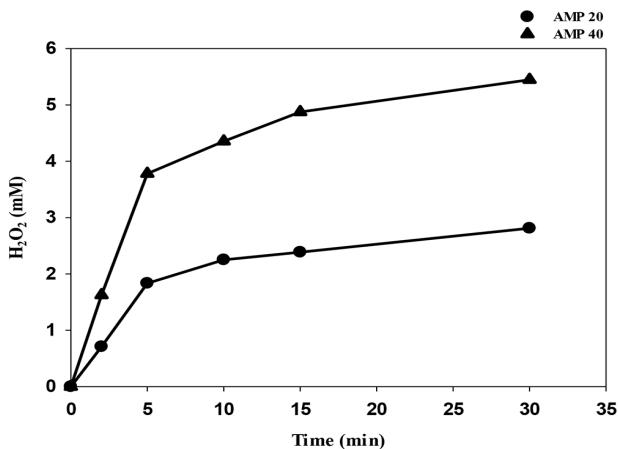


Fig. 1. Production of hydrogen peroxide (H_2O_2) by ultrasound irradiation at amplitudes 20 and 40.

Table 1. Used antibiotics and its input concentration

Family	Antibiotics	Abbreviation	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Penicillin	Ampicillin	AMP	2
Penicillin	Amoxicillin	AML	8
Quinolone	Ciprofloxacin	CIP	8
Tetracycline	Tetracycline	TE	16
Sulfonamide	Sulfamethoxazole	RL	256

본 실험에서는 강도 20 (27.7 W) 및 40 (39.1 W)에서 초음파를 조사하는 동안, 조사 시간 2, 5, 10, 15 분 간격으로 시료를 채취하였다. 초음파 조사에 의해 생성되는 수산화 라디칼의 생성을 간접적으로 확인하기 위하여 생성되는 과산화수소의 양을 측정하였다 (Fig. 1) (Nomura et al., 1996). 실험 결과에 대한 통계분석은 Microsoft® excel의 Analysis add-in을 활용하여, 피어슨 상관(Pearson's correlation) 및 Student t-test (등분산 가정 두집단)을 비교하였다.

2.2 미생물 배양

대표종으로 그람 음성균인 *Escherichia coli* (*E. coli*, KCCM 41310)와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, KCCM 12256), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*, KCCM 11814)를 선택하였으며, nutrient agar (*E. coli*) 및 tryptone soy agar (*S. aureus*, *E. faecalis*)를 이용하여, 24시간 배양(37°C , 180 rpm)하였다. 초기 균의 농도 조절을 위해, 600 nm에서의 흡광도 분석을 통해 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL임을 확인 후, 10 mL를 반응기에 주입한 뒤 초음파를 조사하였다. 항생제 저항성 발현을 위하여, 통상적으로 사용되는 EUCAST(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 및 CLSI(Clinical & Laboratory Standards Institute)의 유효 값(cutoff value)을 참고하여 Table 1와 같이 항생제 첨가 농도를 선정하여 배지를 제조하였다. 선별배지(selective media)에서 배양된 세균들은 항생제 내성을 가지고 있는 것으로 판단하여 30% 글리세롤(glycerol)을 첨가하여 균 저장액(stock)으로 제조하여 실험에 사용하였다.

2.3 항생제 감수성 검사

항생제 감수성(antibiotic sensitivity)을 검사하는 미생물 성장 억제 최소농도로 항생제를 첨가하여 미생물의

약제 내성을 확인하는 최소저해농도(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)방법 중 Kirby-Bauer 디스크 방법을 활용하였다. 특정 항생제에 대하여 MIC 농도가 낮을수록 그 항생제에 대한 감수성이 높다고 판단할 수 있으며, 그만큼 작은 농도로도 미생물 제거율이 높다고 할 수 있다. 실험에 활용된 디스크는 ThermoScientific Oxoid (USA)에서 구입하였으며, 암피실린 (ampicillin, AMP, 10 µg), 아목시실린 (amoxicillin, AMX, 10 µg), 아목시실린/클라불란산 (amoxicillin/clavulanic acid, AMC, 30 µg), 시프로플록사신 (ciprofloxacin, CIP5, 5 µg), 테트라시클린 (tetracycline, TET30, 30 µg), 설파메톡사졸 (sulfamethoxazole, RL, 25 µg), 설파메톡사졸/트리메도프림 (sulfamethoxazole/trimethoprim, SXT, 25 µg)을 사용하였다. 초음파 조사 전과 후에 대한 생장억제구역 (inhibition zone)을 측정하여 감수성 변화를 분석하였다. 각 항생제 별로 3회의 실험을 진행하였으며 CLSI 가이드라인에 따라 결과는 저항성(resistant), 중간내성(intermediate), 감수성(sensitive)으로 구분하였다 (CLSI, 2017).

3. 결과 및 고찰

3.1 초음파 조사에 의한 감수성 변화

Table 2을 통해 그람 음성균인 대장균(*E. coli*), 그리고 Table 3과 Table 4는 그람 양성균인 장구균(*E. faecalis*) 및 포도상구균(*S. aureus*)에 대하여 초음파 조사에 의한 감수성 변화 결과를 정리하였다. 대장균의 경우(Table 2), 페니실린(penicillin) 계열 항생제인 암피실린, 아목시실린 항생제에 대한 감수성 변화는 강도 20에서는 거의 나타나지 않지만, 조사 강도 40에서는 처리 시간이 증가함에 따라 항생제 감수성이 증가하여 초기 표현된 저항성 또는 중간내성이 감수성으로 변화하였다. 또한, 초음파 조사 후, 처리수를 분취하여 24시간 배양하였을 때, 조사 강도 20으로 처리한 대장균은 저항성을 회복 하였지만 강도 40으로 처리한 대장균은 감수성을 유지하였다. 술폰아미드(sulfonamide) 계열 설파메톡사졸 항생제가 처리된 대장균은 시간 경과에 따라 높은 항생제 감수성 나타내었다. 퀴놀론(quinolone) 계열 시프로플록사신 및 테트라시클린 계열 테트라시클린 항생제에 대해서는 초음파 조사 강도 20 과 40에서 모두, 초기 중간내성이었던 대장균이

