

세균 생물막 형성의 단계별 특징

김창범 · 노종복 · 이현경¹ · 최상호² · 이동훈¹ · 박순정³ · 이규호*

한국외국어대학교 환경학과, ¹충북대학교 생명과학부,
²서울대학교 식품공학과, ³연세대학교 의과대학 기생충학교실

Characteristics of Developmental Stages in Bacterial Biofilm Formation. Kim, Chang-Beom, Jong-Bok Rho, Hyun-Kyung Lee¹, Sang Ho Choi², Dong-Hun Lee¹, Soon-Jung Park³, and Kyu-Ho Lee*.

Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin, Kyunggi-Do, 449-791, Korea, ¹Division of Biological Science, Chungbuk National University; ²Department of Food Science and Technology, Seoul National University, ³Department of Parasitology, Yonsei University – Since Anton van Leeuwenhoek first observed a surface-associated multicellular structure of bacterial cells in the 17th century, it has been shown to exhibit an ability to form a biofilm by numerous bacterial species. The biofilm formation is composed of distinct developmental stages, which include an attachment/adhesion of a single cell, a proliferation toward monolayered coverage, a propagation to aggregated microcolony, a maturation to 3-dimensional structure, and subsequently a local degradation. Investigation to identify the essential factors for bacterial biofilm formation has been performed via classical genetic approaches as well as recently developed technologies. The initial stage requires bacterial motility provided by a flagellum, and outer membrane components for surface signal interaction. Type IV-pilus and autoaggregation factors, *e.g.*, type 1-fimbriae or Ag43, are necessary to reach the stages of monolayer and microcolony. The mature biofilm is equipped with extracellular polymeric matrix and internal water-filled channels. This complex architecture can be achieved by differential expressions of several hundred genes, among which the most studied are the genes encoding exopolysaccharide biosyntheses and quorum-sensing regulatory components. The status of our knowledge for the biofilms found in humans and natural ecosystems is discussed in this minireview.

Key words: Developmental stages, adhesion, monolayer, microcolony, mature biofilm

세균은 생태계 내 각 서식지의 특성에 따라 부유하거나 또는 부착하는 양식으로 구성된 생활사를 이루며 살고 있는데, 이 중, 다양한 무생물 및 생물체의 표면에 부착하여 생물막(biofilm)을 형성한 개체군/군집의 경우, 영양분의 고갈, 산성도의 변화, 삼투압의 증감, 온도의 변화, 산화적 충격, 독성물질의 노출 등 여러 환경적인 스트레스에 대한 저항성이 현저히 증가된다고 알려져 있다[42, 48]. 이는 38억년이라는 긴 세월 동안 생존하면서 진화를 거듭해온 세균이 불리한 환경에서 생존, 적응, 번식할 수 있는 다양한 전략을 발휘함에 있어서 필수적인 단계의 하나로서 생물막 생활양식을 이용하고 있음을 짐작하게 한다.

세균에 의한 생물막 형성은 17세기 네덜란드 과학자 Anton van Leeuwenhoek가 현미경을 이용하여 처음으로 관찰되었다. 그는 인간의 치아 표면에서 plaque를 관찰하면서부터 일종의 생물막 모양을 발견하여 보고하였다[4]. 생물막에 대한 과학적인 접근은 Claude Zobell에 의해 세균이 해

양구조물 표면에 부착하여 성장하는 것을 관찰함으로써 본격화되었다[57]. 최근에는 새로운 기술 및 방법을 이용한 연구를 통하여 생물막에 부착한 미생물들이 복잡한 기작에 의한 정교한 방식으로 군집을 이루고 있음이 밝혀지고 있다.

현재까지의 발견에 의하면 생물막은 세균군집, 군집 외부의 extracellular polymeric matrix (EPM), 그리고 군집 내부의 water-filled channel 등으로 구성되어 있다고 알려져 있다. EPM에 의해 다른 개체들의 부착이 증진됨으로서 생물막의 크기는 점점 더 증가하며, 이때 water-filled channel은 생물막 내부로 영양분 및 산소를 공급해주는 역할을 한다고 알려져 있다. 그러므로 하나의 성숙된 생물막 구조를 이루는 세균들의 생리학적 특징은 동일하지 않으며, 오히려 그 구조물 내에서 각기 다른 역할을 수행하고 있는 상태라고 추정된다. 따라서 생물막은 그 자체가 하나의 고유한 생태학적 지위(ecological niche)를 갖추고 있다는 개념으로까지 인식되고 있다.

