

박테리아 생체막에 대한 항생제 내성 연구

김진욱 · 주치언 · 박진용 · 이송애 · 김인혜 · 이재화*
신라대학교 공과대학 생명공학과

The Study of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms

Jin Wook Kim, Chi Un Joo, Jin Yong Park, Ae Song Lee, In Hae Kim, and Jae Hwa Lee*
Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, kwaebop-dong 1-1,
Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

(Received November 30, 2005 / December 26, 2005)

ABSTRACT : Antibiotic resistance of bacteria in the biofilm mode of growth contributes to the chronicity of infection and disease. The penetration of antibiotic, through biofilm developed in an *in vitro* model system was investigated. Antibiotic resistant bacteria (*E. coli*) were obtained from Culture Collection of Antibiotic Resistant Microbes. Ca-alginate bead used as simulated biofilm and a cell entrapment test using compressed air were experiment for the improvement cell viability. Antibiotic susceptibilities though biofilms was measured by assaying the concentration of antibiotic that diffused through the biofilm to minimal inhibition concentration (MIC). Survival of immobilized cells were reduced as compared to free cells. In case of antibiotic susceptible *E. coli* reduced continuously, but antibiotic resistant *E. coli* kept up survival rate constantly. Survival was showed after exposed to the antibiotics that the more treated antibiotic resistant *E. coli* and low concentration of antibiotics, the more survived.

Key words : Biofilm, antibiotics resistant bacteria, Ca-alginate bead

서 론

Biofilm은 고농도의 박테리아들이 신체 조직에 부착하여 다당류 또는 단백질로 둘러싸여있는 미생물의 일반적인 형태이다. Biofilm의 형성은 병원성 박테리아의 성장에서 화학합성 항생제에 대한 내성과 2차 감염 발생에 매우 중요한 역할을 한다 (Stewart *et al.*, 2001).

Biofilm이 화학합성 항생제에 대한 내성 기작으로는 대략 3가지로 정의하고 있다 (Anderl *et al.*, 2000). 첫 번째로는 화학합성 항생제의 침투 제한으로 항생제에 대한 내성을 획득하는 방법이다. 이 가설은 박테리아의 외부에 존재하는 다당류 물질에 의해서 화학합성 살균제, 양이온 항생제 그리고 항균 단백질들의 내부 침투제한으로 효과적인 항생제 내성을 획득한다는 것이다. 두 번째로는 biofilm으로 인해 생기는 생체막 내부 환경의 변화에 의해서 항생제 내성을 획득하는 방법이다. 이 가설은 외부의 다당류에 의해서 산소의 투과나 pH의 변화가 발생하여 항생제의 최적 조건을 만족하지 못하여 내성을 획득하는 것이다. 이 가설에서 중요하게 작용하는 것은 산소 투과율로 볼 수 있는데, biofilm에서 산소 투과

가 잘 이루어지는 biofilm 외부에 존재하는 박테리아들은 사멸하는 것을 확인할 수 있지만, biofilm 내부로 들어갈수록 산소 투과량도 줄어들고 동시에, 박테리아 사멸율도 감소하는 것도 확인할 수 있다. 이는 가용 산소량에 따라 대사 활성에 차이에 의해서 박테리아 집단의 이질성이 발생하여 내성을 획득하는 것으로 볼 수 있다. 세 번째로는 biofilm은 흔히 알려져 있는 포자와 유사한 형태를 취하여 항생제에 대한 감수성을 감소시키는 역할을 하여 항생제에 대한 내성을 획득하는 것이다. biofilm 내부에 존재하는 박테리아들의 대부분은 항생제에 의해 사멸하지만, 1% 혹은 그 미만의 박테리아들은 항생제 존재 하에서 살아남을 수 있고, 그 항생제에 대항할 수 있는 유전적 변이도 획득하게 된다 (Drenkard 2003).