감수성이 증가하는 방향으로 변화하였지만, 24시간 경과 후 공통적으로 저항성을 회복하는 것으로 관찰되었다. 그람 양성균인 장구균의 경우(Table 3), 페니실린 계열 항생제에 대해서 시간 및 강도에 따른 감수성 변화는 뚜렷이 확인되지 않았다. 그러나, 초음파 처리 후 24시간 배양시, 초기에는 감수성이었던 균에서 저항성으로 발현되었다. 설파메톡사졸 항생제의 경우, 장구균의 저항성은 24시간 배양 이후까지 일정하게 유지되었다. 시프로플록사신 및 테트라시클린에 대해서도 항생제 감수성이 초음파 조사 시간 및 강도가 증가함에 따라 미비하게 감소하는 경향을 보였다. 시프로플록사신에서는 초기 중간내성이었던 균이 초음파 처리에 따라 억제구역이 증가되면 감수성이 발현되었지만, 테트라시클린에서는 저항성에 큰 변화를 보이지 않았다. 그람 양성균인 포도상구균의 경우 (Table 4), 시프로플록사신을 처리한 균은 초음파 처리 과정에서는 항생제 저항성이 거의 존재하지 않았다. 하지만 처리 후 24시간 배양된 균에서는 저항성이 존재하는 것으로 나타났다. 암피실린과 아목시실린에 처리된 균은 초음파 조사 시간에 따라 저항성 감소가 나타났지만 24시간 처리 후 다시 저항성을 회복한 것으로 관찰되었다. 그 외 항생제 물질에 대해서는 초음파 조사 시간 및 강도에 따른 억제구역 변화가 거의 존재하지 않았으며, 저항성을 지속적으로 유지하였다.

항생제 감수성에 차이가 생기는 이유는 그람 양성균의 경우, 그람 음성균에 비해 약 10~15배 정도 두꺼운 펩티도글리칸(peptidoglycan)층으로 인한 저항성 때문으로 사료된다 (Foladori et al., 2007). 또한, Yu et al. (2012)은 초음파 강도에 따라 세균의 세포막 투과성에 따른 항생제 침입 정도가 변화하여 항생제 내성도가 변화할 수 있음을 밝혔다. Pitt et al. (1994)에 따르면, 대장균 및 포도상구균의 초음파를 통한 항생제 억제 농도 변화를 분석한 결과, 대장균에서는 겐타마이신(gentamicin)의 내성도가 6 µg/mL에서 3 µg/mL으로 감소한 반면, 포도상구균에는 항생제 억제 농도의 변화가 거의 존재하지 않았다고 관찰 하였다.

또한, 동일 미생물에서 항생제 종류에 따라 다른 영향이 관찰되었다. 이는 항생제가 미생물에 작용하는 구조적(structural), 기능적(functional) 차이로 인한 본질적 저항(intrinsic resistance)때문으로 사료된다. Blair et al. (2015)에 따르면 대장균에서는 같은 베타-락탐(β -lactam)계열 항생제는 porin 단백질을 통과하지 못해



Table 2. The mean inhibition zones (mm) of *Escherichia coli* (KCCM 41310) exposed to amplitudes 20 and 40 of ultrasound intensities^a

Antibiotic	Disk type	Time (min)	AMP 20 (mm)	Sensitivity	AMP 40 (mm)	Sensitivity	p value
Ampicillin	AMP	0	12.2±0.3	Resistant	12.3±0.3	Resistant	0.5185
		2	12.2±0.3	Resistant	12.3±0.3	Resistant	0.6745
		5	13.0±0.0	Resistant	13.2±0.3	Resistant	0.3739
		10	12.7±0.3	Resistant	14.1±0.1	Sensitive	0.0011*
		15	13.2±0.3	Resistant	14.5±0.0	Sensitive	0.0013*
		1440	13.2±0.3	Resistant	13.5±0.6	Resistant	0.3739
Amoxicillin	AMX	0	8.8±0.3	Resistant	8.7±0.6	Resistant	0.6779
		2	9.83±0.3	Resistant	8.7±0.6	Resistant	0.0352*
		5	12.5±0.5	Resistant	8.7±0.6	Resistant	0.0010*
		10	10.7±0.6	Resistant	14.3±0.6	Sensitive	0.0015*
		15	11.7±0.6	Resistant	16.7±0.6	Sensitive	0.0004*
		1440	11.8±0.8	Resistant	14.7±0.6	Sensitive	0.0001*
	AMC	0	15.1±0.6	Intermediate	11.7±0.6	Resistant	0.0020*
		2	16.5±0.2	Intermediate	12.7±0.3	Intermediate	0.0000*
		5	16.1±0.3	Intermediate	13.3±0.6	Intermediate	0.0020*
		10	16.1±0.2	Intermediate	16.2±0.3	Intermediate	0.8790
		15	16.5±0.2	Intermediate	17.3±0.6	Sensitive	0.0775
		1440	12.7±0.6	Resistant	20.7±0.6	Sensitive	0.0001*
Sulfamethoxazole	RL	0	16.0±0.5	Intermediate	17.4±0.3	Sensitive	0.0164*
		2	17.3±0.6	Sensitive	18.2±0.3	Sensitive	0.0890
		5	18.3±0.6	Sensitive	18.8±0.3	Sensitive	0.4169
		10	18.0±0.0	Sensitive	20.3±0.8	Sensitive	0.0000*
		15	18.7±0.6	Sensitive	20.7±0.2	Sensitive	0.0058*
		1440	17.2±0.3	Sensitive	19.5±0.3	Sensitive	0.0006*
	SXT	0	30.8±0.3	Sensitive	31.0±0.0	Sensitive	0.3739
		2	31.2±0.3	Sensitive	31.3±0.2	Sensitive	0.5879
		5	31.9±0.2	Sensitive	30.6±0.2	Sensitive	0.0019*
		10	31.3±0.6	Sensitive	30.9±0.1	Sensitive	0.3046
		15	31.7±0.6	Sensitive	30.3±0.4	Sensitive	0.0313*
		1440	26.8±0.3	Sensitive	29.3±0.6	Sensitive	0.0026*
Ciprofloxacin	CIP5	0	30.7±0.3	Intermediate	30.5±0.5	Intermediate	0.6433
		2	31.0±0.5	Sensitive	31.1±0.6	Sensitive	0.8899
		5	30.8±0.3	Sensitive	31.0±0.5	Sensitive	0.6433
		10	31.0±0.0	Sensitive	31.0±0.0	Sensitive	0.3169
		15	32.0±1.0	Sensitive	32.0±1.0	Sensitive	0.3739
		1440	25.8±0.3	Intermediate	24.5±0.5	Intermediate	0.0161*
Tetracycline	TET30	0	18.0±0.4	Intermediate	19.8±0.3	Intermediate	0.0204*
		2	19.8±0.3	Intermediate	21.6±0.6	Sensitive	0.0000*
		5	20.2±0.3	Sensitive	22.6±0.4	Sensitive	0.2597
		10	20.2±0.2	Sensitive	22.4±0.3	Sensitive	0.0293*
		15	20.8±0.3	Sensitive	23.9±0.4	Sensitive	0.0073*
		1440	10.7±0.6	Resistant	10.7±0.6	Resistant	0.0001*