생물막 형성 발달 단계

세균의 생물막은 단순한 세균의 집합체라기보다는, 표면

*Corresponding author
Tel: 82-31-330-4039, Fax: 82-31-330-4529
E-mail: khlee@san.hufs.ac.kr

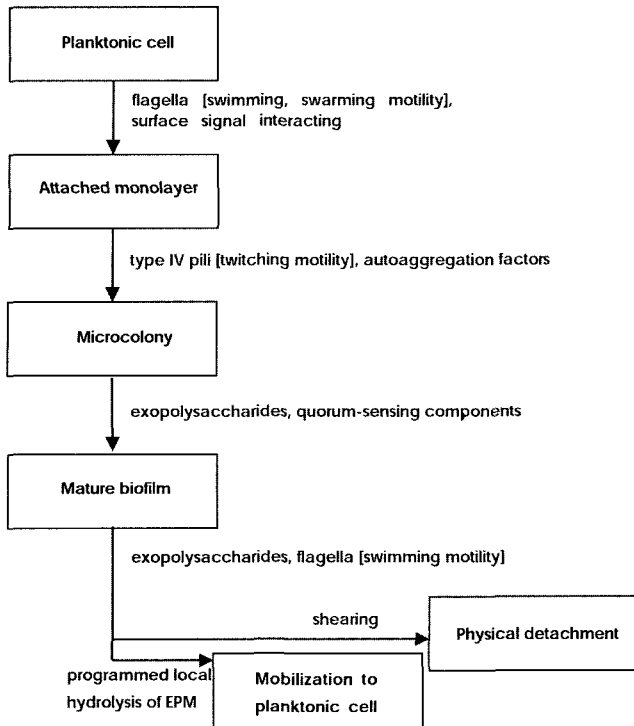


Fig. 1. Developmental processes for construction of a bacterial biofilm [5].

접촉 및 세포부착 → 세균 monolayer 형성 → 미세미생물군락(microcolony) 형성 → 3차원 구조를 갖춘 성숙 생물막 형성 → 생물막의 해체 및 전이 등 여러 발달단계를 거치면서 성숙된 구조로 완성 된다(Fig. 1). 각 단계별 주요 기작들의 존재 및 역할, 조절인자에 대한 연구가 현재 국내외 많은 연구팀에 의해 진행 중인데, 그람음성 세균으로는 *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 등이 그리고 그람양성 세균으로는 *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* 등에 대해 집중적인 연구가 진행 중이다.

세균부착 및 미세미생물군락 형성

생물막 형성은 세균의 편모운동성(flagellar motility)에 의해 유영 중 표면에 가역적으로 부착한 다음 비가역적 부착으로 전환되면서 시작한다. 이러한 비가역적 부착 세균은 편모운동성을 상실하고, 단수축운동성(twitching motility)에 의해 monolayer를 형성한다. 다음 단계로서, 개체군의 증식에 따라 미세미생물군락이 형성되는데, *Pseudomonas*의 경우 약 10 μm 두께의 미세미생물군락을 이룬다고 보고 되었다[44].

배지 내 유기영양분의 성분, 온도, 삼투, 산성도, 철, 산소 등의 배양조건 및 생물막형성을 위해 제공된 매질의 특징이 생물막 형성 능력에 영향을 끼치는 것으로 보고 되었다[32, 36, 41]. *V. cholerae*에서는 *mshA* 유전자가 코딩하는 pilus는 이 세균이 chitin으로 구성된 표면에 부착하는데 관여하고,

그리고 또 다른 Tcp pilus는 장 상피에 부착하여 생물막을 형성하는 과정에 관여한다고 보고 되었다[20, 49, 51]. 이는 *V. cholerae*가 주어진 무생물적 또는 생물적 표면에 따라 다른 독립적인 부착 과정을 가지고 있는 것을 의미한다.

3차원적 구조를 갖춘 성숙 생물막 형성

미세미생물군락의 성장에 의해 다음 단계인 3차원적 구조물의 특징을 갖춘 성숙된 생물막이 완성되게 된다. Confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 이용하여 성숙된 생물막을 살펴보면 탑 또는 버섯 모양의 입체구조가 관찰되는데, 이는 세균과 이들이 분비한 EPM으로 이루어진 비교적 견고한 구조물이다. 구조물 내에는 영양분 및 산소를 전달 시키는 통로(pillars, water channel structures)가 구비되어 있는데, 이는 생물막이 물리적 요인에 의해 쉽게 해체 또는 분리되지 않도록 하는 역할을 하기도 한다[8]. 세균의 종류에 따라 성숙된 생물막의 크기는 다르지만 *Pseudomonas*의 경우, 최대 100 μm 두께를 갖춘 구조물이 형성된다고 보고 되어 있다[44].

