

## 형광 미세입자를 이용한 박테리아 군집의 3차원 형상 분석 및 유동성 생물막의 가시화

김경훈\* · 박은정\* · 김중경\*\*,\*\*†

\* 국민대학교 대학원 기계공학과, \*\* 국민대학교 기계시스템공학부, \*\*\* 국민대학교 대학원 의생명융합학과

### Analysis of Three-Dimensional Profile of Bacterial Colony and Visualization of Fluidic Biofilm Using Fluorescent Microbeads

Kyunghoon Kim\*, Eun-Jung Park\* and Jung Kyung Kim\*\*,\*\*†

\* Dept. of Mechanical Engineering, Graduate School, Kookmin Univ.,

\*\* School of Mechanical Systems Engineering, Kookmin Univ.,

\*\*\* Dept. of Integrative Biomedical Science and Engineering, Graduate School, Kookmin Univ.

(Received May 18, 2012 ; Revised August 22, 2012 ; Accepted August 24, 2012)

**Key Words:** Bacterial Colony Growth(박테리아 군집 성장), Bacterial Swarming(박테리아 군집이동), Biofilm(생물막), Fluorescent Particles(형광입자), Diffusion(확산)

**초록:** 세균의 집단 행동은 생물막의 형성에 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 대장균(*E. coli*) 및 고초균(*B. subtilis*) 군집에서 형성된 유동성 생물막의 유체역학적 특성을 비교하고자 초기에 아가 플레이트 내에서 층을 이루다가 성장하는 군집 표면 위로 자발적으로 분포되는 200 nm의 형광입자를 가시화하였다. 대장균 군집에서는 유동하지 않는 200 nm 크기의 형광입자를 이용하여 성장하는 세균 군집의 3차원 형상 프로파일을 측정하였다. 고초균 군집의 경계에서 나타나는 와류 패턴은 고초균이 분비하는 계면활성제 내에서 유동하는 형광입자를 추적하여 가시화하였다. 본 연구는 세균의 생리 기능을 조절하는 새로운 물리적인 요소를 밝혀내고 세균의 증식 및 군집 이동에 영향을 미치는 유동성 생물막의 효과를 파악하는 첫걸음이 될 것이다.

**Abstract:** The collective behavior of bacteria plays an important role in biofilm development. In this study, the fluidic properties of biofilms formed in *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) colonies were compared by visualizing 200-nm fluorescent beads that were initially embedded in an agar plate and distributed spontaneously on the upper surface of the growing colonies. We conducted experiments to measure the three-dimensional profile of the *E. coli* colony using fluorescent microbeads that did not flow in the colony. Vortical flow patterns near the edge of the *B. subtilis* colony were observed clearly by tracking the movement of the beads in the biofilm of the colony. The present study should be the first step toward determining the effect of fluidic biofilms on the growth and swarming dynamics of bacteria.

### 1. 서론

표면 주위의 물리화학적 환경에 따라 박테리아 군집은 특이적인 반응을 보인다. 이는 박테리아의 군집 성장을 표면성질의 변화를 통해 제어할 수 있다는 가능성을 의미한다.<sup>(1,2)</sup> 박테리아 군집 성장에서 중요한 역할을 하는 것은 박테리아의 군집 이동과 정족수 인식 등의 집단적 거동이라

고 보고된 바 있다.<sup>(3)</sup> 정족수 인식에 의해 분비되어 형성된 생물막은 계면활성제의 특성을 가지며 영양분 흡수를 돕고 외부로부터 내부 개체를 보호할 뿐만 아니라 박테리아 증식을 촉진시킨다. 따라서 최근들어 생물막 연구의 중요성이 대두되고 있다.

최근에는 *B. subtilis*가 계면활성제를 생물막으로 분비하는 것과는 달리 *E. coli*는 습윤체를 분비한다고 보고되었다.<sup>(3)</sup> 이것을 뒷받침하는 것이 Be'er 등<sup>(4)</sup>과 Zhang 등<sup>(5)</sup>의 연구에서 *B. subtilis* 생물막 위에서 산화마그네슘 입자가 확산되는 것과

† Corresponding author, jkkim@kookmin.ac.kr

는 달리 *E. coli* 생물막 위에서는 산화마그네슘 입자가 계면에 고정되어 있다는 관찰 결과이다. 이러한 연구에 활용된 광학영상기법은 생물막의 특성 차이를 관찰하는 데는 유용하지만 유동성 생물막의 유체역학적 특성을 상세하게 밝혀주지는 못한다는 제약이 있다.