Data was presented as the mean±SD, and the values with ‘*’ mark denote p-value<0.05

Table 3. The mean inhibition zones (mm) of *Enterococcus faecalis* (KCCM 11814) exposed to amplitudes 20 and 40 of ultrasound intensities (n=3)

Antibiotic	Disk type	Time (min)	AMP 20 (mm)	Sensitivity	AMP 40 (mm)	Sensitivity	P value
Ampicillin	AMP	0	30.7±0.6	Sensitive	31.0±0.0	Sensitive	0.3739
		2	31.0±0.0	Sensitive	31.0±0.5	Sensitive	1.0000
		5	31.0±0.0	Sensitive	31.1±0.1	Sensitive	0.1583
		10	31.0±0.0	Sensitive	31.3±0.2	Sensitive	0.0907
		15	31.4±0.2	Sensitive	31.0±0.0	Sensitive	0.0161*
		1440	25.5±0.5	Sensitive	22.5±0.5	Sensitive	0.0018*
Amoxicillin	AMX	0	16.3±0.3	Sensitive	17.7±0.3	Sensitive	0.0048*
		2	19.7±0.3	Sensitive	20.8±0.8	Sensitive	0.0686
		5	20.7±0.6	Sensitive	20.9±0.0.3	Sensitive	0.6240
		10	22.3±0.7	Sensitive	22.3±0.3	Sensitive	0.9429
		15	23.3±0.6	Sensitive	23.6±0.4	Sensitive	0.0354*
		1440	16.4±1.9	Sensitive	15.8±0.8	Sensitive	0.6714
	AMC	0	24.2±0.3	Sensitive	25.5±0.5	Sensitive	0.1161
		2	26.2±0.3	Sensitive	26.5±0.5	Sensitive	0.3739
		5	26.4±0.1	Sensitive	26.8±0.3	Sensitive	0.0898
		10	26.5±0.4	Sensitive	26.7±0.6	Sensitive	0.7596
		15	26.5±0.9	Sensitive	26.8±0.8	Sensitive	0.6433
		1440	21.3±1.2	Resistant	23.2±0.3	Resistant	0.5162
Sulfamethoxazole ^b	SXT	0	30.3±0.6	Sensitive	31.2±0.3	Sensitive	0.0890
		2	29.7±0.6	Sensitive	33.2±0.3	Sensitive	0.0009*
		5	31.0±0.0	Sensitive	33.8±0.5	Sensitive	0.0001*
		10	32.1±0.1	Sensitive	33.8±0.3	Sensitive	0.0006*
		15	32.0±0.2	Sensitive	33.5±0.9	Sensitive	0.0392*
		1440	16.9±0.7	Resistant	15.2±1.0	Resistant	0.0712
Ciprofloxacin	CIP5	0	20.5±0.5	Intermediate	19.5±0.5	Intermediate	0.0080*
		2	24.2±0.3	Sensitive	24.2±0.3	Sensitive	0.7780
		5	27.0±0.0	Sensitive	25.0±0.0	Sensitive	0.0013*
		10	28.0±0.5	Sensitive	25.5±0.5	Sensitive	0.0029*
		15	26.8±0.8	Sensitive	25.2±0.4	Sensitive	0.0280*
		1440	18.5±0.5	Resistant	19.6±0.5	Resistant	0.0614
Tetracycline	TET30	0	12.5±0.5	Resistant	12.0±1.3	Resistant	0.6433
		2	10.7±0.6	Resistant	10.2±0.3	Resistant	0.0390*
		5	10.5±0.5	Resistant	11.0±0.1	Resistant	0.0013*
		10	10.8±0.3	Resistant	11.8±0.3	Resistant	0.0005*
		15	11.5±0.5	Resistant	13.2±0.3	Resistant	0.0086*
		1440	11.2±0.2	Resistant	11.2±0.2	Resistant	0.0004*

Data was presented as the mean±SD, and the values with “*” mark denote p-value<0.05 Sulfamethoxazole^b. No reference inhibitory zone for RL



Table 4. The mean inhibition zones (mm) of *Staphylococcus aureus* (KCCM 12256) exposed to amplitudes 20 and 40 of ultrasound intensities (n=3)

Antibiotic	Disk type	Time (min)	AMP 20 (mm)	Sensitivity	AMP 40 (mm)	Sensitivity	P value	
Ampicillin	AMP	0	22.5±0.5	Sensitive	20.0±0.0	Sensitive	0.0010*	
		2	22.2±0.3	Sensitive	20.5±0.5	Sensitive	0.0075*	
		5	22.3±0.6	Sensitive	22.0±0.0	Sensitive	0.3739	
		10	20.7±0.6	Sensitive	22.5±0.5	Sensitive	0.0142*	
		15	21.0±0.0	Sensitive	22.2±0.3	Sensitive	0.0022*	
		1440	20.7±1.5	Resistant	23.3±0.6	Sensitive	0.0474*	
		Amoxicillin	AMX	0	16.7±0.6	Resistant	18.2±1.0	Resistant
2	19.3±0.6			Resistant	21.2±0.3	Resistant	0.0079*	
5	21.0±0.1			Resistant	21.1±0.1	Resistant	0.3739	
10	22.7±0.6			Resistant	22.3±0.3	Resistant	0.4216	
15	21.7±0.6			Resistant	23.3±0.6	Resistant	0.0241*	
1440	10.0±1.0			Resistant	11.3±0.6	Resistant	0.1161	
AMC	0			24.2±0.3	Resistant	25.5±0.5	Resistant	0.1161
	2		26.2±0.3	Sensitive	26.5±0.5	Sensitive	0.3739	
	5		26.4±0.1	Sensitive	26.8±0.3	Sensitive	0.0898	
	10		26.5±0.4	Sensitive	26.7±0.6	Sensitive	0.7596	
	15		26.5±0.9	Sensitive	26.8±0.8	Sensitive	0.6433	
	1440		16.5±0.5	Resistant	16.1±0.9	Resistant	0.5162	
	Sulfamethoxazole		RL	0	9.4±0.1	Resistant	8.7±0.6	Resistant
2				9.2±0.2	Resistant	9.3±0.2	Resistant	0.4676
5		9.4±0.2		Resistant	9.2±0.1	Resistant	0.1583	
10		9.0±0.2		Resistant	9.4±0.06	Resistant	0.0132*	
15		9.1±0.1		Resistant	9.2±0.6	Resistant	0.2051	
1440		9.1±0.2		Resistant	9.0±0.1	Resistant	0.3739	
SXT		0		27.8±0.3	Sensitive	27.8±0.3	Sensitive	0.7780
		2	28.5±0.4	Sensitive	27.8±0.8	Sensitive	0.2758	
		5	29.0±1.0	Sensitive	27.5±0.5	Sensitive	0.0808	
		10	29.3±0.3	Sensitive	27.7±0.6	Sensitive	0.0117*	
		15	28.9±0.5	Sensitive	27.7±0.6	Sensitive	0.0442*	
		1440	27.8±0.3	Sensitive	27.5±0.3	Sensitive	0.2746	
		Ciprofloxacin	CIP5	0	32.8±0.3	Sensitive	27.5±0.5	Sensitive
2				29.5±0.5	Sensitive	26.2±0.3	Sensitive	0.0005*
5	23.5±1.6			Sensitive	25.8±0.3	Sensitive	0.0709	
10	20.8±0.3			Intermediate	25.8±0.3	Sensitive	0.0000*	
15	23.0±0.5			Sensitive	23.7±0.3	Sensitive	0.1161	
1440	13.5±0.5			Resistant	16.2±0.3	Intermediate	0.0013*	
Tetracycline	TET30			0	28.8±1.0	Sensitive	28.8±0.3	Sensitive
		2	28.3±0.3	Sensitive	27.7±0.8	Sensitive	0.2302	
		5	24.3±1.3	Sensitive	26.2±0.3	Sensitive	0.0697	
		10	24.7±0.6	Sensitive	26.1±0.4	Sensitive	0.0218*	
		15	25.3±0.3	Sensitive	27.2±0.3	Sensitive	0.0014*	
		1440	24.2±0.3	Sensitive	21.2±0.6	Intermediate	0.0016*	