생물막을 구성하고 있는 *Pseudomonas*의 단백질체를 부유상태 성장기의 단백질체와 비교하였을 때, 약 800개의 단백질이 발현의 변화를 보였으며, 이 중 50% 이상의 단백질이 6배의 증가를 보였다. *Pseudomonas*의 경우, 주요 exopolysaccharide (EPS)라고 알려진 alginate 합성관련 단백질의 합성에 큰 변화가 수반된다(3-1항 참조). 또한 *Pseudomonas*의 정족수인식 조절체계에 있어서 상위단계 조절단백질인 LasR은 생물막의 성숙도를 높이는데 중요한 영향을 미치는데, LasR에 의해 50여 가지의 단백질이 성숙된 생물막 형성 시 조절을 받게 된다[44].

일반적으로 세균은 그림 1에서 보인 보편적인 생물막 형성 단계를 거치지만, 세균에게 주어진 외부 환경의 조건에 따라 각 단계 별 완성 정도 그리고 다음 단계로의 진행 여부 등이 결정되는 듯 하다. 또한 생물막 형성 정도 및 여부는 세균 별로도 특징적인 차이를 보인다. *E. coli* K-12의 경우, 특정 아미노산이 결핍된 최소배지에서 생물막 형성이 현저히 감소된 반면, *E. coli* O157:H7은 낮은 영양분 상태의 배지에서 생물막 형성이 증가된다[10, 41]. *P. fluorescens*에서는 생물막 형성 능력이 감소된 *sad*(surface attachment-defective) 유전자 돌연변이 균주에 citrate를 첨가한 경우, 그 능력이 야생종의 것만큼 증가되는 것이 관찰되었는데(O'Tool and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998), 이는 생물막 형성에 있어서 특정 탄소원의 대사과정이 필요하기 때문일 것이라 짐작된다.

생물막의 해체 및 전이

생물막 구조의 크기는 무한정으로 증가하지 않는다. 이는 생물막의 크기가 너무 비대해질 경우, water-filled channel 등을 통한 물, 공기, 영양분의 공급에 문제가 생기며, 생물

막 내에서 적절하게 운영될 수 있는 각 세균들의 역할 분담이 불가능해지기 때문이라 판단된다. 또한 성숙된 생물막 주변의 빈 공간이 완성 전의 발달단계를 보이는 미성숙 생물막 구조물들로 채워져 나감이 자주 관찰된다. 즉, 생물막을 구성하는 세균 개체군은 자신이 속한 성숙된 생물막 자체의 성장을 통하여 증식하기 보다는, 주변의 표면에 전이할 수 있는 능력을 갖추어서 증식한다고 보여진다.

이 시기, 성숙된 생물막 내에서 초기 발달단계에서 잃었던 편모운동성을 갖춘 개체들이 재출현하게 되는데, 이들은 생물막을 전이 또는 분산시키는 주체로서 역할을 한다. 세균의 EPS 합성 또는 배출에 이상이 발생하여 EPS의 양 및 그 구성에 변화가 초래된 경우, 성숙된 생물막의 유지, 전이, 해체에 있어서 야생종이 보이는 것과 다른 양상을 보이게 된다[14].

생물막 형성에 필요한 유전자산물

생물막에 대한 관심이 증가되면서 생물막 형성에 관여하는 다양한 요인과 조절체계를 총체적으로 알아보기 위한 연구가 세균의 유전체 및 단백질체 수준에서 진행되었다. 부유 상태와 생물막 상태의 세균을 채취하여 이들의 mRNA 발현 정도를 microarray를 이용하여 비교하거나, 이들의 단백질을 2-D gel 상에서 비교한 후 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)로서 동정하는 방법론이 사용되고 있다. 생물막 형성에 필요한 유전자를 알아보기 위한 전통적인 방법으로 연구 대상 세균의 돌연변이균주군(mutant pool)을 제작하여 각 균주를 microtiter(96-well) plate에 배양한 후 crystal violet 또는 safranin으로 단순염색을 함으로서 형성된 생물막을 정량적으로 비교하는 연구가 수행되었다. 이로부터 생물막 형성 능력이 변화된 돌연변이균주를 획득하고 그 특성을 동정함으로써 그 과정에 관여하는 필수 유전자를 찾아내는 기법이 자주 사용되고 있다[13].

