

접촉 표면의 강성 변화에 따른 박테리아의 군집 패턴

김중경, 박은정, 김성래, 조명옥, 한화택
국민대학교 기계·자동차공학부, 웰빙환경기술연구소

Bacterial Pattern Formation in Response to the Stiffness of Substrates

J. K. Kim, E. J. Park, S. R. Kim, M. Y. Cho, and H. Han
School of Mechanical and Automotive Engineering, Research Institute for Well-Being
Environmental Technology, Kookmin University

ABSTRACT

Animal cells show different behaviors in response to the mechanical properties of the substrates. We hypothesize that the rigidity of the substrates also affects the bacterial motility and controls the colony dynamics. It is found that the colony size of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* grown on the agar plates is correlated with agarose gel concentrations and thus with the substrate rigidity. High-resolution microscopic imaging reveals that bacteria in single colonies form different aggregation patterns on the agar plates with varying gel concentration. We measured the apparent diffusion coefficients in the agarose gel plates made with different gel concentrations. Mathematical modeling and quantitative imaging of dye dispersion in the agar plates suggest that there is a close connection between the diffusion rate and the colony size. Nanoscale pore structures and kinetic constraints in the porous media may have an effect on bacterial colony dynamics.

서론

박테리아는 콜로니(콜로니)를 이루며 성장하게 되는데, 일반적으로 아가로스 젤(아가로스 젤)로 구성된 고체배지에서 성장에 필요한 영양분을 공급하여 박테리아의 증식을 유도한다. 표면에서 박테리아의 증식은 다양한 환경요인에 영향을 받게 되며, 적절한 환경조건 제어를 통해 박테리아의 증식을 조절하는 방법을 모색하는 많은 연구가 그동안 진행되어왔다.

동물세포가 기질의 강성을 느끼고 반응하며, 세포의 거동이 기질의 강성에 영향을 받는다는 사실이 많은 선행연구에 의해 밝혀졌다. 본 논문에서는 표면에 부착되어 성장하는 박테리아가 동물세포와 같이 접촉 표면의 기계적 성질에 반응하여 거동이 변화되는지 확인하고자, 박테리아의 일종인 *Escherichia coli* (*E.coli*)와 *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*)를 사용하여 표면의 강성이 박테리아의 거동에 미치는 영향을 살펴 보았다. 이를 위해 동일한 조건에서 고체배지의 agar

농도 조절에 따른 강성 변화가 *E.coli*의 군집 거동(콜로니 dynamics)에 미치는 영향을 관찰하였다.

한편, 아가로스 젤에서 박테리아가 형성하는 콜로니의 성장은 개별 박테리아의 증식과 움직임을 통해 촉진된다. 아가로스 젤과 같은 다공성 매질에서는 복잡한 공극 구조와 내부 액체의 점성으로 인해 물질 확산이 방해받게 되므로, 박테리아와 같은 작은 개체의 거동도 영향을 받을 것으로 예상된다. 이를 확인하고자, 농도가 다른 각 아가로스 젤에서 염료의 확산율을 측정하고, 농도에 따른 확산율의 변화와 *E.coli*의 콜로니 크기 변화 사이의 관계를 분석하였다.

실험 장치 및 방법

3차 증류수 1L당 Tryptic Soy Broth 30g 그리고 agar 0.5%(증류수 1L당 5g), 1.5%, 2.5%의 세 가지 농도로 조절한 후 각각 녹여 액체배지를 만들었다. *E.coli* 이외의 다른 균 영향을 최소화 하기 위해 120°C에서 15분간 멸균을 하였으며, 멸균한 액체배지를 80°C까지 식힌 후에 20ml씩 페트리디쉬에 붓고 굳혀서 고체배지를 만들었다.(Fig.1(a))

미생물 은행으로부터 분양받은 *E.coli* 2~3 콜로니를 따서 액체배지(증류수+skim milk) 속에 넣어 균 현탁액을 만들었다. PBS와 균현탁액을 799:1의 비율로 섞어서 800배가 희석된 stock을 만들었다.(Fig.1(b)) 콜로니들 사이의 영향을 줄이기 위해서 희석시킨 stock을 사용하였는데, 만약 균현탁액을 희석시키지 않고 1 μ l씩 분사하게 되면 한 지점에서 여러 개의 콜로니가 생성되어 서로 성장하는데 영향을 주게 될 수도 있다. 이러한 이유 때문에 희석된 stock을 사용하였고, Fig.1(c)처럼 고체배지 위에 가로 및 세로 방향으로 각각 9mm의 간격을 두어 stock을 6 \times 5 격자모양으로 1 μ l씩 분사하였다. 분사한 고체배지를 incubator에서 21시간동안 배양한 후에 관찰하였다.