Data was presented as the mean±SD, and the values with ‘*’ mark denote p-value<0.05

pp. 177-190

pp. 191-204

pp. 205-213

pp. 215-224

pp. 225-234

Table 5. Pearson's correlation between bacterial inactivation (ultrasound irradiated sample CFU/initial CFU) and disk diffusion diameter (mm)

Antibiotics(disk)	<i>E. coli</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>	
	AMP 20	AMP 40	AMP 20	AMP 40	AMP 20	AMP 40
AMP	-0.912	-0.952	-0.817	0.102	0.112	0.507
AMX	-0.737	-0.843	-0.425	-0.478	0.193	0.358
AMC	-0.531	-0.946	-0.556	-0.626	0.321	0.884
RL	-0.896	-0.977	-0.312	-0.809	0.578	-0.784
SXT	-0.792	0.671	-0.893	-0.047	-0.907	0.783
CIP5	-0.543	-0.703	-0.654	-0.746	0.476	0.682
TET10	-0.354	-0.956	-0.532	-0.384	-0.658	0.069*

** mark denotes p-value<0.05

Table 6. Mean log reduction and standard deviation for three microorganisms during ultrasound irradiation. Intensities of ultrasound apparatus were varied from AMP 20 and 40

-	Time	5 min		10 min		15 min	
		AMP 20	AMP 40	AMP 20	AMP 40	AMP 20	AMP 40
<i>E. coli</i>	AML	0.48	0.57	1.19	1.28	1.75	1.91
	AMP	0.50	0.49	0.84	1.12	1.24	1.69
	RL	0.87	0.90	1.14	1.05	1.37	1.44
	CIP	0.63	0.49	1.06	0.74	1.41	0.55
	TET	0.36	0.27	0.65	0.46	1.53	1.64
<i>E. faecalis</i>	AML	-0.08	-0.23	-0.04	0.28	0.29	0.73
	AMP	-0.37	-0.15	-0.11	0.09	0.28	0.48
	RL	-0.23	-0.23	0.07	0.45	0.37	0.74
	CIP	0.19	0.17	0.22	0.25	0.75	0.55
	TET	-0.74	-0.74	0.52	-0.83	0.15	1.82
<i>S. aureus</i>	AML	-0.09	0.11	-0.08	0.11	0.06	0.08
	AMP	-0.01	-0.12	-0.01	0.13	0.04	0.17
	RL	0.06	0.16	0.06	0.16	0.09	0.19
	CIP	-0.01	-0.09	0.02	-0.11	0.03	0.16
	TET	-0.42	-0.26	-0.46	0.26	0.42	0.24

Mean value from 3 trials

저항성이 발견되지 않았으나, 일부 β-lactam계열 항생제와 카바페넴(carbapenem)계열 항생제는 porin 단백질에 돌연변이를 야기하고, 세포막의 구조를 변형시켜 항생제 저항성이 발현될 수 있었다. 이와 유사하게, 포도상구균은 *mecA* 유전자를 통해 β-lactam계열 항생제에 대해 저항성을 갖지만, 유전자 돌연변이로 인해 형성된 *mecA*의 대립유전자인 *mecC* 유전자를 가진 포도상구균은 저항성을 띠던 oxacillin에 감수성을 띠고 β-lactam 계열 및 cefoxitin 항생제에 대해 저항성

을 가질 수 있었다. 하지만 항생제 종류 및 농도에 따른 수평적 유전자 이동 및 저항성 발현 정도의 차이는 현재 지속적으로 논쟁되고 있는 주제이다 (Larrson et al., 2018).

따라서, 본 실험의 결과를 종합해 볼 때, 그람 음성균에서는 초음파 조사의 영향을 받아 항생제 내성도가 증가하며 이는 항생제의 종류에 따라 달라질 수 있다. 또한, 그람 양성균에서는 항생제 종류에 상관없이 낮은 강도(low-intensity)의 초음파 처리를 통한 항



생제 내성도 증가는 잘 이루어지지 않음을 나타낸다.

초음파 처리 이후 24시간 배양한 균의 억제구역 감소 현상은 적응적 대응(adaptive response)의 반응인 것으로 추측된다. 적응적 대응이란, 과거 가해졌던 미비한 물리/화학적 처리에 적응하여, 이후 보다 강한 처리 과정에도 저항성을 갖는 것을 의미한다 (Flórez-Acosta et al., 2016). 따라서, 초음파 조사와 같은 처리에 노출되기 전, 항생제에 미리 노출과정을 경험한(pre-exposed) 균들은 초음파 처리와 같은 물리화학적 스트레스 조건에도 저항하는 간섭효과(cross-protection)를 발생시키는 것으로 사료된다 (Mortazavi et al., 2015). 또한 처리 이후 잔류한 항생 물질 또는 내성을 가진 균이 우세한 환경으로 인한 선택적 압력(selective pressure)이 항생제 내성 세균을 지속적으로 증대시켜 감수성을 회복할 것으로 추측된다 (Lowy D., 2003).