위와 같은 항생제 내성 기작들에 의해서 *in vitro*상의 감수성 실험에서는 일반적인 현탁배양에서 사용되는 MIC 농도의 100~1000배 정도의 높은 농도의 항생제에서도 생존하는 것을 확인할 수 있고, *in vivo* 실험에서 항생제는 부착된 biofilm으로부터 떨어져 나온 박테리아들을 사멸시켜 감염징후는 줄일 수 있었으나, biofilm내에 존재하는 모든 박테리아 세포들을 전부 사멸시킬 수는 없다. 항균제 활성이 감소하면 biofilm 내부의 박테리아들이 감염을 재발생 시킬 것이다. 이

*To whom correspondence should be addressed

와 같이 biofilm감염은 외과적 수술로 제거하지 않으면 계속 해서 존재하여 만성감염을 유발한다 (Stewart *et al.*, 2001).

Biofilm을 구성하는 물질은 외부의 다당류와 단백질들로 알려져 있으며, 만성 폐질환을 발생하는 *Pseudomonas aeruginosa*의 biofilm의 구성물질은 흔히 고정화 물질로 사용되는 alginate로 구성되어 있다 (Drenkard 2003).

본 연구에서는 위에서 언급한 alginate를 이용하여 인공 biofilm을 형성하고, 그 인공 biofilm에 대해 항생제 감수성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 *E. coli*는 항생제 내성은행에서 공시된 Ofloxacin 항생제에 대한 감수성을 가진 *E. coli* 15080와 Ofloxacin 항생제에 대한 내성을 가진 *E. coli* 15093 두 가지 균주를 사용하였다. *E. coli*의 배양 배지는 YPD 배지를 사용하였으며, 37°C에서 250 rpm으로 배양하여 실험에 사용하였다.

균수의 측정

총 균수의 측정은 배양액을 10배수 희석법으로 희석한 후, 준비된 고체 배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말을 하였다. 도말된 배지를 37°C에서 12시간 배양하여 균 집락수 (CFU: colony forming unit)를 측정하여 총 균수를 계산하였다. 동일한 방법으로 1% sodium citrate 용액에 용해된 bead의 총 균수를 확인하였으며, 위 과정을 3회 반복 실시하여 평균값을 계산하여 나타내었다.

Ca-alginate bead 제조

제조된 YPD 배지 50 mL에 균주 5 mL를 접종하여 37°C에서 배양한 후 생균수 농도가 1.2×10^{10} cell/mL이 되는 대수증식기 말기의 균체 배양액을 준비하였다. 준비된 배양액을 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 균체만 회수하여 4% sodium alginate 용액 10 mL과 혼합하여 배양혼합액을 준비하였다. 이후 준비된 배양혼합액을 24G, 27G, 30G blunt ended needle 주입하여 2 kg/cm^3 의 압력으로 compressed air를 이용하여 0.1 M CaCl_2 100 mL에 떨어뜨려 bead를 형성 하였다. bead 형성 시 magnetic bar를 이용하여 CaCl_2 용액을 교환함으로써 문칫 방지와 bead의 고른 형성을 유도하였다. 형성된 bead를 0.1M CaCl_2 을 이용하여 3회 세척한 후 3 μm pore size의 filter paper를 이용하여 회수한 후 사용하였다.

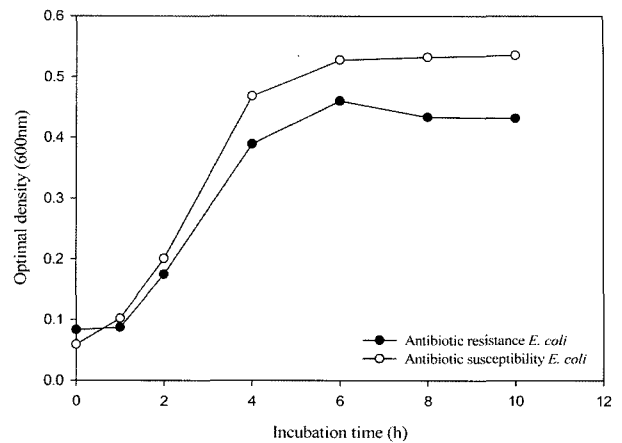


Fig. 1. Growth kinetics of antibiotic resistance and susceptibility *E. coli*.