고체 배지의 강성을 수치적으로 표현하기 위한 실험을 하였다. 강성을 변화시키기 위한 방법으로 0.5%, 1.5%, 2.5%의 농도를 갖는 agar 젤을 이용하였으며, 보다 정량적인 강성측정을 위해 지름 28mm, 높이 80mm인 원기둥 모양의 고체배지를 만들었다. 그 위로 추(100g, 150g)를 올려놓고 변화된 길이를 측정해 변

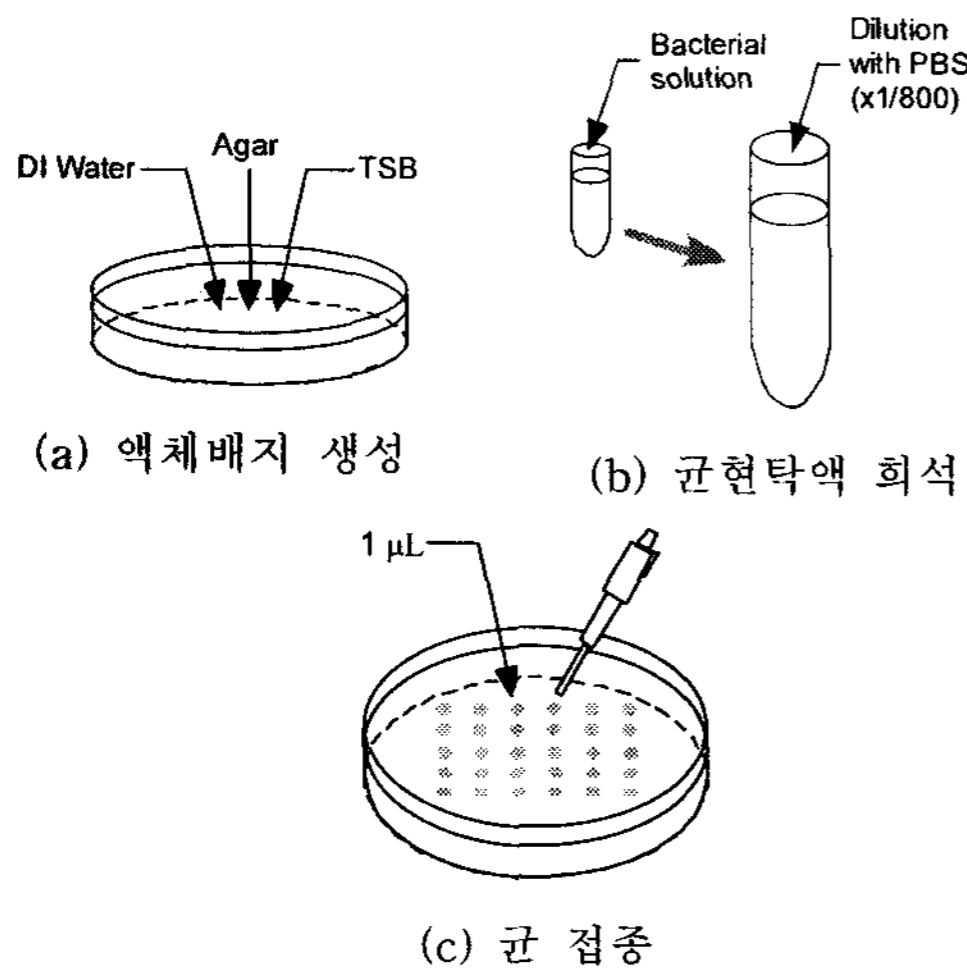


Fig.1. 아가로스 젤에서 박테리아 단일 콜로니 배양법

형량을 측정하였으며, 식(1)과 같이 추가 배지를 누르는 힘과 배지가 추를 미는 힘이 같다는 가정 하에, 아래 식(2)와 (3)을 이용하여 탄성계수를 구하였다.

$$F = m \cdot g = A \cdot \sigma \quad (1)$$

$$\varepsilon = \Delta L / L \quad (2)$$

$$E = \sigma / \varepsilon \quad (3)$$

아가로제 젤에서 확산율을 측정하기 위해, 일회용 주사기(5 mL)의 바늘을 이용하여 agar plate 중앙에 구멍을 생성하고, 그 안에 식용색소 염료 0.7 μL를 미세주사기(10 μL)로 주입하였다. 5분 간격으로 총 35분 동안 염료의 확산분포를 디지털카메라로 촬영하여 농도가 다른 각 agar plate에서 8장씩의 이미지를 얻었다. 대표적으로 선택된 데이터의 각 이미지에서 염료 주입부를 중심으로 동일한 크기의 영역을 잘라내었다. ImageJ 프로그램을 이용하여 천연색 이미지를 RGB로 분리한 후에 색이 부드럽게 나오는 초록색 이미지를 선택하였다. 역상시킨 이미지에서 수평방향과 수직방향의 지름에 대한 프로파일을 측정하였다. 각 방향에서 측정된 두 개 프로파일의 평균값을 취하고, 계조치의 최대값이 1, 최소값이 0이 되도록 정규화를 시켰다. 모든 사진은 동일한 조건(주위 광량, 위치 등의 미세한 차이)에서 얻어진 것이 아니므로 이러한 정규화 과정이 필요하다. 정규화된 각 프로파일에서 FWHM(Full Width at Half Maximum)을 측정하고, 겔보기 확산계수(apparent diffusion coefficient)를 결정하였다.