세균부착

생물막 형성 초기 부착 과정과 관련된 인자로서 유영성 운동에 필수적인 편모[27] 및 표면신호작용(surface signal interaction) 인자로 알려진 CpxRA-regulon[37]이 알려져 있다. Enteropathogenic *E. coli*의 경우, 편모가 HeLa cell에 부착하는데 중요하며, 이 편모의 부착능은 병원성 *E. coli*를 비병원성 *E. coli*와 구분하는 중요한 특징으로 여겨지고 있다[17]. 한편 *Aeromonas*에서는 단편모(polar flagella)가 상피세포에 부착하는 것 외에도 미생물간의 조직적인 군집형성에 필수적이라고 보고된 바 있다[15].

CpxRA-signaling pathway는 *E. coli* 세포가 부착생활을 시작하면서 자신이 접촉한 무생물 표면의 물리적인 변화를 인식하고 이에 필요한 반응을 시작하게 하는데 필수적인 기작

이다. Two-component regulatory system을 이루는 CpxRA은 특히 소수성 표면에 부착 시 그 발현이 유도된다. 또한 CpxRA가 적절한 표면인식 기능을 통하여 세균의 안정된 부착을 하게 하는데 있어서 외막에 위치한 NlpE라는 lipoprotein의 존재를 반드시 필요로 한다고 알려져 있다[37].

미세미생물군락 형성

생물막 형성의 중간단계로서 미세미생물군락을 거치게 되는데, 이 과정은 쥐 등의 동물 모델을 이용한 감염 연구에서 관찰되었다. 그 결과 단수축운동성에 관여하는 type IV-pilus와 autoaggregation factor인 fimbriae, Ag43 등이 중요한 역할을 한다고 보고 되었다[19, 45].

부착한 후 monolayer를 이루는 *Pseudomonas*는 자신의 generation time 보다 짧은 시간 내에 미세미생물군락을 형성함이 현미경을 통하여 관찰되었다. 이는 미세미생물군락이 monolayer 상의 세포들의 증식만으로 이루어진다고 보다는 세균들이 type IV-pilus에 의해 표면을 이동하면서 한 곳에 집중된 결과라 할 수 있다[35]. *Neisseria*의 경우는 type IV-pili가 숙주세포에 부착된 미생물 간의 상호작용에 필수적이어서 미생물의 aggregation에 주요작용을 한다고 밝혀졌다[38]. 이러한 미세미생물군락은 숙주유래의 항 세균 기작에 대한 매우 유효한 방어벽으로 작동한다고 알려져 있다[22].

특별한 조건 하에서 형성되는 생물막의 경우, aggregation factor에 의해 미세미생물군락의 정도가 결정됨이 밝혀졌다. 예를 들면, 포도당-최소배지에 성장하는 *E. coli*가 생물막을 형성하는 과정에 있어서, Ag43 (*flu* 유전자 산물)과 type 1 fimbriae (*fim* 유전자 산물)가 필요함이 보고되었다[7, 19]. 흥미롭게도 이 단백질들은 세균의 상변이(phase variation)에 의한 군락표면 성질의 변화에 영향을 끼치는 요소로 알려져 있는데, 이는 Ag43과 type 1 fimbriae가 배양환경에 따라(habitat-specificity) 세균 표면의 변화를 야기함으로써 세균과 표면 그리고 세균과 세균 사이의 상호작용에 영향을 끼치고, 그 결과 생물막 형성이 촉진된다고 추측된다.

성숙 생물막 형성

성숙된 생물막을 완성하기 위하여 EPM 물질의 공급이 필수적이다. EPM은 다당류, 단백질, 그리고 핵산 등으로 구성되어 있고 생물막의 복잡한 구조를 견고히 지탱할 수 있게 하는 기능을 수행한다. 예를 들면, *P. aeruginosa*에서는 rhamnolipid 생성이 성숙된 생물막 구조에 필요하다고 보고되었는데[8, 33], 이는 계면활성제 역할을 하는 rhamnolipid가 미생물군락 사이의 유효 공간을 제공하는 역할을 함으로서 구조 내 통로를 형성하여 세균과 표면 그리고 세균과 세균 사이의 상호작용을 가능하게 한다고 알려져 있다. 그러므로 세균에 의한 이러한 물질의 생산 및 축적이 중단된 경우, 생물막은 그 구조적 복잡성이 감소되고 항 세균약품 등

에 대한 민감도가 증가한다고 알려져 있다[7, 52].