본 논문에서는 표준 배양조건에서 성장하는 *E. coli*의 군집 표면에 분포한 형광입자를 가시화하여 군집의 3차원 형상 프로파일을 획득하였다. 이러한 측정기법을 통해 표면의 특성 및 배양 시간에 따라 변하는 군집의 형상과 군집 내 개체수 사이의 상관관계를 정량적으로 파악하고자 하였다. 또한 동일한 기법을 적용하여 *B. subtilis* 생물막 특성을 가시화하여 비교하고 생물막에서 형성되는 유동장 분석 결과를 제시하고자 한다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1 아가젤 플레이트 제작

아가젤은 농도가 0.5, 1.5, 2.5%인 세 종류를 사용하였다. LB(Luria-Bertani) broth를 100 ml 기준으로 2.5 g을 증류수와 실험용 유리병에 넣은 후에 마이크로 아가를 0.5%의 아가젤은 0.5 g, 1.5%의 아가젤은 1.5 g, 2.5%의 아가젤은 2.5 g을 각각 첨가해주었다. 아가젤 용액은 멸균기를 사용하여 120°C, 15분간 멸균하였다. 멸균 후 용액을 35 × 35 패트리 접시에 4 ml 정도 넣고 20분 정도 냉각시켰다. 외부에 노출된 고체 배지의 오염을 피하기 위해서 깨끗한 후드 안에서 제작하였다.

### 2.2 아가젤의 형광입자 코팅

형광입자는 각 아가젤의 농도에 맞추어 사용하였다. 지름이 200 nm인 미세형광입자(FluoSpheres, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였고 체적 기준으로 아가젤 용액 99%와 형광입자 1%의 비율로 혼합하였다. 아가 배지 용액은 60°C 이하에서 고형화되므로 증탕하여 온도를 75°C 이상으로 유지하였다. 아가 플레이트를 스핀코터를 이용하여 회전시키고 완성된 형광과 아가 혼합 배지용액은 파이펫을 이용하여 200  $\mu$ l 아가 플레이트 표면에 분사하여 코팅하였다. 0.5% 아가젤은 1500 rpm, 1.5%는 4000 rpm로 2초 동안 코팅하고 스핀코터의 회전에 의해 확산되는 시간은 10초로 설정하였다.

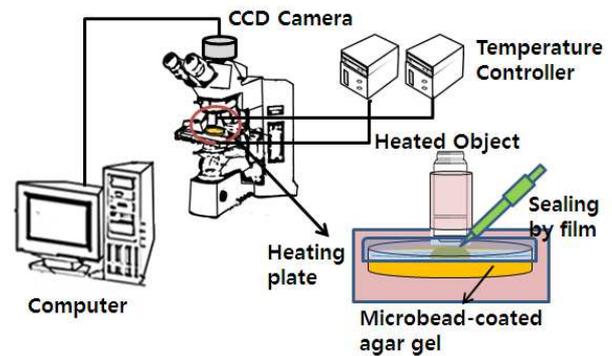


Fig. 1 Schematic of live cell imaging setup

### 2.3 박테리아 관찰

*E. coli*와 *B. subtilis*는 36°C, 180 rpm, 12시간 배양한다. 배양한 균은 광학밀도(Optical density)가 0.01이 되도록 희석시켰다. 마이크로 파이펫을 사용하여 균 용액 1  $\mu$ l를 형광입자가 코팅된 아가 플레이트 표면 중앙부에 접종하였다. 접종 후 아가 플레이트는 파라핀 필름으로 밀봉하여 36°C에서 배양하였다. 아가 플레이트의 중앙부 파라핀 필름에는 현미경의 대물렌즈가 겨우 들어갈만한 직경 1 cm 정도의 구멍을 내서 렌즈와 밀착시켜 수분의 증발을 방지하였다. 관찰하는 동안 아가 배지의 Z축 위상은 일정하였다.

사용한 형광입자는 540 nm 파장에서 여기되어 560 nm 파장의 빛을 방출하는 특성을 지녔으므로, 수은램프에서 나온 빛을 적절하게 조합된 필터를 통과시켜 형광입자를 관찰하였다. 위상차 현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)에서 20배의 대물렌즈를 통과한 영상을 CCD 카메라(IMB-20FT, imi Technology, Anyang-si, Korea)로 획득하였다. 본 연구에 사용한 실험 장치의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다.

*E. coli*의 경우 4시간 경과 후 각 1시간 간격으로 7시간까지 관찰하였다. 박테리아 군집의 중심이 통과 가능한 Y축을 고정시킨 후 군집의 경계로부터 X축을 옮겨가면서 형광입자가 관찰되는 Z축 위치를 확인하였다. Y축을 고정시킬 때 X축 위치의 최소단위는 1 mm, Z축 위치의 최소단위는 1  $\mu$ m이다. 관찰된 박테리아 군집이 Z축을 중심으로 대칭을 이룬다고 가정하여, 군집의 경계를 따라 분포하는 형광입자의 위치로부터 박테리아 군집의 3차원 형상 프로파일을 측정하였다.

*B. subtilis*의 경우는 접종 후 11시간 이후 1시간 간격으로 13시간 이후까지의 거동을 관찰하였다. 현미경을 이용한 관찰 측정의 기준은 *E. coli*의 경우 Y축을 기준으로 0.5 mm 간격으로 현미경 재물대의 Z축을 따라 계측하였으며, 계측 기준은 군집 성장한 샘플이 선명하게 관찰되는 시점을 기준으로 하여 형광입자의 위치를 측정하였다.