Table 5은 초음파 처리에 의한 세균 불활성화(즉, 시간에 따른 초음파 처리 후 CFU/초기 CFU)정도와 항생제 억제 구역 사이의 피어슨 상관 분석 결과이다. 균 종류에 따라 다른 상관관계를 나타내었으며 초음파 처리에 민감했던 대장균의 경우, 비교적 큰 음의 상관관계를 보였다. 세균 불활성화 및 처리시간대비 항생제 내성도 감소가 적게 나타났던 그람 양성균의 경우, 비교적 낮은 상관성을 보였다. 이는 앞서 기술한 바와 같이, 간섭효과로 인해 미생물 활성화 및 항생제 내성도 감소가 야기된 것으로 사료된다.

3.2 초음파 조사에 의한 소독 효과

초음파에 의한 소독 효과를 관찰하기 위해, 조사 강도별 시간에 따른 균수의 변화를 측정하였다 (Figs. 2-4). 조사 강도와 관계없이 그람 음성균인 대장균에서의 제거 효율이 가장 큰 것으로 나타났고, 그람 양성균인 장구균, 포도상구균 순으로 균 수의 감소가 큰 것으로 나타났다. 강도 변화에 따른 로그 제거율은 Table 6과 같으며, 대장균 수 감소는 지속적으로 발생하여 15분 경과 후 초음파 조사 강도 20에서 약 1.2-log 제거율을 보였으며 조사 강도 40에서는 1.3배 증가한 1.6-log 제거율을 나타냈다 (Fig. 2). 그람 양성균의 균 수가 조사 시작 2분 이내에 미세하게 증가하는 이유는, 초음파 처리로 인해 이전에 군집(clump)을 형성하던 균들이 흩어져 단일 균 형태로 숫자 측정이 되었기 때문으로 사료된다 (Joyce et al., 2003). 이후 처리시간 경과에 따라, 그람 양성균인 장구균 및 포도

상구균에서의 초음파 제거율은 대장균 보다 약 4배 정도 작게 나타났으며, 이는 세포벽 두께에 따른 제거 효율 차이로 사료된다. 하지만 테트라시클린 처리를 한 장구균의 15분 경과 후 처리 효율은 다른 항생제 처리보다 약 2배 정도 높은 점은 동일 균이라도 항생제에 따라 처리 효율이 달라질 수 있음을 나타낸다 (Fig. 3). 그람 양성균인 포도상구균은 15분 경과 후 조사 강도가 2배 증가함에 따라 평균 제거율이 미약하게 증가하지만 강도 20에서와 유사하게 0.05-log 제거율 수준으로 나타나 미생물 불활성화 효과가 거의 없는 것으로 나타난다 (Fig. 4). Madge and Jensen (2002)의 미생물 로그 제거율 분석방법에 따르면, 15분당 로그제거효율이 0.25보다 작을 때 소독 효과가 거의 없고, 0.25이상 0.5미만일 때 적절한 효과, 0.5이상일 때 효과적인 효율을 기대하여 실용성이 있다고 판단하였다. 이를 통하여 본 연구에서의 초음파 조사 조건에서는 그람 음성균은 적절한 소독 효과가 있음을 알 수 있지만 그람 양성균에는 소독 효과가 거의 없음을 알 수 있다.

세포벽의 두께 차이 외에 그람 양성균인 포도상구균 및 장구균에서 형성되는 다당류 캡슐(polysaccharide capsule)은 초음파 공동 현상으로 야기되는 전단력(shear force)에 대해 더 큰 저항성을 가진다 (Gao et al., 2014). 또한 세포 형태(cell shape)에 따른 초음파 저항성은 구균(cocci)일수록 막대 모양(rod shape)보다 크다. 관련 연구에 따르면, 그람 음성균인 대장균의 경우 초음파 처리 15분 이후부터 1-log 이상의 처리효율을 나타냈지만, 그람 양성균인 장구균, 캡슐을 형성하는 고초균(*Bacillus subtilis*), 식중독균(*Bacillus cereus*)의 경우 480분 이상의 초음파 조사를 통해서도 1-log 이상의 처리효율을 가지기 어려운 것으로 보고된다 (Burgos et al., 1972).

초음파로 인하여 불활성화되었던 균들의 재증식 정도를 이해하기 위하여 초음파 처리 후, 다시 24 시간 동안 배양하여 증식되는 균 수를 측정하였다(Fig. 2). 초음파 조사 전의 균 수에 비해 그람 양성균에서는 약 0.5-log 정도의 재증식이 일어나지만, 대장균에서는 큰 변화가 존재하지 않았다. 또한, 그람 양성균에서도 항생제 종류에 따라 재증식이 일어나는 정도가 달랐다. 이는 폐수의 성장 및 과산화수소 형성의 복합적인 효과에 대한 특징으로 유추할 수 있다. 그러나, 다른 연구에 따르면 하수의 성상이 미생물 성장 및 재증식에 선택적 압력(selective pressure)으로 작용