Exopolysaccharide (EPS) - 세균은 각 종에 따라 그리고 성장 조건에 따라 특징적인 EPS 물질을 세포외부에 축적하는데, 이 물질 중 일부는 생물막 발달 단계에 있어서 초기의 표면 부착 과정에 필요하기도 하고, 어떤 종류는 이 단계와는 별도로 생물막의 성숙기에 필수적인 구성 요소로 밝혀졌다. *P. aeruginosa*에서는 alginate라는 EPS 물질이 폐 기관에 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)을 일으킨다고 보고 되었다. 그러나 최근의 보고에 따르면 대부분의 *P. aeruginosa*는 non-mucoid로서 충분한 양의 alginate를 만들지 못하지만 같은 증상의 질병을 유발한다고 한다. 이는 alginate 이외의 EPS 합성에 관여하는 다른 인자들이 *P. aeruginosa*의 생물막 형성에 관여할 가능성을 제시하며, 이에 대한 탐색이 진행되고 있다[14, 29].

V. cholerae O1은 EPS 생성 여부에 따라 특이한 colony morphology를 보이는데[55], 예를 들면 EPS 합성이 증가된 rugose colony(colony 표면이 주름진) 모양을 보이는 균주는 향상된 생물막 형성 능력 및 염소소독에 대해 증가된 저항성을 보인다. 두 가지 유전자 cluster가 EPS 생합성에 직접적으로 관여한다고 보고 되었는데, VpsR, VpsT 그리고 HapR이라는 전사조절인자가 생물막형성 단계에 있어서 적절한 시기에 이 유전자 군들의 발현을 유도함이 밝혀졌다[3, 18, 43, 54, 56].

정족수인식 - 비교적 밀집된 환경인 생물막의 형성에 있어서 세균의 정족수 인식 기작이 필요하다는 보고는 매우 흥미롭다. 그람음성 세균의 정족수 인식 신호물질로 사용되는 acyl homoserine lactone(AHL)이 형성된 생물막 구조물 내에서 탐지되었으며, AHL 합성능력이 결여된 *lasI*-돌연변이 *P. aeruginosa*는 생물막 형성능력이 상당히 감소됨이 그 증거로서 제시되고 있다[9, 31]. AHL 합성능력이 결여된 돌연변이 *Serratia liquefaciens*의 경우, 외부에서 적당한 AHL을 첨가하면 야생종이 보이는 생물막형성 능력으로 회복됨이 관찰되었다[12].

*P. aeruginosa*에서는 정족수 인식 기작이 포함된 신호전달 체계 (signal transduction system)가 rhamnolipid의 생성에 관여한다고 보고 되었다[8]. 즉, RhII에 의해 합성되는 정족수 인식 신호물질인 *N*-butyryl-homoserine lactone이 RhIR과 결합한 후 *rhlABR* operon의 전사를 유도한다. 그 결과 rhamnolipid의 합성 및 배출이 일어나고 성숙된 생물막이 형성된다.

생물막 형성과 관련된 조절자로서 정족수 인식 조절자인 LuxR과 상동성을 보이는 단백질이 여러 종의 세균에서 동정되었다. LuxR 단백질은 해양세균 *Vibrio harveyi*의 발광 현상에 필수적인 *lux* 유전자의 발현을 직접적으로 조절하는 전사조절인자로 알려져 있다. LuxR 상동단백질로서 *V. cholerae*의 HapR, *V. anguillarum*의 VanT, *V. vulnificus*의 SmcR, 그리고 *V. parahaemolyticus*의 OpaR 등을 들 수 있

는데 이 조절자는 polysaccharide 합성에 관여하는 유전자들을 조절함으로써 phase variation을 일으키고 생물막 형성에도 관계한다[6, 21, 23, 25, 30, 40, 46]. *V. cholerae*의 경우, 생물막 형성에서는 또 다른 정족수 인식 조절자로 알려진 LuxO 단백질이 polysaccharide 합성을 조절하는 단백질인 *hapR* 유전자의 전사에 관여하므로 정족수 신호물질에 의한 생물막 형성이 단계별로 체계적으로 조절됨이 추정된다[18, 50, 56].

병원성세균의 생물막 형성

다양한 환경의 표면에 부착할 수 있는 세균은 진핵생물 조직에도 생물막을 형성할 수 있다고 보고 된 바 있다[39]. 특히 병원성 미생물의 경우 숙주의 상피조직에 침입 시 부착 및 증식 단계를 수반하게 되는데, 이때 숙주의 방어 기작 또는 외부에서 투여되는 항생물질에 대한 대응에 있어서 생물막 형성은 매우 효과적인 선택일 것이다. 실제로 생물막 상태로 존재할 때 항생제에 대한 세균의 저항성은 같은 종류의 세균이 부유 상태로 존재할 때보다 약 1,000배 이상 증가한다[16]. 아울러 병원성세균의 독성관련 유전자의 발현 및 병독성인자의 활성도는 자신의 개체군 밀도가 상대적으로 높은 상태인 생물막 형성 시에 증진된다[18]. 따라서 생물막 형성은 병원성미생물의 생존 및 병원성 발휘에 있어서 필수적인 단계로 인식이 되는 것이다.