#### 2.4 입자추적기법 및 속도장 측정

형광입자를 찍은 동영상을 프레임 간격에 따라 0.125초 간격으로 연속 획득하여 영상을 추출하였다. 추출된 영상은 ImageJ 프로그램을 통하여 Smooth와 Make binary로 영상을 전처리하였다. ImageJ의 입자추적 기능과 상호상관법을 적용하여 입자의 궤적과 속도장을 획득하였다. 입자추적을 통해 얻은 입자 궤적을 이용하여 계산한 MSD(Mean Square Displacement)에 기반하여 형광입자들의 거동을 분석하였다. MSD는 다음과 같은 식 (1)로 계산된다.

$$MSD = \frac{1}{N-n} \sum_{j=0}^{N-n-1} [x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t)]^2 \quad (1)$$

각 입자 궤적에 대한 MSD-time 그래프를 획득한 후 그래프가 지수함수 형태이면 대류 거동, 선형함수이면 일반적인 확산 거동으로 해석한다.

#### 2.5 형광미세입자 확산 실험

아가 플레이트 코팅에 사용한 형광 미세입자와 0.5% 아가 용액 혼합물을 직경 11.7 mm의 원형 배양접시 절반 영역에 20 μl 응고시킨 후 나머지 부분에 4 종류의 용액을 20 μl 주입한 후 형광입자의 확산 현상을 관찰하였다. 주입한 용액은 증류수(DW), LB broth, *E. coli*의 분비물, *B. subtilis*의 분비물이다. *E. coli*와 *B. subtilis*의 분비물은 12시간 정도 액체 배양을 한 후 배양액을 박테리아가 없는 순수 분비물에 가깝게 하고자 0.2 μm 멸균실린지필터(NY14831, Corning, Germany)에 여과시켜 제조하였다.

도립형 현미경(IX71, Olympus, Tokyo, Japan)에서 20배의 대물렌즈를 통과한 형광입자 영상을 용액을 주입한 다음 10초 후부터 CCD 카메라

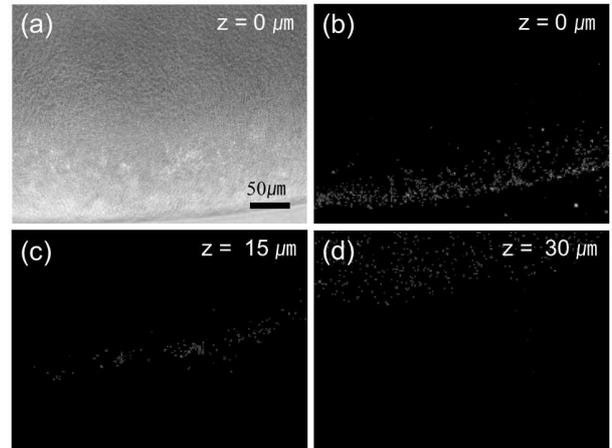


Fig. 2 (a) Bright-field image of *E. coli* colony. Fluorescence images of 200-nm fluorescent beads initially embedded in the agar plate and moved to the upper surface of the growing colony. (b)  $z = 0$ , (c)  $z = 15$ , (d)  $z = 30 \mu\text{m}$

(Sensicam, Cooke, Romulus, MI, USA)를 이용해 초당 1장씩 총 79장을 획득하였다. ImageJ의 광도측정 기능을 통하여 형광-아가젤 혼합물의 확산거동 영상을 분석하였다. 확산거동을 정량적으로 분석하고자 적절한 회귀분석 모델을 선정하였다. 형광입자의 밝기를 나타내는 계조치가 형광입자의 농도에 비례한다고 가정하였다. 본 실험 조건에서는 초기에 아가젤에 포함된 일정량의 미세입자가 한쪽 방향으로 확산하게 되므로 Crank<sup>(6)</sup>가 제시한 다음 식 (2)로 형광입자의 강도 분포를 모델링할 수 있다.

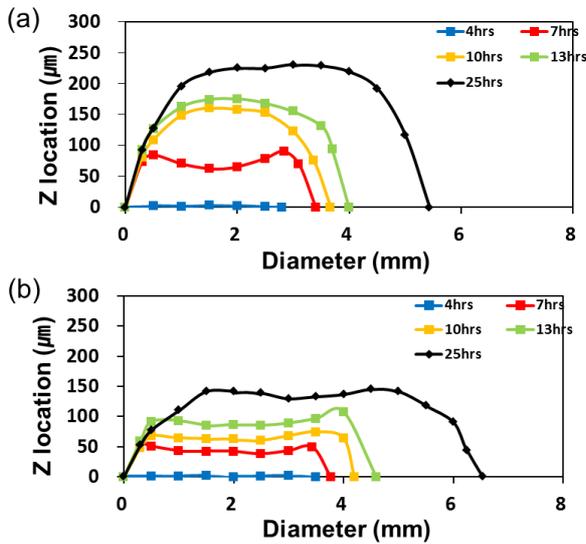
$$C(x,t)/C_0 = \frac{1}{2} \left\{ \text{erf} \frac{h-x}{2\sqrt{Dt}} + \text{erf} \frac{h+x}{2\sqrt{Dt}} \right\} \quad (2)$$