결과

아가로스 젤 농도에 따른 젤 탄성계수의 변화를 Fig.2에 나타내었다. 젤의 강성을 젤의 탄성계수로 나타내었다. 아가로스 젤 농도가 0.5%일 때 탄성계수는 5.42 kPa, 1.5%일 때 33.0 kPa, 2.5%일 때 95.9 kPa

이었으며, 각각 2.71, 3.30, 13.7의 표준편차를 보였다.

21시간 배양한 농도별 콜로니를 같은 배율로 찍어 이미지 파일로 만든 후 ImageJ 프로그램을 사용하여 콜로니 지름을 측정하였다. 콜로니 높이에 따라 이미지 파일의 밝기가 차이므로 이를 이용하여 바닥면으로부터 콜로니 높이의 1/3되는 지점을 지름으로 놓고 농도별 비교를 하였다. Fig.3에 나타나 있듯이 아가로스 젤 농도가 0.5%일 때 콜로니 지름이 2.22mm, 1.5%일 때 지름 1.37mm, 2.5%일 때 지름 1.07mm로 나타났으며, 각각 0.45, 0.33, 0.14의 표준편차를 보였다.

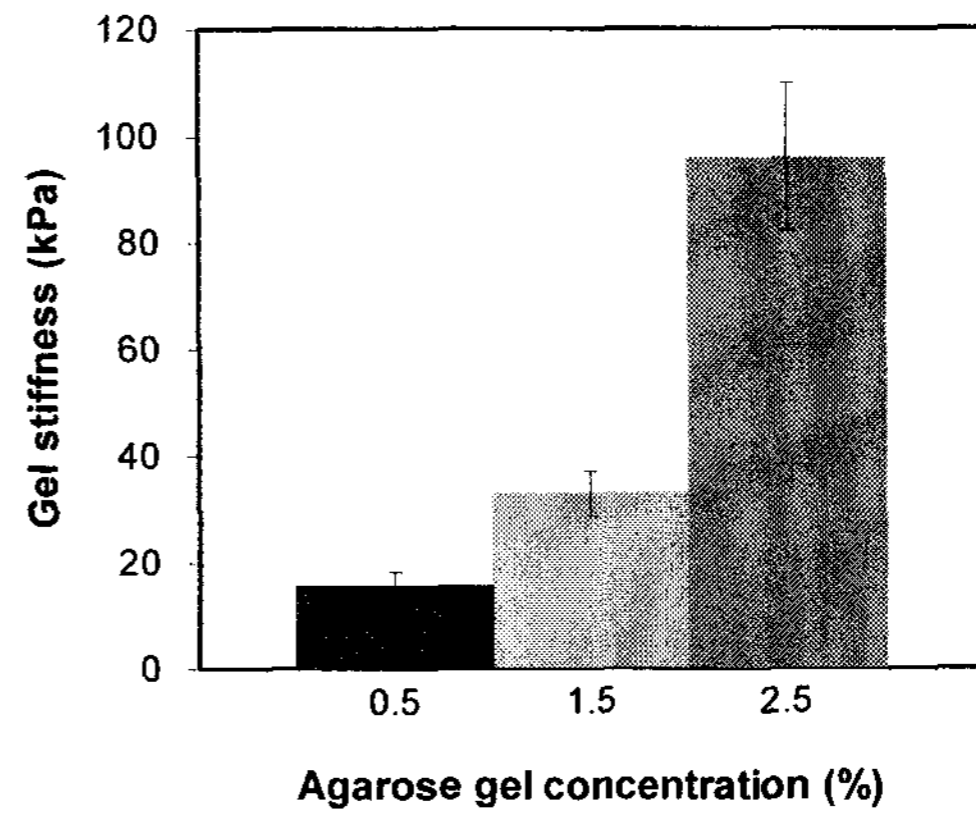


Fig.2. 아가로스 젤 농도에 따른 젤 강성 변화

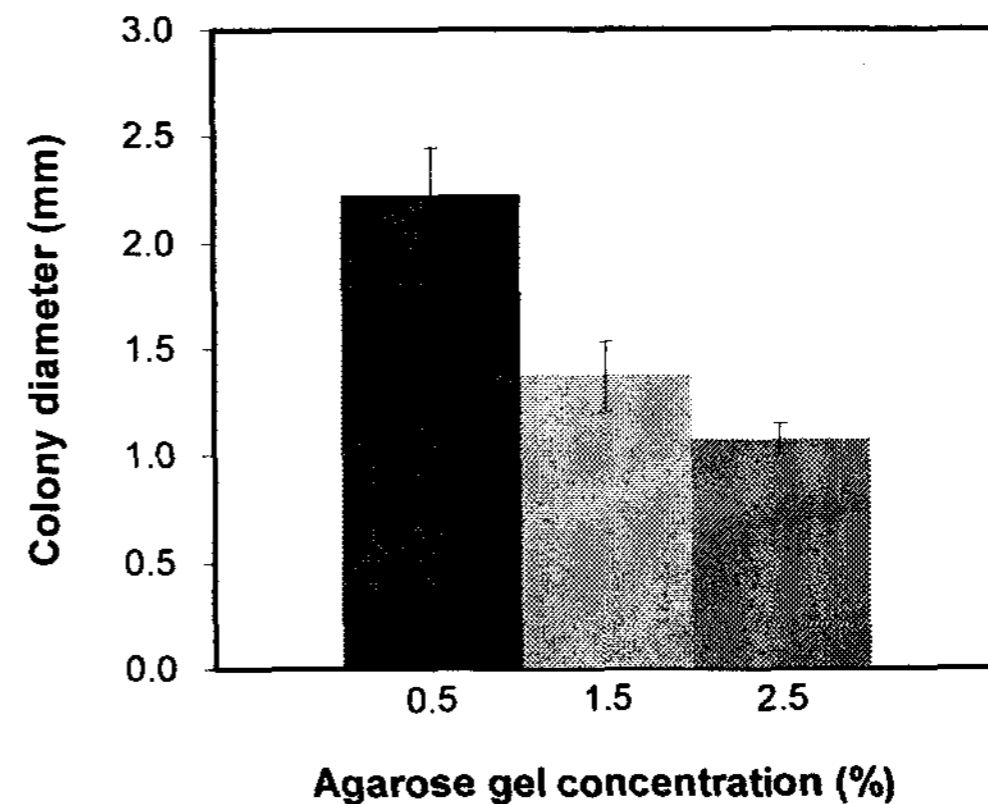


Fig.3. 아가로스 젤 농도에 따른 콜로니 크기 변화