위 항에서 언급된 생물막 형성에 있어서의 발달단계 및 각 단계별 주요 유전자에 대한 연구는 많은 종류의 병원성 세균을 대상으로 연구되어왔다. 이외에도 임상연구를 통하여 병원성세균의 생물막에 의해 야기되는 질병이 보고 되었는데, 예를 들면, 심장내막염(native valve endocarditis), 중이염(otitis media), 전립선염(chronic bacterial prostatitis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 치주염(periodontitis) 등이 있다[11, 53] (Table 1). 의료용 신체설치물(예를 들면, prosthetic heart valve, central venous catheter, urinary catheter, contact lens, intrauterine devices 등)에 세균의 생물막이 형성될 경우, 설치물의 부식이 야기되고 그로 인해 2차 질병까지 일으킨다고 알려져 있다. 미국에서는 연간 1,700억불에 달하는 인공보조물 이식 시술이 시행되는데, 시술 부작용의 80%가 세균의 생물막에서 기인한다고 밝혀졌을 정도로 세균의 생물막 형성은 여러 분야에서 주요 관심 대상으로 떠오르고 있다[2].

자연 생태계에서 형성된 생물막

생물막 형성과정 및 그 기작에 대한 연구는 주로 단일 종 위주의 병원성 관련 인자에 대한 연구 또는 편이상 실험실 환경에서 형성된 순수배양 생물막에 초점을 맞추어 이루어져 왔다[34]. 하지만, 대부분의 자연 환경에서 발견되는 생

Table 1. Diseases caused by pathogenic bacterial biofilms [11, 53].

Disease or infection	Microorganisms
dental caries (충치)	<i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Actinomyces</i>
gingivitis (치은염)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Veillonella parvula</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Treponema</i> spp.
periodontitis (치주염)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>micros</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Pseudomonas anaerobius</i> , <i>Eubacterium</i> spp., <i>Bacteroides intermedius</i> , <i>B. pneumosintes</i> , <i>Selenomonas sputigena</i>
otitis media (중이염)	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>
voice prostheses (인공후두)	<i>Candida</i> spp., <i>S. aureus</i>
hydrocephalus shunts(뇌수종)	CNS, <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., AGNB ^a
cystic fibrosis (낭포성섬유증)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>
valvular endocarditis(심내막염)	streptococci, staphylococci, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pneumococcus</i> spp., <i>S. bovis</i>
prosthetic heart valves (인공심장판막)	CNS ^b , <i>S. aureus</i> , streptococci, <i>Enterococcus</i> spp.
central venous catheter (중심정맥관)	CNS, <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , AGNB, <i>Candida</i> spp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>
prosthetic hip/knee joint (인공고관절/슬관절)	CNS, <i>S. aureus</i> , <i>Peptococcus</i> spp., AGNB
chronic bacterial prostatitis (만성세균성전립선염)	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Gardnerella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.
intrauterine devices (자궁내 장치)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
urinary catheter (요도관)	AGNB, <i>Enterococcus</i> spp., CNS, <i>Candida</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

^a AGNB, aerobic Gram-negative bacilli

^b CNS, coagulase-negative staphylococci

물막은 다수의 미생물 중 뿐 아니라 진핵생물도 포함한 복잡한 양상으로 구성되었을 것으로 예측된다. 현재까지 자연계에서 형성된 생물막에 대한 이해 수준은 이를 구성하는 미생물 종류의 파악 및 간단한 활성도에 대한 분석 수준에 머물러 있다.

생물막을 형성하는 세균군집 구조에 대한 연구로는 공중 보건상의 문제로 dental unit water system에 사용되는 물이나 음용수에 형성된 생물막에 대한 연구가 있었다. 5-cyano-2,3-ditolyli tetrazolium chloride(CTC) 염색방법과 fluorescence in situ hybridization(FISH)을 사용하여 음용수 안에 생물막이 형성되는 동안 세균군집의 대사 능력과 계통 분류학적 다양성이 연구되었다. 그 결과, 생물막의 생성 초기단계 세균들의 호흡률이 연속적으로 감소하며, 생물막이 형성되는 재질에 따라 개체군의 조성이 다르나, 군집을 이루는 세균 중 β -Proteobacteria가 우점종임을 알 수 있었다 [24].