여기서  $x(\mu\text{m})$ 는 소스로부터의 거리,  $t$ 는 경과 시간(sec),  $D(\mu\text{m}^2/\text{s})$ 는 용질의 확산계수이고 초기에 용질은  $-h < x < h$  영역에  $C_0$ 의 농도로 밀집 분포되어있다고 가정한다.

### 3. 결과 및 토의

#### 3.1 *E. coli*의 생물막 가시화

형광입자를 이용하여 *E. coli*의 생물막 계면을 가시화하였다. 접종 4시간 후에서 7시간까지 *E. coli*가 군집을 형성한 이후 대부분의 형광입자가 아가 배지 밖으로 빠져나와 박테리아 군집의 경

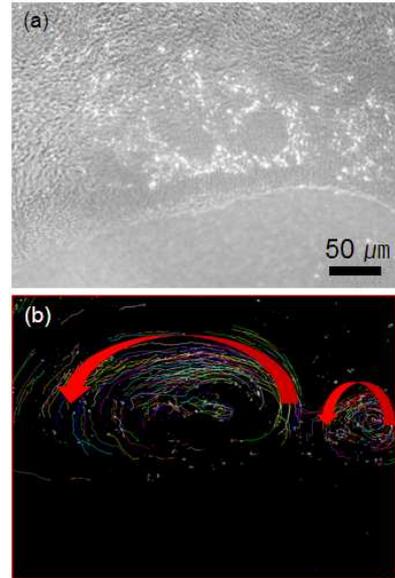


**Fig. 3** Locations of fluorescent microbeads on the substrates of (a) 0.5% and (b) 1.5% agar concentration. (blue diamond: 4 hrs, red circle: 7 hrs, yellow triangle : 10 hrs, green triangle: 13 hrs, black square: 25 hrs)

계면을 따라 분포하는 것을 확인하였다. Fig. 2는 현미경 초점을 변화시키면서 동일한 영역을 촬영한 영상이다. 초점 변화에 따라서 상단, 중단, 하단 부분으로 형광입자의 분포가 명확하게 구별되는 것을 볼 수 있다.

아가 배지 상부에 코팅된 형광입자가 배지 표면으로부터 이탈하는 현상은 생물막 내의 용질 농도 차에 의한 확산 현상에 기인한다. 이에 관한 자세한 분석 결과는 3.5절에 기술하였다. 그러므로 Z축 방향으로 존재하는 형광입자들은 *E. coli* 생물막 내에 균일하게 퍼져있는데, 그 중에서 가장 바깥쪽에 존재하는 형광입자들의 3차원 위치 측정을 통해 박테리아 군집의 단면 프로파일을 획득하였다.

만약 형광입자들이 박테리아 군집이 성장하는 동안 3차원적으로 생물막 상에 위치하지 않게 된다면 이 형광입자들은 군집을 형성하고 있는 박테리아의 직접적인 영향을 받아서 급진적이고 불규칙하게 거동하게 될 것이다. 그러나 *E. coli* 군집 성장을 관찰하는 동안 형광입자들은 이러한 움직임을 보이지 않았고 군집의 지속적인 성장을 반영하였다. 이는 Zhang 등<sup>(5)</sup>의 연구에서 산화마그네슘 입자를 사용하여 생물막의 존재를 확인한 것과 마찬가지로 형광입자들이 군집 위에 분포한다고 볼 수 있다.

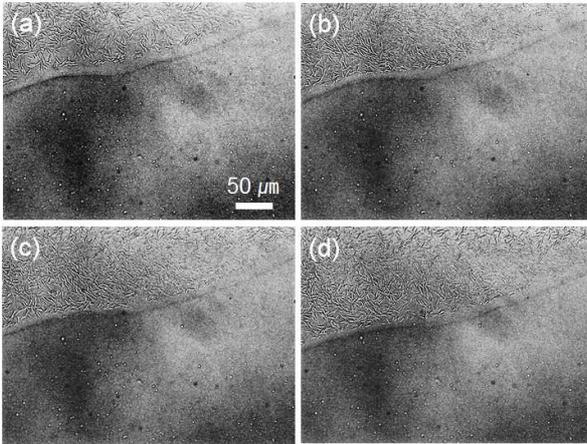


**Fig. 4** Fluorescent beads moving on the upper surface of the *B. subtilis* colony. (a) Overlapped bright-field and fluorescence images. (b) Trajectories of the beads