젤 농도 0.5%와 2.5%에서 성장한 콜로니를 각각 하나씩 추출하여 광학현미경을 통해 900배의 배율로 관찰하였다. 평균적으로 E.coli 개체 한 개 길이가 젤 농도 0.5%에서 더 길게 나타났으며, 인접한 박테리아 사이 공간도 더 크게 나타났다. E.coli가 접촉하는 배지 표면의 강성에 따라 달라지는 E.coli 군집 패턴을 Fig.4에 나타내었다.

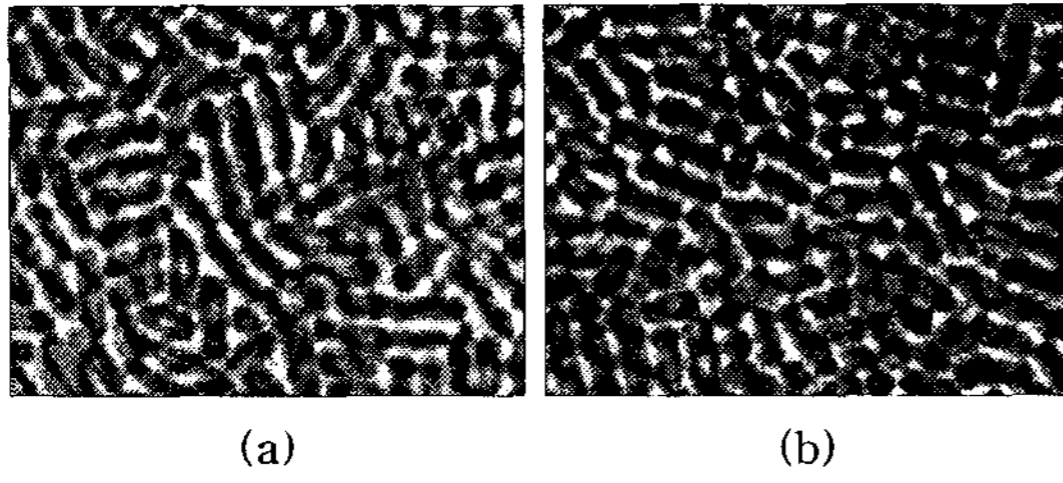


Fig.4. 아가로즈 젤의 농도 (a) 0.5%, (b) 2.5%일 때 단일 콜로니에서 관찰되는 E.coli의 군집 패턴 (배율 900x)

Fig.5는 농도가 다른 각 agar plate에서 촬영한 염료의 확산분포 이미지(10분간격)를 나타내고, Fig.6은 정량적인 이미지 처리법을 통해 얻은 정규화된 확산 프로파일을 보여준다. Fig.7은 젤 농도 0.5%, 1.5%, 2.5%일 때 시간에 따른 FWHM의 변화 그래프를 나타내며, 2차원 확산을 가정한 회귀 분석결과가 나타나있다. 각 젤 농도에 따른 겔보기 확산계수 D_{norm} 을 농도 0.5%일 때 값을 이용해 정규화하여 Fig.8에 나타내었다.