(1) *Escherichia coli*

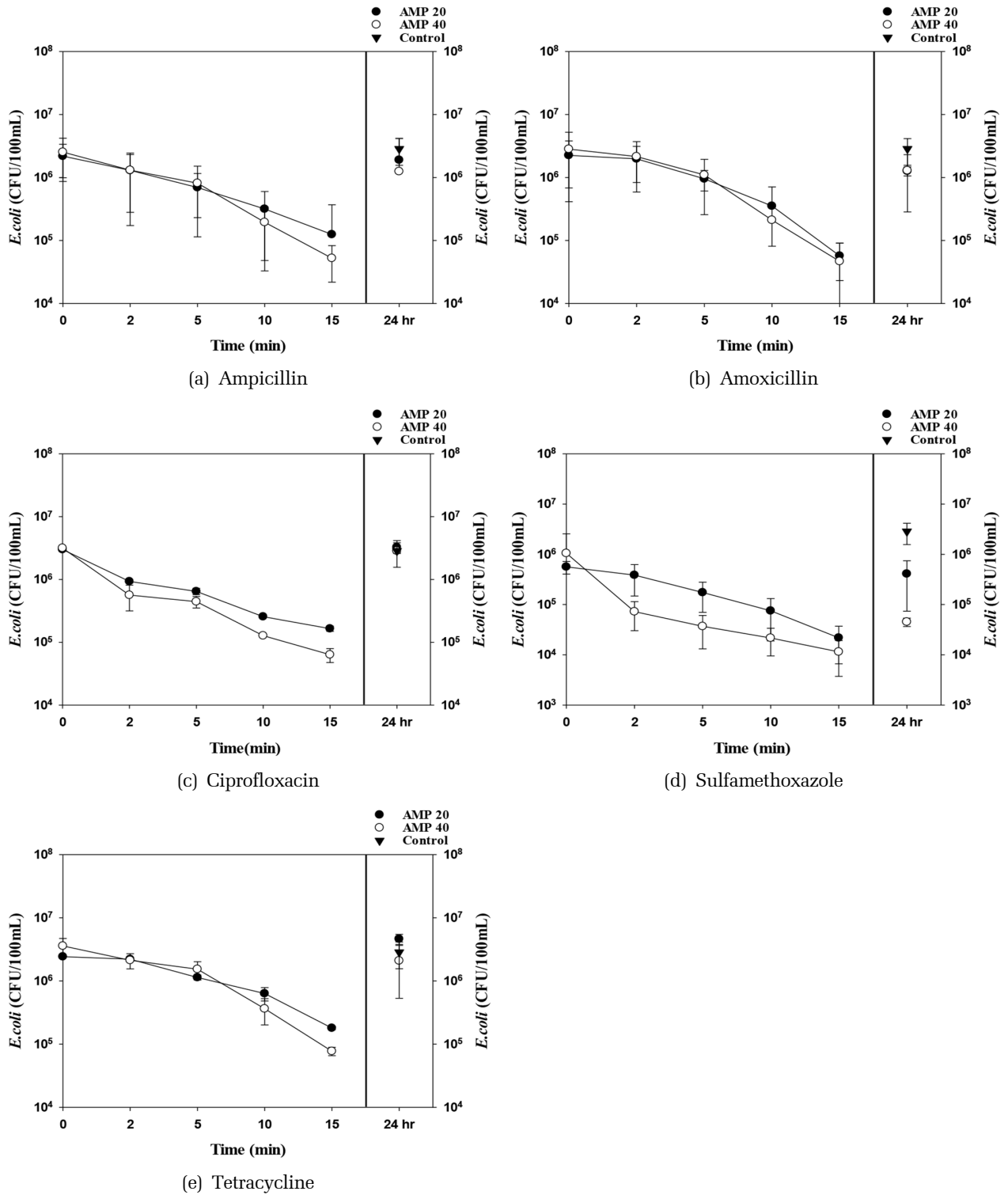


Fig. 2. Effect of ultrasound irradiation with different intensities (amplitudes 20 and 40). 'Control' refers to 24-hr culture without ultrasound irradiation. (1) *Escherichia coli* and each antibiotics as follows, (a) Ampicillin, (b) Amoxicillin, (c) Ciprofloxacin, (d) Sulfamethoxazole, (e) Tetracycline.



(2) *Enterococcus faecalis*

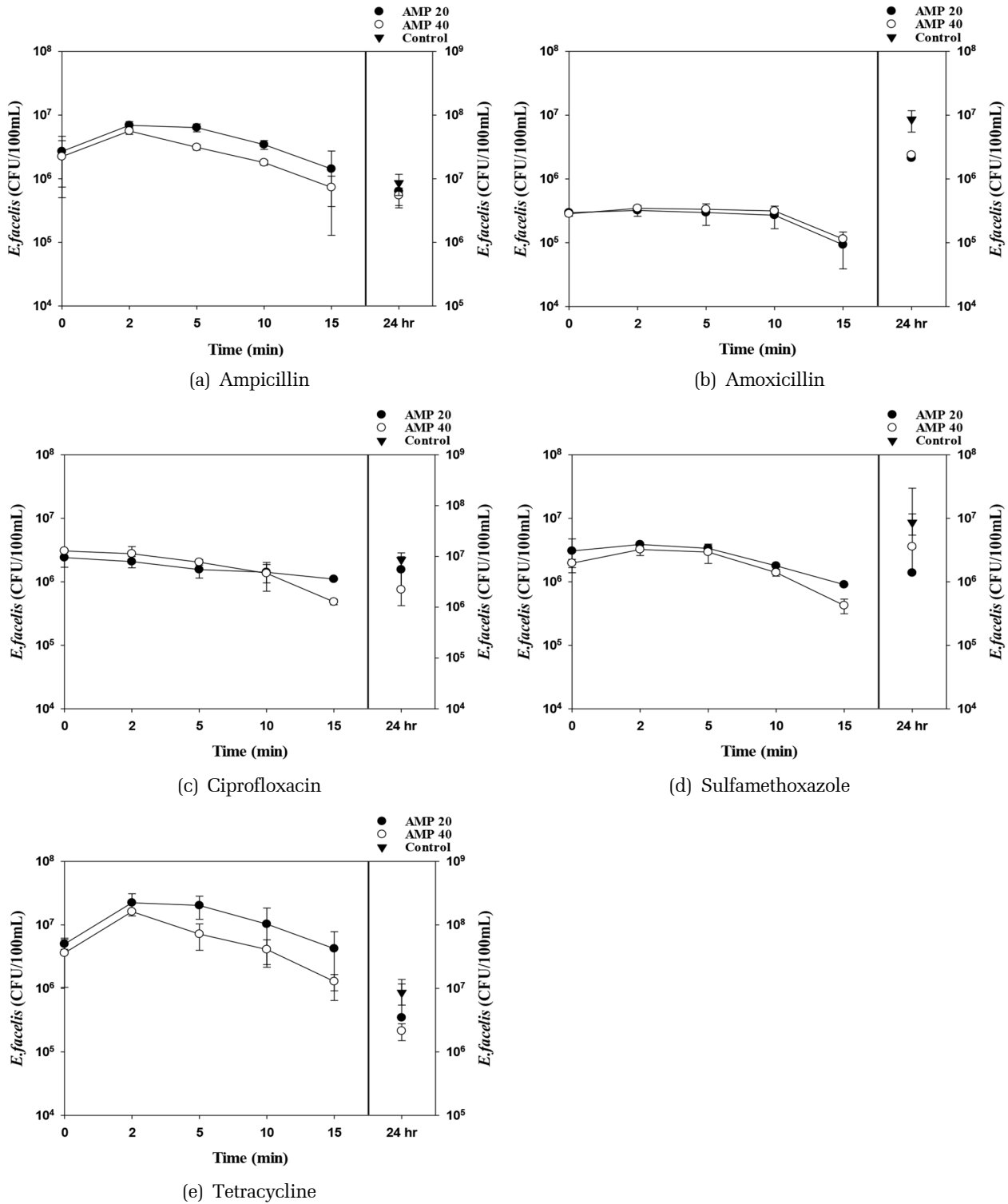


Fig. 3. Effect of ultrasound irradiation with different intensities (amplitudes 20 and 40). 'Control' refers to 24-hr culture without ultrasound irradiation. (2) *Enterococcus faecalis* and each antibiotics as follows, (a) Ampicillin, (b) Amoxicillin, (c) Ciprofloxacin, (d) Sulfamethoxazole, (e) Tetracycline.