### 3.2 *E. coli* 군집의 단면 프로파일

0.5%와 2.5%의 아가 배지 위에 균 접종 후 4, 7, 10, 13, 25시간이 지났을 때 측정된 형광입자의 위치를 Fig. 3에 나타내었다. 상대적으로 공극의 크기가 큰 0.5% 아가 배지에서는<sup>(7)</sup> 대부분의 형광입자가 배지 밖으로 빠져나와 군집 경계를 따라 분포하였다. 반면 2.5% 아가 배지에서는 많은 형광입자들이 배지 표면에 층을 이루었고 박테리아 군집 내부에 분포하는 입자 밀도가 상대적으로 훨씬 낮게 관찰되었다. 0.5% 아가 배지에서 자란 박테리아 군집은 같은 시간동안 다른 표면에서 성장한 군집에 비해 지름은 작은 반면 높이는 보다 높은 것을 확인할 수 있다. 시간에 따라 점진적으로 상승하는 형광입자들을 통해 측정된 *E. coli* 군집의 단면 프로파일은 Shapiro<sup>(8)</sup>가 전자현미경을 통해 관찰한 것과 유사한 형상을 나타내었다.

군집 경계를 따라 분포하는 200 nm 크기의 형광입자 위치를 측정하여 성장하는 박테리아 군집의 단면 형상 프로파일을 얻을 수 있었다. 매질의 공극 크기보다 작은 입자를 저밀도로 사용하는 경우에 공간해상도가 높아지기 때문에 박테리아 군집의 형상을 파악하기 쉽다는 것이 본 기법의 장점이다. 또한 형광입자의 크기가 다공성 매



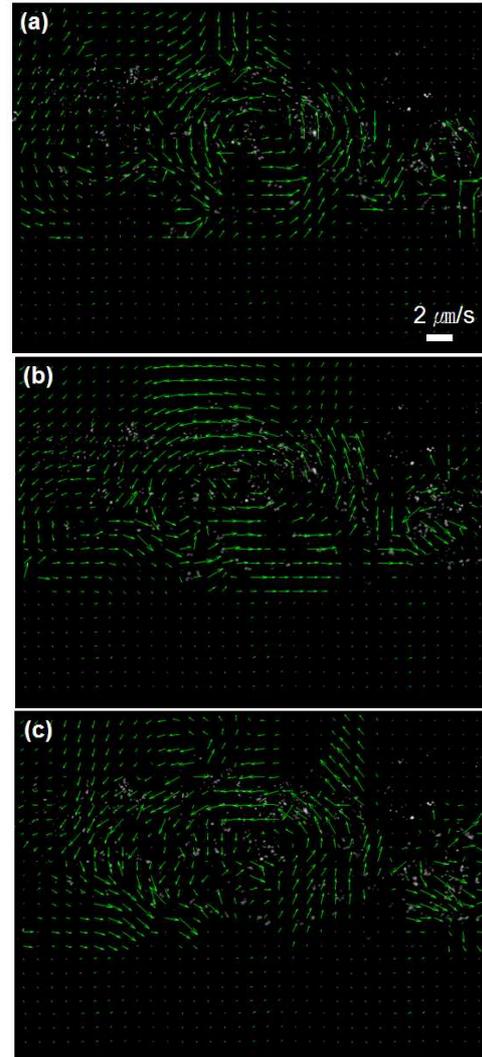
**Fig. 5** Moving edge of the fluidic biofilm formed in the *B. subtilis* colony. (a)  $t = 0$ , (b)  $t = 1$ , (c)  $t = 2$ , and (d)  $t = 3$  s.

질의 공극보다 상대적으로 작을수록, 매질 속에서 이탈하여 박테리아 군집 안으로 들어가는 형광입자의 수가 많았다. 예를 들어, 상대적으로 공극의 크기가 큰 0.5% 아가 배지의 경우에는 대부분의 입자들이 박테리아 군집 안으로 들어온 반면 2.5% 아가 배지의 경우에는 일부 입자들만 매질을 빠져나와 군집 내부에서 층을 이루었다. 아가 배지 표면 아래에서 얇은 층으로 분포하던 형광입자들이 박테리아가 표면에서 생물막을 형성하고 군집을 형성함에 따라 매질에서 박테리아 군집 내부로 이동하여 군집의 경계 부근에서 층을 이루는 것을 확인하였다.

박테리아가 생물막을 형성하게 되면 막의 내부와 외부 사이에 삼투압이 발생되어 다공성 매질로부터 물이 이동하고 그와 동시에 형광입자들도 이동한 것으로 추정된다. 고체 표면에서 박테리아는 빠른 증식과 함께 스스로 다당류의 물질들을 분비하면서 생물막을 형성한다. 동시에, 박테리아가 분비한 물질들이 생물막의 내부와 외부의 삼투압 차이를 일으켜 외부의 물을 끌어온다는 연구결과가 2002년 Rauprich의 가설이 제안된 뒤로 여러 그룹에서 보고되었다.<sup>(9-11)</sup>