Ca-alginate bead 형성시 안정성 및 항생제 감수성 측정

제조된 bead의 안정성을 측정하기 위해서 100개의 Ca-alginate bead를 5 mL의 0.1 M CaCl_2 4°C에서 반응시킨 후 3 μm pore size의 filter paper를 이용하여 회수하였다. 회수된 bead를 1% sodium citrate 5 mL에 혼합 용해시켜 생균수 측정법을 이용하여 안정성을 측정하였다. 동일한 방법으로 항생제에 대한 감수성 측정하였다. 제조된 bead를 각각 100개 준비한 후 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 ofloxacin 용액 5 mL을 4°C에서 반응시킨 후 1% sodium citrate 5 mL에 혼합 용해시켜 생균수 측정법을 이용하여 감수성을 측정하였다 (Lee *et al.*, 2000).

결과 및 고찰

내성균주의 성장곡선

항생제 내성균주 은행에서 분양받은 *E. coli*를 test tube를 이용한 YPD배지 10 mL에 접종하여 37°C에서 250 rpm으로 12시간 배양한 다음 다시 300 mL 삼각플라스크 (working volume: 50 mL)에 접종하여 배양한 결과, Ofloxacin에 대한 내성을 가진 *E. coli*가 항생제에 민감한 *E. coli* 보다 적게 성장하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1).

Alginate bead 크기 및 형태

제조된 YPD 배지에 *E. coli*를 접종한 후 37°C에서 배양하여 생균수 농도가 1.2×10^{10} cell/mL이 되는 대수증식기 말기의 균체를 회수하여 4% sodium alginate 용액 10 mL과 혼합된 배양혼합액을 준비하였다. 이후 준비된 배양혼합액을 24G, 27G, 30G blunt ended needle 주입하여 2 kg/

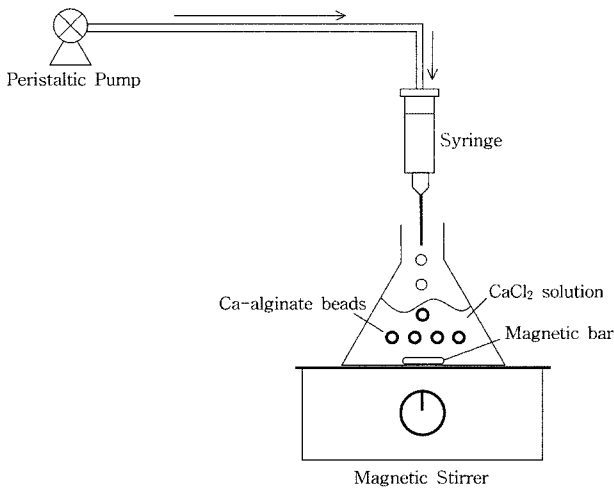


Fig. 2. Diagram to prepare the beads by Ca-alginate and CaCl₂.

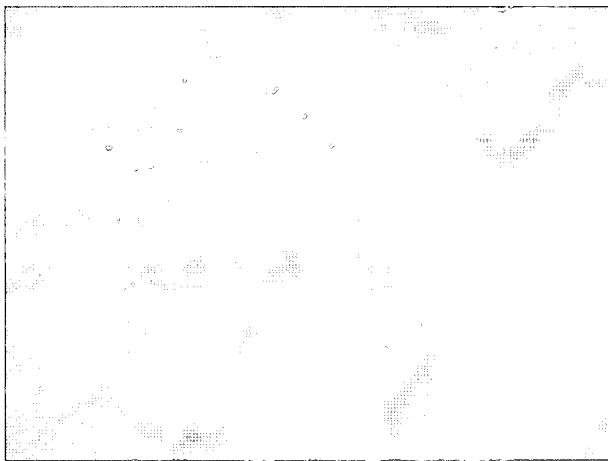


Fig. 3. The morphology of Ca-alginate beads entrapping *E. coli*.