pp. 177-190

pp. 191-204

pp. 205-213

pp. 215-224

pp. 225-234

(3) *Staphylococcus aureus*

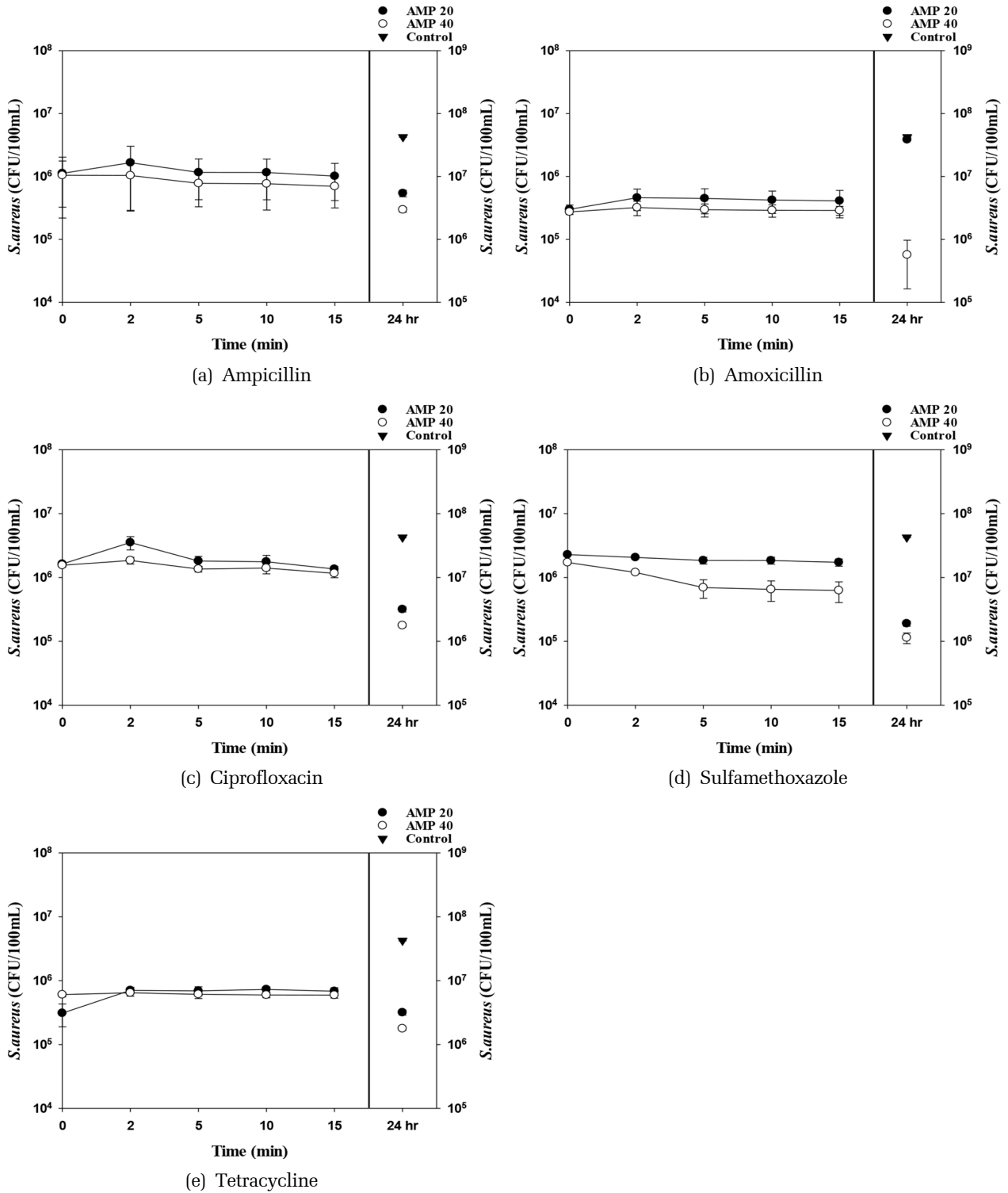


Fig. 4. Effect of ultrasound irradiation with different intensities (amplitudes 20 and 40). 'Control' refers to 24-hr culture without ultrasound irradiation. (3) *Staphylococcus aureus* and each antibiotics as follows, (a) Ampicillin, (b) Amoxicillin, (c) Ciprofloxacin, (d) Sulfamethoxazole, (e) Tetracycline.



하더라도, 복합적인 영향은 미비한 것으로 관찰되었다 (Al-Badaii and Shuhaimi-Othman, 2014; Manaia et al., 2018). 따라서 하수 성상이 항생제 내성균 성장에 미치는 복합적인 영향에 대해서는 추가 연구가 필요하다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 초음파 조사강도에 따라 생성되는 과산화수소의 양이 증가하였는데, 이는 초음파 조사에 의해 생성되는 수산화 라디칼(hydroxyl radical)간의, 혹은 하이드로퍼옥실 라디칼(HO₂[•])간의 결합으로 인하여 생성되는 것이므로 (Mark et al., 1998), 더 많은 양의 과산화수소 생성은 미생물의 세포벽에 직접적으로 영향을 끼치는 이들 라디칼들이 더 많이 생성되어 미생물 성장을 억제하였음을 의미한다. 뿐만 아니라, 초음파 조사 중 일어난 공동현상의 인접 구역 미생물은 활성산소(reactive oxygen species)의 영향으로 인해 내부 물질 (intracellular)인 DNA와 효소(enzyme)의 피해가 세포 사멸을 야기 할 수도 있다 (Li et al., 2018). 이를 통해, 초음파 조사에 의한 소독의 효과가 급격하게 크지는 않았으나, 초음파에 조사된 미생물의 재증식을 지체시키는 효과는 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 소독 혹은 산화의 효과를 상승시킬 수 있는 적절한 산화제나 촉매 등의 조합을 통해 항생제 내성세균의 사멸을 위한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 폐수에 존재할 수 있는 그람 양성/음성세균에 대하여 초음파 소독을 통한 불활성화 정도 및 항생제 감수성 변화에 대해서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

그람 음성균은 그람 양성균보다 초음파를 통한 불활성화 효과가 크다. 시간 및 강도 증가에 따라 그람 음성균의 불활성 정도는 증가하나, 그람 양성균은 강도 및 시간의 변화에 따른 불활성이 거의 이루어지지 않았다. 그러나, 처리 후 24시간 배양하였을 때, 초기 CFU와 유사한 농도로 재활성화 되었다.