각 젤 농도에서 배양한 E.coli의 콜로니 면적을 정규화하여 Fig.8에 함께 나타내었다. 젤 농도가 증가함에 따라 겔보기 확산계수와 콜로니 면적이 매우 유사한 비율로 감소한다는 사실을 확인할 수 있으며, 이는 아가로즈 젤에서 콜로니의 성장에 확산 현상이 밀접하게 관련되어 있음을 의미한다.

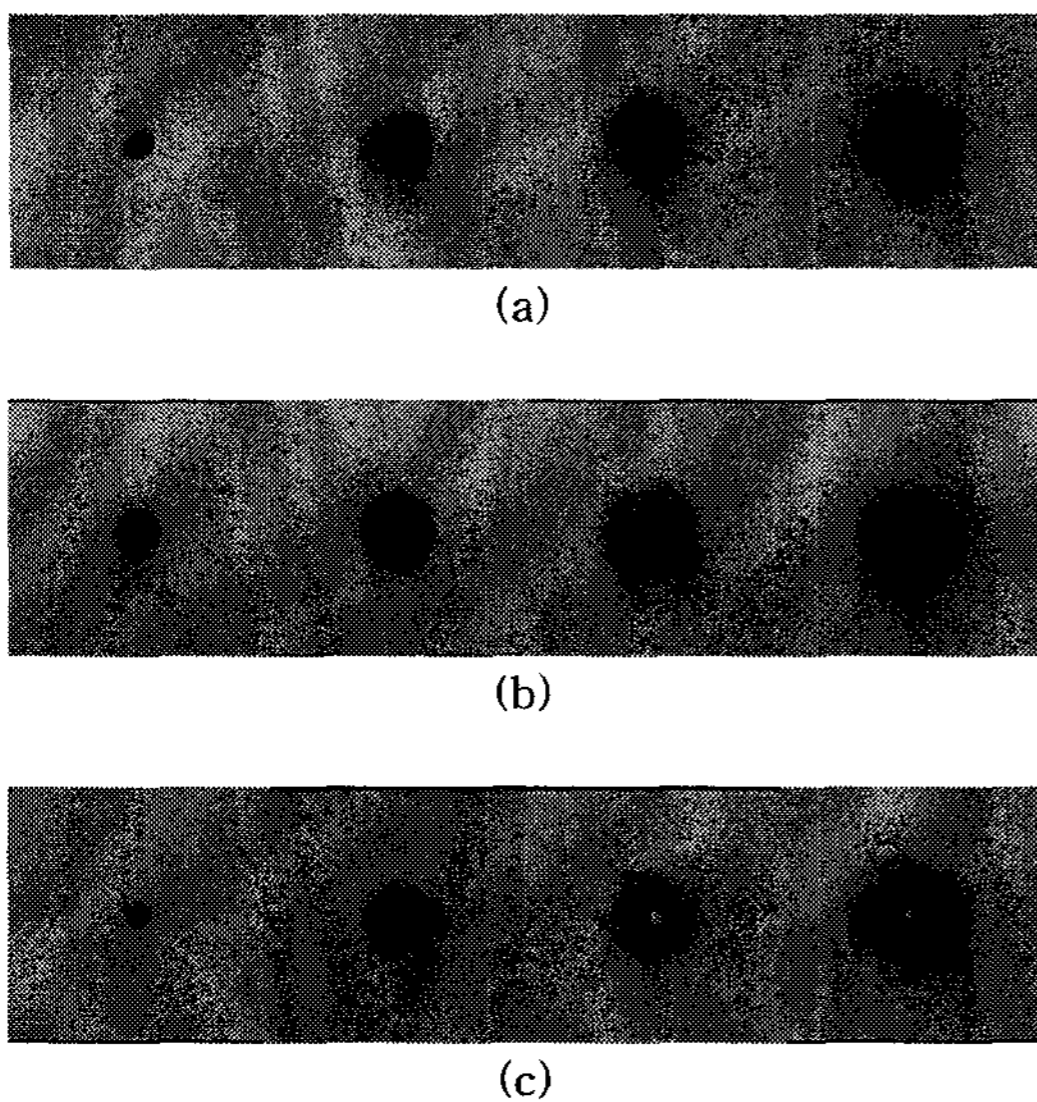
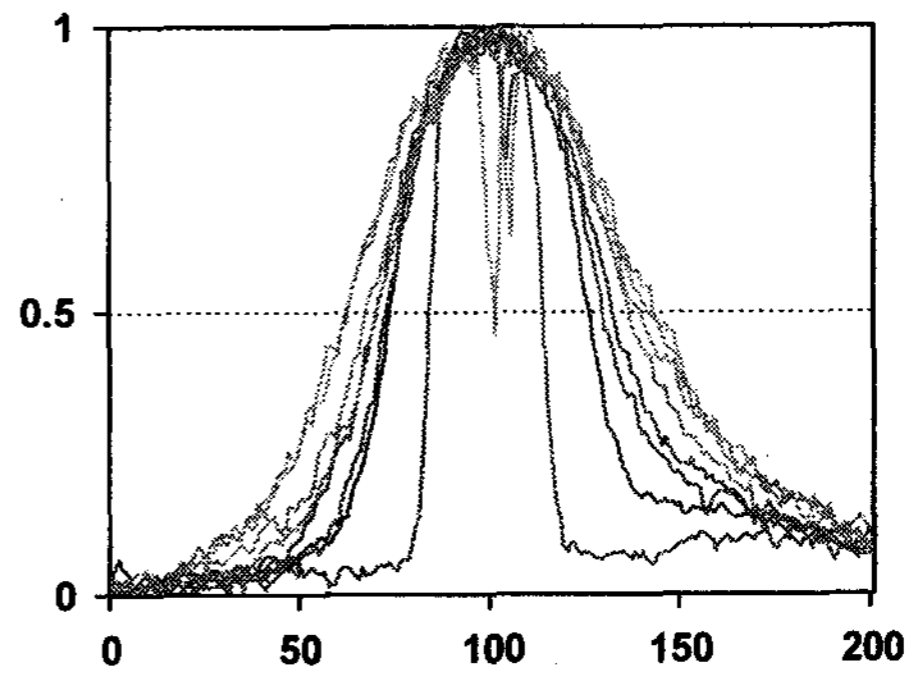
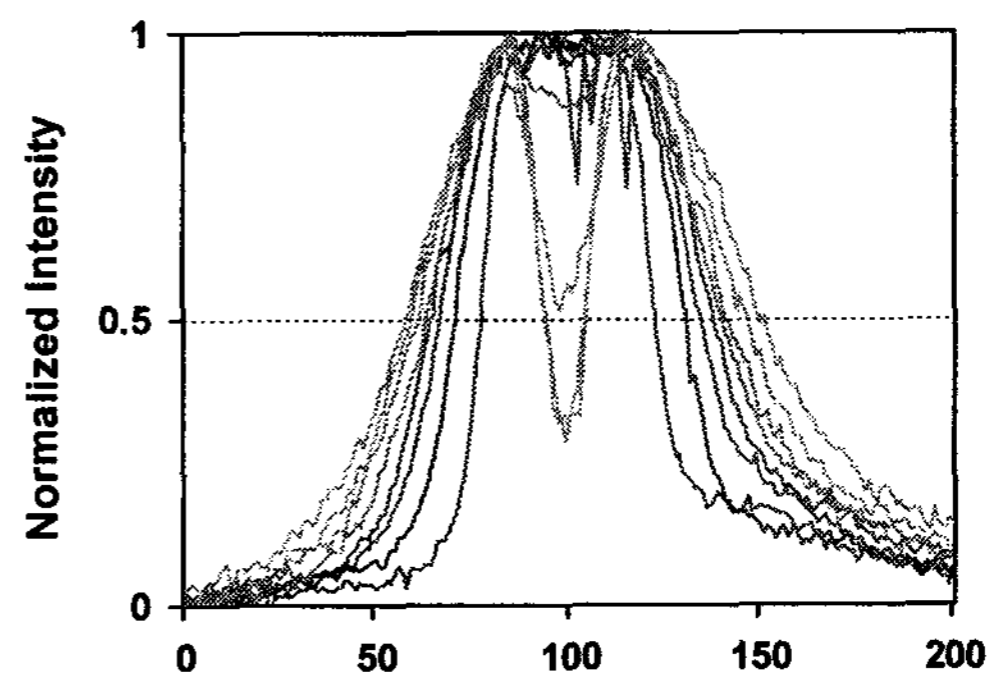