Table 1. The size distribution of Ca-alginate beads in various needle size

Alginate (%)	Needle size	Air pressure (kg/cm ³)	Ca-alginate bead size
4	24 G	2	4.0 mm
	27 G		2.8 mm
	30 G		1.8 mm

cm³의 압력으로 compressed air를 이용하여 0.1 M CaCl₂ 100 mL에 떨어뜨려 다양한 크기의 bead를 형성하였다 (Fig. 2, 3). 이 결과, needle size에 따라 bead의 크기가 비례적으로 커지는 것을 알 수 있었는데, 24G needle size에서는

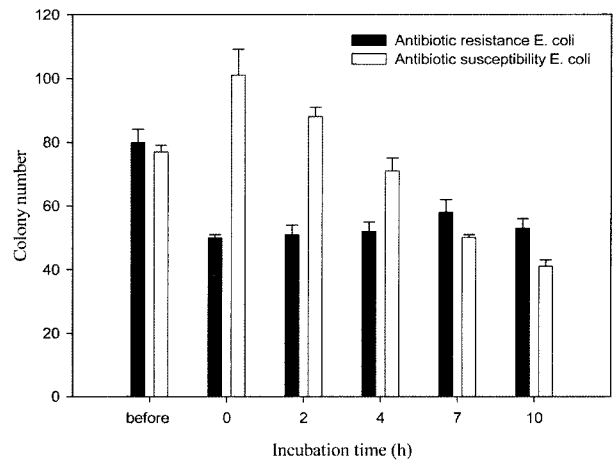


Fig. 4. Survival of immobilized cells and free cells stored at 4°C.

약 4.0 mm 크기의 bead가 생성되었고, 27G, 30G needle size에서는 각각 2.8 mm, 1.8 mm 크기의 bead가 형성된 것을 확인하였다 (Table 1). 이러한 결과는 needle size가 커질수록 compressed air로 인해 밀려진 alginate 혼합액의 액체 방울이 크게 형성되고, 이렇게 형성된 액체 방울이 0.1M CaCl₂에 떨어짐으로서 bead의 크기 역시 크게 형성되기 때문이다.

Bead 생성에 따른 균체의 안정성

Bead 생성에 따른 균체의 안정성을 측정하기 위해서, bead 생성 후 CaCl₂에 보관하여 4°C에서 bead 생성 전, 0, 2, 4, 7, 10시간에 bead를 각각 100개씩 회수하여 1% sodium citrate 용액에 혼합 용해시켜 생균수를 측정한 결과, 항생제에 민감한 *E. coli*는 시간이 지남에 따라 균체수가 감소하는 것을 확인 할 수 있었으나, 항생제 내성 *E. coli*는 bead 생성 전보다는 감소하였으나, 시간이 지남에 따라 감소하지 않고 일정량의 균체수를 유지하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 4).

Bead 형성 후 항생제 투여 효과

Bead 형성 후 항생제 투여 효과를 확인하기 위해서, ofloxacin 항생제에 민감한 *E. coli*와 항생제 내성 *E. coli*에 인위적 biofilm을 형성하여 항생제 침투저해로 인한 항생제 내성생성 기작 확인해본 결과, 항생제 농도가 낮을수록 *E. coli*에 내성이 있을수록 생존률이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 그러나 bead 형성에 따라 생존률이 증가하는 것이 아니라, 항생제 내성에 의해서 생존률이 증가하는 하는 것으로 볼 수 있었다. Ofloxacin의 경우 인위적 biofilm인