항생제 감수성 변화는 그람 양성균에 비해 그람 음성균에서 더 민감하게 나타났다. 초음파를 조사한 5가지 항생제 계열에 대해서 페니실린 계열 항생제에 대하여 가장 큰 감수성 증가를 보였으며, 숄폰아미드 계열 항생제에 대해서는 모든 균들의 저항성에 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 간섭효과 때문으

로 추정되며, 초음파 처리 후 24시간 경과 후 감수성을 다시 측정했을 때, 감수성을 확보했던 균들이 대부분 저항성을 지니게 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

그람 음성균의 경우, 감수성 변화와 세균 불활성간에 음의 상관관계를 보였다. 초음파 조사 강도의 변화와 상관없이 세균 불활성화는 감수성을 증가하는 효과를 야기하나, 균이 재활성화되면 저항성을 갖는 균의 비율이 증가하여 항생제 저항성을 회복하였다.

사 사

이 연구는 환경부와 환경산업기술원의 “환경정책기반공공기술개발사업 (과제번호 2016000200012)”으로 지원받은 과제입니다. 이에 감사드립니다.

References

- Al-Badaii, Fawaz, and Mohammad Shuhaimi-Othman. (2014). Water pollution and its impact on the prevalence of antibiotic-resistant E. coli and total coliform bacteria: A study of the Semenyih river, Peninsular Malaysia, Water Qual. Expo. Heal., 7(3), 319-330.
- Barancheshme, F and Munir, M. (2018). Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants, Front. Microbiol., 8, 2603.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu O.D., and Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance, Nat. Rev. Microbiol., 13(1), 42-51.
- Bouki, Chryssa, Danae Venieri, and Evan Diamadopoulou. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review, Ecotoxicol. Environ. Saf., 91, 1-9.
- Burgos, J., Ordóñez, J. A., and Sala, F. (1972). Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of Bacillus cereus and Bacillus licheniformis spores, Appl. Environ. Microbiol., 24(3), 497-498.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions, Environ. Sci. Technol., 48(13), 7602-7611.
- Chan, M. World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance, 9789241509763, 1-5.
- Flórez-Acosta, O. A., Giraldo-Aguirre, A. L., Serna-Galvis, E. A., Torres-Palma, R. A., and Silva-Agredo, J. (2016). High

pp. 177-190

pp. 191-204

pp. 205-213

pp. 215-224

pp. 225-234

- frequency ultrasound as a selective advanced oxidation process to remove penicillinic antibiotics and eliminate its antimicrobial activity from water, *Ultrason. Sonochem.*, 31, 276-283.
- Fahrenfeld, N. and Bisceglia, K.J. (2016). Emerging investigators series: Sewer surveillance for monitoring antibiotic use and prevalence of antibiotic resistance: Urban sewer epidemiology, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 2(5), 788-799.
- Foladori, P., Laura, B., Gianni, A., and Giuliano, Z. (2007). Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge, *Water Res.*, 41(1), 235-243.
- Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., and Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism, *Ultrason. Sonochem.*, 21(1), 454-460.
- Jean, B., Melvin, P., Geroge, M., Stephen, G., James, S., Brandi, L., Amy, J., Tony, M., Robin, P., Sandra, S., Michael, S., Jana, M., Maria, M., John, D., and Barbara, L. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and laboratory standards institute, USA, 32-64.
- Jim, O.N. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, *Rev. Antimicrob. Resist.*, 1(1), 11-15.
- Joyce, E., S. S. Phull, J. P. Lorimer, and T. J. Mason. (2003). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured bacillus species, *Ultrason. Sonochem.*, 10(6), 315-318.
- Kim, D., Song, S., and Park, Y. (2010). A comparison of single disinfection process for inactivation of *E. coli*, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, 25(1), 25-32.
- Kimura, Takahide, Takashi, S., Jean, M., Hajime, S., Mitsue, F., Shigeyoshi, I., and Takashi, A. (1996). Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction, *Ultrason. Sonochem.*, 3(3), S157-S161.
- Larsson, D. G. J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K. K., de Roda Husman, A. M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C.F., Gaze, W.H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C.M., Nielsen, K.M., Plant, L., Ploy, M.C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K., Snape, J., Topp, E., Hengel, A.J., David, W.V.J., Virta, P.J.M., Wellington, E.M., and Wernersson, A.S. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance, *Environ. Int.*, 117, 132-138.
- Lee, H. (2010). Antibiotics degradation and disinfection of antibiotic-resistant bacteria in UV/O₃-based advanced oxidation process, Master's Thesis, Myongji University.
- Li, J., Chen, S., Suo, Y., Ding, T., Liao, X., Ye, X., and Liu, D. (2018). Multiple action sites of ultrasound on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Food. Sci. Hum. Wellness*, 7(1), 102-109.
- Lofrano, G., Pedrazzani, R., Libralato, G., and Carotenuto, M. (2017). Advanced oxidation processes for antibiotics removal: A review, *Curr. Org. Chem.*, 21(12), 1054-1067.
- Lowy D. Frankiln. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Invest.*, 3(3), 1265-1273.
- Madge, B.A. and Jensen, J.N. (2002). Disinfection of wastewater using a 20-kHz ultrasound unit, *Water Environ. Res.*, 74(2), 159-169.
- Manaia, C.M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fontunato, G., Iakovides, Iakovos C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., and Olga, C.N. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box, *Environ. Int.*, 115, 312-324.
- Mark, G., Tauber, A., Laupert, R., Schuchmann, H.P., Schulz, D., Mues, A and Von Sonntag, C. (1998). OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution - Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield, *Ultrason. Sonochem.*, 5(2), 41-52.
- Mortazavi, S. M. J., Darvish, L., Abounajmi, M., Zarei, S., Zare, T., Taheri, M., and Nematollahi, S. (2015). Alteration of bacterial antibiotic sensitivity after short-term exposure to diagnostic ultrasound, *Iran. Red Crescent Med. J.*, 17(11).
- Ministry of Health and Welfare. (2016). National action plan on antimicrobial resistance, 1-7.
- Nomura, H., Koda, S., Yasuda, K., and Kojima, Y. (1996). Quantification of ultrasonic intensity based on the decomposition reaction of porphyrin, *Ultrason. Sonochem.*, 3(3), S153-S156.
- Pitt, W.G., McBride, M.O., Lunceford, J.K., Roper, R.J., and Sagers, R.D. (1994). Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38(11), 2577-2582.
- Yu, H., Chen, S., and Cao, P. (2012). Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria: A review, *Ultrason. Sonochem.*, 19(3), 377-382.