### 3.3 *B. subtilis*의 생물막 가시화

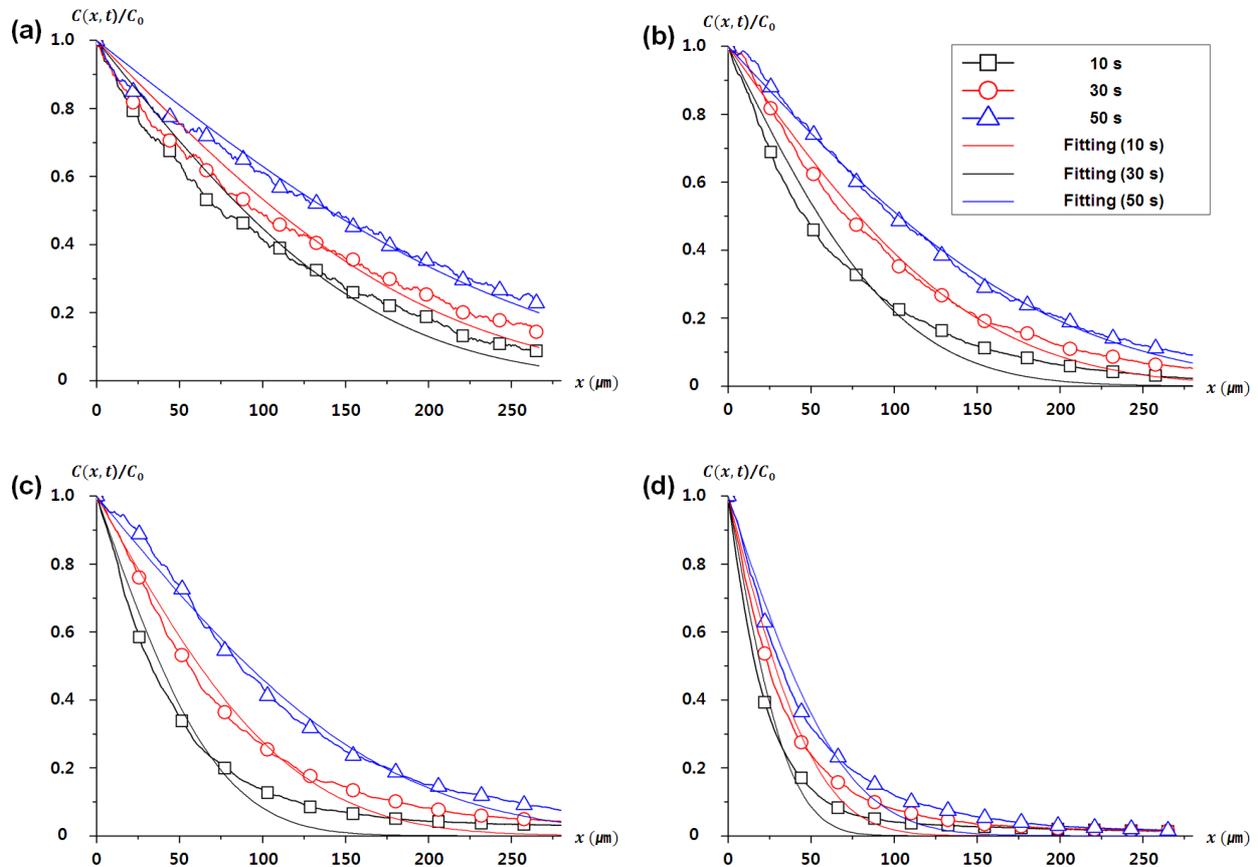
*B. subtilis*는 군집을 형성한 후에 형광입자가 뚜렷하게 군집경계를 따라 존재하지 않았다. 군집 경계 곳곳에 불규칙한 경사면을 가진 부분도 있으나 *E. coli*에서 관찰된 현상에 비하면 미세한 차이였으며 일정한 경향성이 없는 것으로 관찰되



**Fig. 6** Velocity vector field of the beads moving in the fluidic biofilm formed in the *B. subtilis* colony. (a) 0, (b) 2, and (c) 4 s.

었다. 그리고 대부분의 형광입자들은 군집체 형성과 군집이동 이전에 배지 표면에 층을 이루고 있었다. Fig. 4는 *B. subtilis*가 군집이동함에 따라 배지표면으로부터 약 15 μm 위에 존재하는 형광입자들의 거동을 관찰한 영상이다. *B. subtilis*의 경우 형광입자가 분리되어 거동함을 관찰하였다. Fig. 4(a)는 박테리아 군집의 광학영상과 그 표면에 분포하는 형광입자의 영상을 중첩시켜 나타낸 것이다. Fig. 4(b)는 5초 동안 촬영한 영상을 입자추적기법으로 분석하여 입자들의 이동 궤적을 나타낸 것이다. 이 궤적은 생물막 유동이 와류를 형성하고 있음을 명확하게 보여주고 있다.