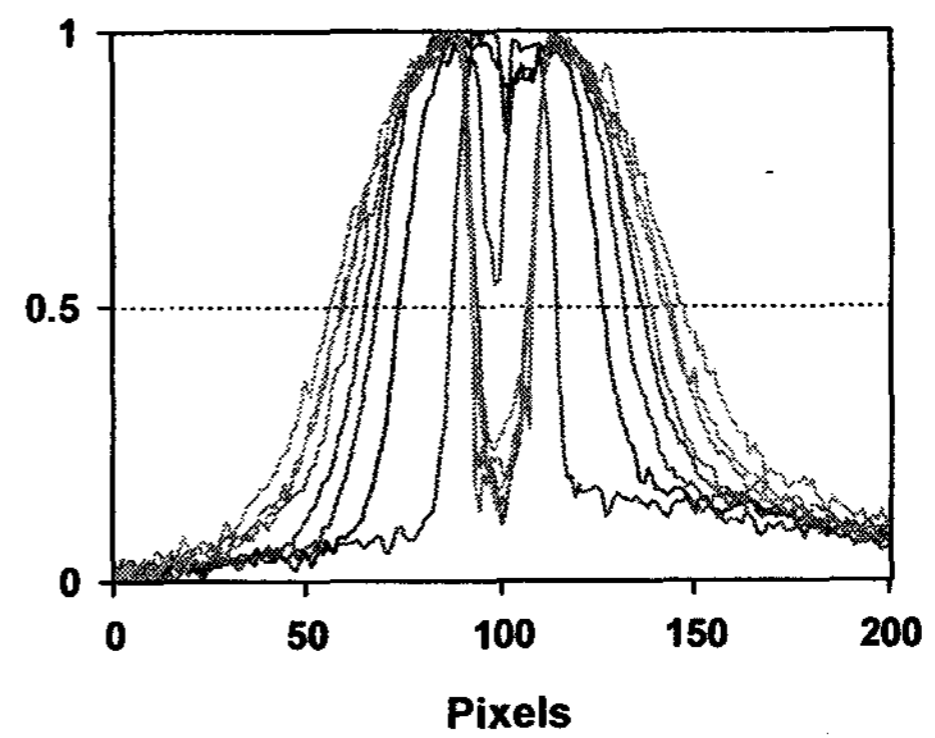
Fig.5. 아가로즈 젤 농도에 따른 염료의 확산분포 이미지. 젤 농도 (a) 0.5% (b) 1.5% (c) 2.5%