자연계에서 발견되는 생물막 내 미생물 다양성을 조사하는데 있어서도, 배양방법에 기초한 기술은 여타 미생물생태학 분야에서 지적된 바와 같이 생물막을 형성하는 균주를 검출하고 동정하는데 그 한계가 있다[47]. 이에 CTC 염색방법과 FISH, denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) 분석법을 이용하여 세균군집 구조와 생리 활성 여부가 연구되었는데, 부유성 세균 군집보다 생물막 내의 세균들의 대

사작용이 보다 활발하게 나타났으며, β -Proteobacteria와 *Cytophaga-Flavobacterium*이 생물막 내에 우점함을 보였고, 생물막의 조성에 있어서 성숙기 이후(3-7일 후에는 거의 군집의 변동이 없음이 보고 되었다[1].

해양 생물막을 형성하는 세균군집 구조에 대한 연구는 이제 시작되고 있는 상태인데, 16S rDNA에 기초한 방법을 이용하여 해양 생물막으로부터 얻은 clone library를 조사한 결과, sulfate-reducing bacteria가 그 군집에서 풍부함을 보였다. 이 밖에도 α -, γ -Proteobacteria, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*(CFB) group bacteria, high GC 그람양성세균, low GC 그람양성세균 등이 주요 군집구성원으로 밝혀졌다 [28]. 해양 생물막 형성의 초기단계에 관여하는 균주로서 *Micrococcus luteus*, *Bacillus thuringiensis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sulfitobacter ponitiacus* 등이 분리, 동정되었다[26].

결 어

앞에서 서술한 바와 같이, 세균의 적극적인 생존 양식인 생물막의 형성은 인간에게는 환경적, 산업적, 의학적 문제점을 야기하기도 한다. 따라서 이를 해결하기 위한 제어방법의 개발을 위하여, 세균 생물막에 대한 군집 및 개체군 수준, 그리고 세포 및 분자 수준에서의 총체적인 연구가

필수적이다. 즉, 자연생태계에서 보이는 복잡한 구성의 생물막에 대한 체계적인 이해가 필요하다. 아울러 다양한 종류의 세균이 생물막을 형성함에 있어서 정족수인식 기작을 운용한다는 보고와 같이, 각 세균의 신호물질 및 그 전달 체계에 대한 철저한 이해도 필요하다. 신호체계의 기작 및 역할 그리고 생물막 내 주요 세균간의 상호관계 등에 대한 지식을 기반으로, 주요 세균 별 그리고 생물막 발달/천이 단계 별로 특이하고 효율적인 제어방법의 제시가 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부가 주관하고 있는 마린바이오21사업 해양·극한생물분자유전체연구단의 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

- Araya, R., T. Katsuji, T. Tatsuya, Y. Nobuyasu, and N. Masao. 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 111-119.
- Bryer J. D. and B. D. Ratner. 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News.* **70**: 232-237.
- Casper-Lindley, C. and F. H. Yildiz. 2004. VpsT is a transcriptional regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **186**: 1574-1578.
- Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**:86-95.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Croxatto, A., V. J. Chalker, J. Lauritz, J. Jass, A. Hardman, P. Williams, M. Camara, and D. L. Milton. 2002. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **184**: 1617-1629.
- Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**: 3593-3956.
- Davey, M. E., N. C. Caiazza, and G. A. O'Tool. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**: 1027-1036.
- Davies, D. G., M. R. Parsek., J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- Dewanti, R., and A. C. L. Wong. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* **26**: 147-164.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
- Eberl, L., M. K. Winson, C. Sternberg, G. S. Stewart, G. Christiansen, S. R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin, and M. Givskov. 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**: 127-136.
- Friedman, L., and R. Kolter. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**: 675-690.
- Friedman, L., and R. Kolter. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**: 4457-4465.
- Gavin, R., A. A. Rabaan, S. Merino, J. M. Tomas, I. Gryllos, and J. G. Shaw. 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **43**: 383-397.
- Gilbert, P., J. Das, and I. Foley. 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* **11**: 160-167.
- Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**: 361-379.
- Hammer, B. K., and B. L. Bassler. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 101-114.
- Hasman, H., M. A. Schembri, and P. Klemm. 2000. Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**: 1089-1095.
- Herrington, D. A., R. H. Hall, G. Lososky, J. J. Mekalanos, R. K. Taylor, and M. M. Levine. 1988. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* **168**: 1487-1492.
- Hoang, H. H., A. Becker, and J. E. Gonzalez. 2004. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* **186**: 5460-5472.
- Jensen, E. T., A. Kharazani, K. Lam, J. W. Costerton, and N. Hoiby. 1990. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immun.* **58**: 2383-2385.
- Jeong, H. S., M. H. Lee, K.-H. Lee, S.-J. Park, and S. H. Choi. 2003. SmcR and cyclic AMP receptor protein coactivate *Vibrio vulnificus* *vvpE* encoding elastase through the RpoS-dependent promoter in a synergistic manner. *J. Biol. Chem.* **278**: 45072-450781.
- Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk. 1997. Dynamics of biofilm formation in drinking water: Phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization. *Microb. Ecol.* **22**:

- 265-279.
25. Kovacicova, G and K. Skorupski. 2002. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter. *Mol. Microbiol.* **46**: 1135-1147.
 26. Kwon, K. K., H. S. Lee, S. Y. Jung, J. H. Yim, J. H. Lee, and H. K. Lee. 2002. Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. *J. Microbiol.* **40**: 260-266.
 27. Lee, J. H., J. B. Rho, K. J. Park, C. B. Kim, Y. S. Han, S. H. Choi, K.-H. Lee, and S.-J. Park. 2004. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* **72**: 4905-4910.
 28. Lee, Y. K., K. K. Kwon., K. H. Cho, H. W. Kim, J. H. Park, and H. K. Lee. 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *J. Microbiol.* **41**: 183-188.
 29. Matsukawa, M. and E. P. Greenberg. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **186**: 4449-4456.
 30. McCarter, L. L. 1998. OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **180**: 3166-3173.
 31. Mclean, R. J. C., M. Whiteley, D. J. Stickler, and W. C. Fuqua. 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 259-263.
 32. Nyvad, B., and M. Kilian. 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* **24**: 267-272.
 33. Olvera, C., J. B. Goldberg, R. Sanchez, and G. Soberon-Chavez. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 85-90.
 34. O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
 35. O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
 36. O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **30**: 449-461.
 37. Otto, K., and T. J. Silhavy. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 2287-2292.
 38. Park, H. M., M. Wolfgang, J. P. M. van Putten, D. Dorward, S. F. Hayes, and M. Koomey. 2001. Structural alterations in a type IV pilus subunit protein result in concurrent defects in multicellular behavior and adherence to host tissue. *Mol. Microbiol.* **42**: 293-307.
 39. Parsek, M. R., and P. K. Singh. 2003. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 677-701.
 40. Pellock, B. J., M. Teplitski, R. P. Boinay, W. D. Bauer, and G. C. Walker. 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 5067-5076.
 41. Pratt, L. A., and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-294.
 42. Pratt, L. A. and R. Kolter. 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 598-603.
 43. Rashid, M. H., C. Rajanna, D. Zhang, V. Pasquale, L. S. Magder, A. Ali, S. Dumontet, and D. K. R. Karaolis. 2004. Role of exopolysaccharide, the rugose phenotype and VpsR in the pathogenesis of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 105-113.
 44. Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, and D. G. Davies. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154.
 45. Schembri, M. A., G. Christiansen, and P. Klemm. 2001. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 1419-1430.
 46. Silva A. J. and J. A. Benitez. 2004. Transcriptional regulation of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease by the cyclic AMP receptor protein and RpoS. *J. Bacteriol.* **186**: 6374-6382.
 47. Singh, R., O. C. Stine, D. L. Smith, J. K. Jr. Spitznagel, M. E. Labib., and H. N. Williams. 2003. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3412-3420.
 48. Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187-209.
 49. Thelin, K. H., and R. K. Taylor. 1996. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect. Immun.* **64**: 2853-2856.
 50. Vance, R. E., J. Zhu, and J. J. Mekalanos. 2003. A constitutively active variant of the quorum-sensing regulator LuxO affects protease production and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **71**: 2571-2576.
 51. Watnick, P. I., K. J. Fullner, and R. Kolter. 1999. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**: 3606-3609.
 52. Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **39**: 223-235.
 53. Wilson, M. 2001. Bacterial biofilms and human disease. *Sci. Progress* **84**: 235-254.
 54. Yildiz, F. H., N. A. Dolganov, and G. K. Schoolnik. 2001. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS^{ET}-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **183**: 1716-1726.
 55. Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik. 1999. *Vibrio cholerae* O1

- El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 4028-4033.
56. Zhu, J., and J. J Mekalanos. 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev. Cell* **5**: 647-656.
57. Zobell, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**: 39-56.

(Received Sep. 21, 2004/Accepted Feb. 14, 2005)