Fig. 5(a-d)는 1초 간격으로 박테리아 군집의 성



**Fig. 7** Fluorescence intensity profile of the beads diffused out from the 0.5% agar plate to each solution. (a) Distilled water (DW), (b) LB broth, (c) wetting agent secreted from *E. coli* cells and (d) biosurfactant secreted from *B. subtilis* cells cultured in suspension for 24 hrs

장과정을 촬영한 사진이다. 각 사진에서 *B. subtilis* 군집 밖에 형성된 유동경계면의 존재를 통해 생물계면활성제가 분비된다는 것을 확인할 수 있다. Be'er 등<sup>(4)</sup>도 최근 논문에서 생물계면활성제 경계면의 존재를 보고한 바 있다. 입자추적 기법을 통해 얻은 MSD-time 그래프 경향은 지수 함수형태를 가지기 때문에 대류 거동이 있음을 알 수 있다. 형광입자들은 *B. subtilis* 군집이동시 형성되는 생물막의 유동을 따라 움직이는 것을 알 수 있었다. 이러한 관찰 결과는 Be'er 등<sup>(4)</sup>의 연구에서 보고된 *E. coli*와 *B. subtilis*의 생물막이 서로 다른 특징을 보이는 실험결과와 일치하였다. 그 뿐만 아니라 아가의 농도에 따라서 형광입자의 거동에도 차이가 있었다. 0.5%에서 다량의 형광입자가 군집이동에 따라 광범위하고 집단적으로 거동하는 것이 관찰되었던 반면에 1.5%에서는 소량의 형광입자만이 생물막 유동장을 따라 거동하는 것이 관찰되었다.

### 3.4 *B. subtilis*의 생물막 유동 속도장

Wu 등<sup>(12)</sup>의 연구에서는 생물막의 넓은 범위에서 와류 유동을 발견했다는 보고가 있었다. Be'er 등<sup>(4)</sup>은 단일입자를 추적하여 생물막의 거동을 관측하였다. 그러나 이러한 방법은 단일입자이기 때문에 생물막의 유동 패턴을 정확하게 나타낼 수 없다. 이와 달리 본 연구진이 시도한 형광입자를 이용한 가시화 기법은 군집이동에 의한 생물막의 유동 속도분포를 측정할 수 있다. 0.5% 아가젤에서 촬영한 형광입자 영상을 전처리한 후에 상호상관법을 적용하여 Fig. 6(a-c)과 같은 속도장을 획득하였다. 박테리아 군집경계 부근에서 생물막 유동은 와류를 형성하고 있음을 확인할 수 있다.

### 3.5 형광 미세입자의 확산 분석

아가 배지 상부에 코팅된 형광입자가 배지표면

**Table 1** Effective diffusion coefficient of each solution. The relative magnitudes are  $DW > LB > E. coli > B. subtilis$

Type	$D_{eff}$ ( $\mu m^2/s$ )
DW	576.5
LB	264.7
<i>E. coli</i>	163.9
<i>B. subtilis</i>	33.83

으로부터 이탈하는 현상은 생물막 내의 용질 농도 차에 의한 확산 현상에 기인한다. Fig. 7(a-d)의 그래프는 각각 증류수, LB broth, *E. coli*가 분비한 습윤제, *B. subtilis*가 분비한 계면활성제를 주입했을 경우 아가젤에 포함되어있던 형광미세입자의 확산 거동을 수학적 모델링을 통해 분석한 것이다. 용액 주입 후 10, 30, 50초가 지난 후에 형광입자의 계조치 분포와 식 (2)를 이용한 곡선 접합 결과를 중첩하여 나타내었다. 곡선 접합 결과는 각 측정값의 변화 경향을 대체적으로 잘 나타내고 있음을 알 수 있다.

시간에 따른 형광입자의 계조치 분포를 초기 계조치로 정규화하여 식 (2)를 이용한 회귀분석을 수행하면 유효확산계수를 추정할 수 있다. 회귀분석을 통해 얻은 유효확산계수를 Table 1에 나타내었다. 유효확산계수의 크기는 증류수가 제일 크고 LB broth가 *E. coli*가 분비한 습윤제보다 약간 크며 *B. subtilis*가 분비한 계면활성제가 가장 작은 값으로 측정되었다. 유효확산계수가 가장 큰 증류수에서 형광입자가 빠르게 거동하고 확산계수가 가장 작은 *B. subtilis*의 분비물에서 가장 느리게 거동하는 현상을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 형광 미세입자가 아가젤로부터 이탈하는 현상은 농도 차에 의한 확산 거동으로 인한 것임을 알 수 있다. 유효확산계수 추정을 위한 곡선 접합 시 결정계수( $R^2$ )가 0.95 이상으로 적절한 값을 나타내고 있다. 또한 표면이 건조한 경우 더 많은 형광입자가 배지 표면으로부터 이탈하는 현상을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과는 Daniels 등<sup>(13)</sup>의 연구에서 언급된 생물계면활성제의 농도 구배가 marangoni 효과를 야기시킨 결과와 유사성이 있다. 이것은 계면활성제를 분비하는 *B. subtilis* 콜로니에서 형광입자가 배지 표면에서 이탈하는 정확한 기작과 습윤제를 분비하는 *E. coli* 콜로니에서 배지 표면을

이탈 후 군집경계를 따라 분포하는 현상에 대한 이유를 설명해 주는 단초이다. 초기 박테리아 접촉시 배지 표면의 형광입자는 확산 현상에 의하여 이탈하게 된다. 그리고 박테리아들이 증식하게 되면서 형광입자들은 박테리아 위로 쌓이게 된다. 박테리아 군집이 형성되면서 생물막을 분비하게 되면 생물막 특성에 따라 형광입자의 위치가 결정된다고 볼 수 있다.