(a)



(b)



(c)

Fig.6. 정규화된 확산 프로파일. 젤 농도 (a) 0.5% (b) 1.5% (c) 2.5%에서의 염료 확산. (가운데 부분이 밑으로 내려간 이유는 염료 주입할 때 생긴 구멍 때문임)

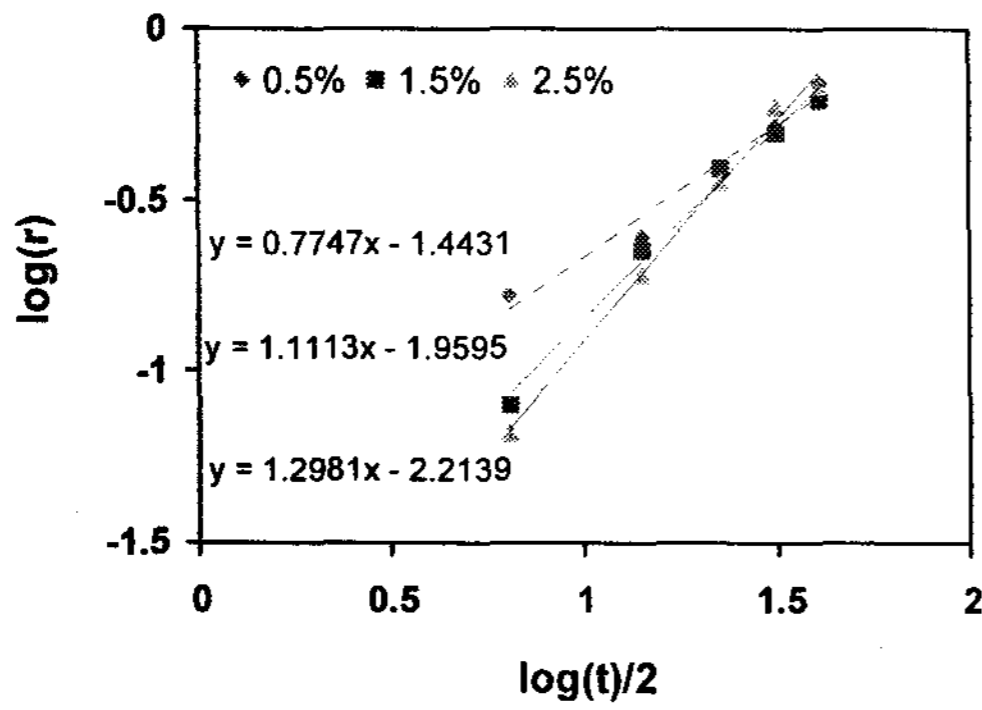


Fig.7. 로그함수로 변형시킨 확산 관계식의 그래프와 선형회귀분석결과. 이를 통해 겔보기 확산계수 D 값을 구함. ($r^2=0.9718, 0.9874, 0.9947$)