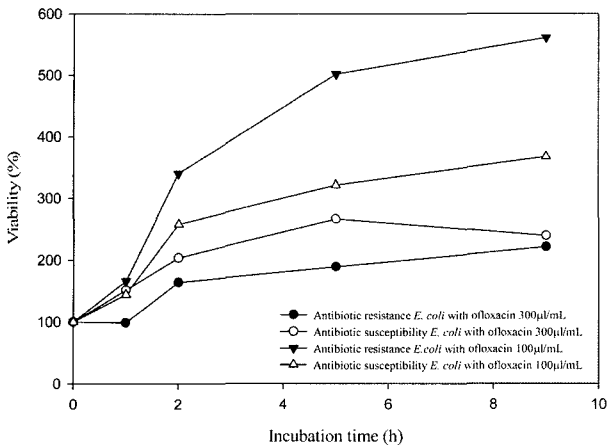


Fig. 5. Survival of *E. coli* in beads after being exposed to the antibiotics.

alginate를 효과적으로 침투하는 것을 알 수 있었다. 차후 연구에서 생체 내 내성균주가 생성하는 biofilm과 유사한 물질을 이용하여 인위적인 bead를 형성한다면 보다 정확한 내성 메커니즘을 규명하는데 기여할 수 있을 것이다.

요 약

Biofilm 내부의 항생제 내성 박테리아의 성장형태는 만성 감염과 질병을 발생한다. 인위적 형성한 biofilm의 체외실험 모델 시스템 통한 항생제 침투 실험을 수행하였다. 항생제 내성 균주 (*E. coli*, *S. aureus*)는 항생제 내성균주 은행으로부터 획득하였다. Ca-alginate bead를 인위적 biofilm으로 사용하였고, 세포 생존률을 향상시키기 위해 공기 압축을 이용한 세포 포획 실험도 측정되었다. biofilm의 항생제 감수성은 항생제의 농도 따라 최저 저해 농도 (MIC)를 이용하여 측정되었다. bead 생성에 따른 안정성은 bead를 형성하지 않은 세포와 비교하여 감소하였다. 항생제에 민감한 *E. coli*의 경우 시간이 지남에 따라 균체수도 감소하였으나, 항생제 내성 *E. coli*는 일정한 균체수를 유지하였다. bead 형성 후 항생제 투여 효과는 항생제 내성이 있고, 낮은 농도의 항생제를 처리할수록 더 높은 생존률을 보였다.

Reference

- Woo, C.J., Lee, K.Y. and Heo, T.R. (1999): Improvement of *Bifidobacteria longum* stability using cell-entrapment technique. *J. Microbiol. biotechn.* **9**(2), 132-139.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J. and Stewar, R.S. (2000): Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Ch.* **44**(7), 1818-1824.
- Wunwisa, K. and Bhandari, N. (2004): The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737-743.
- Lee, K.Y. and Heo, T.R. (2000): Survival of *Bifidobacteria longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2), 869-873.
- Lee, K.Y., Kim, J.Y., Lee, Y.J., Choi, E.H., Shin, D.H. and Heo, T.R. (2000): Estimating the viability of *Bifidobacteria longum* in Ca-alginate beads against simulated gastroenteric juice. *J. Microbiol. Biotechn.* **11**(1), 97-105.
- Stewart, P.S. and Costerton, J.W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *lancet.* **358**, 135-138.
- Lee, K.Y. and Heo, T.R. (1998): Particle size effects in buffer system using calcium carbonate bead immobilized with alginate for the cultivation of *Bifidobacterium*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**(2), 425-433.
- Brooun, A., Liu, S. and Lewis, K. (2000): A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Ch.* **44**(3), 640-646.
- Lee, K.Y., Kim, J.Y., Yu, W.K., Lee, Y.J., Yoon, S.S. and Heo, T.R. (2001): Survival of *Bifidobacterium breve* in acidic solutions and yogurt, following immobilization in calcium alginate beads. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**(3), 412-417.
- Yu, W.K., Kim, J.Y., Lee, K.Y. and Heo, T.R. (2002): High cell density cultivation of *Bifidobacterium longum* using a calcium carbonate-alginate beads systems. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**(3), 444-448.
- Ueng, Steve W.N., Yuan, L.J., Lee, N., Lin, S.S., Chan, E.C. and Weng, J.H. (2004): In vivo study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits. *J. Orthopaed. Res.* **22**, 592-599.
- Drenkard, Eliana. (2003): Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**, 1213-1219.