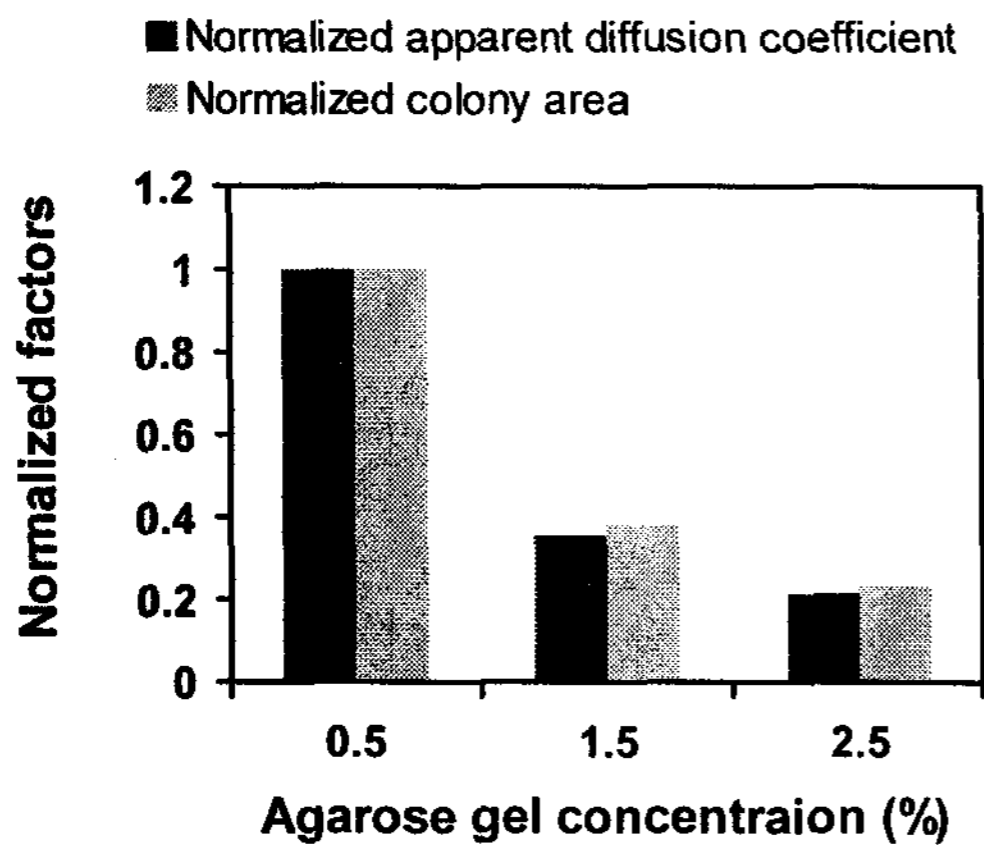


Fig.8. 아가로스 겔 농도에 따른 겔보기 확산계수와 박테리아 콜로니 면적 (최대값이 1이 되도록 농도 0.5%일 때 값을 이용하여 정규화)

고찰

박테리아의 콜로니는 표면의 물질적 특성이나 온도조건 등의 다양한 요소들이 작용하여 증식한다. 이러한 콜로니의 성장은 아가로스 겔의 구조적인 특성과 운동제약을 바탕으로 증식한다. 복잡한 다공성 구조(tortuosity effect)로 인해 미생물의 움직임이 방해받기도 하며, 공극을 채우고 있는 액체의 점성(viscosity effect)으로 미생물의 성장이 방해받기도 한다. 이러한 미생물 성장 환경 중에서 표면의 기계적 특성과 운동 제약을 통해 그 증식을 제어하는 전략을 찾는 것이 이러한 연구의 궁극적인 목표이다. 본 연구진과 다른 연구팀의 선행연구를 통해 아가로스 겔의 농도가 높을수록 박테리아의 콜로니 크기가 작아진다는 사실이 확인되었다. 이러한 결과는 겔의 농도로 접촉표면의 기계적 성질을 변화시켜 콜로니의 성장을 제어할 수 있음을 의

미한다.

이번에 수행한 아가로스 겔에서 겔 농도에 따른 확산현상에 관한 연구는 아가로스 겔에서 콜로니의 성장이 물질 확산과 밀접한 관계가 있음을 보여준다. 현재 본 연구팀에서는 agar plate에서 증식하는 박테리아의 개별 또는 군집 거동을 고배율 형광현미경 기법을 이용해 실시간으로 관찰하는 연구가 진행 중이며, 이를 통해 접촉표면의 기계적 성질에 영향을 받는 박테리아의 군집 거동에 대해 심층적인 이해가 가능할 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Stecchini M. L., Torre M. D., Sarais I., Saro O., Messina M. and Maltini E., Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3), 1075-1078, 1998.
2. Discher D. E., Janmey P. and Wang Y.-L., Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science.* 310, 1139-1143, 2005.
3. Stecchini M. L., Torre M. D., Donda S., Maltini E. and Pacor S., Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*, *Internat. J. Food Microbiol.* 64, 81-88, 2001.
4. Lo C.-M., Wang H.-B., Dembo M. and Wang Y.-L., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys. J.* 79, 144-152, 2000.