형광 미세입자를 이용한 분석 방법은 박테리아 군집의 3차원 분석에 용이할 뿐만 아니라 박테리아 군집 내부의 집단거동에 의한 유동현상을 관찰하는데도 도움이 될 것으로 기대된다. 앞으로 유동성 생물막의 점도, 표면장력 등의 물리적인 특성을 직접 측정하는 방법을 추가로 개발할 필요가 있다.

#### 4. 결론

본 논문에서는 형광입자를 이용한 가시화 기법을 사용하여 *E. coli* 콜로니의 시간에 따른 군집 성장을 확인 및 분석하였으며 *B. subtilis* 콜로니에서 형광입자들의 거동을 관찰하였다. *E. coli* 군집 경계에 분포하는 형광입자의 3차원 위치 측정을 통해 성장하는 박테리아 군집의 단면 형상 프로파일을 얻을 수 있었다. *B. subtilis* 군집에서 거동하는 형광입자의 가시화를 통해 생물막 유동의 속도분포를 측정할 수 있었으며 군집 경계에서 형성되는 와류를 명확하게 관찰할 수 있었다. 다른 연구진의 선행 연구에서 산화마그네슘 단일입자를 추적하여 생물막 유동 형태를 분석한 방법에 비해 본 연구에서 사용한 가시화 기법은 아가플레이트 전 영역에 형광입자가 균일하게 분포되므로 박테리아의 성장에 따른 유동성 생물막의 거동을 관측하는데 유리하다. 본 연구는 박테리아 군집에서 분비되는 계면활성제가 포함된 유동성 생물막의 특성을 파악하기 위한 연구수단을 제시하였을 뿐만 아니라, 발전된 영상기법을 통해 박테리아 군집의 3차원 형상과 유동성 생물막의 물리적 특성을 실시간으로 측정하기 위한 후속연구에 활용될 것으로 기대된다.

#### 후 기

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2011-0014868)과 휴

먼인지환경사업본부-신기술융합형 성장동력사업의 지원(2011K000764)을 받아 수행된 연구임.

### 참고문헌

- (1) Copeland, M. F. and Weibel, D. B., 2009, "Bacterial Swarming: a Model System for Studying Dynamic Self-assembly," *Soft Matter*, Vol. 5, No. 6, pp. 1174~1187.
- (2) Harshey, R. M., 2003, "Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal," *Annu. Rev. Microbiol.*, Vol. 57, pp. 249~273.
- (3) Kearns, D. B., 2010, "A Field Guide to Bacterial Swarming Motility," *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 8, No. 9, pp. 634~644.
- (4) Be'er, A. and Harshey, R. M., 2011, "Collective Motion of Surfactant-Producing Bacteria Imparts Superdiffusivity to Their Upper Surface," *Biophys. J.*, Vol. 101, No. 5, pp. 1017~1024.
- (5) Zhang, R., Turner, L. and Berg, H. C., 2004, "The Upper Surface of an Escherichia Coli Swarm is Stationary," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 107, No. 1, pp. 288~290.
- (6) Crank, J., 1975, *The Mathematics of Diffusion*, Oxford Univ. Press, London, pp. 11~18.
- (7) Maaloum, M., Pernodet, N. and Tinland, B., 1998, "Agarose Gel Structure Using Atomic Force Microscopy: Gel Concentration and Ionic Strength Effects," *Electrophoresis*, Vol. 19, No. 10, pp. 1606~1610.
- (8) Shapiro, J. A., 1987, "Organization of Developing Escherichia Coli Colonies Viewed by Scanning Electron Microscopy," *J. Bacteriol.*, Vol. 169, No. 1, pp. 142~156.
- (9) Chen, B. G., Turner, L. and Berg, H. C., 2007, "The Wetting Agent Required for Swarming in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium is not a Surfactant," *J. Bacteriol.*, Vol. 189, No. 23, pp. 8750~8753.
- (10) Schneider, R., Lockatell, C. V., Johnson, D. and Belas, R., 2002, "Detection and Mutation of a LuxS-encoded Autoinducer in Proteus Mirabilis," *Microbiology*, Vol. 148, No. 3, pp. 773~782.
- (11) Frenod, E. and Sire, O., 2009, "An Explanatory Model to Validate the Way Water Activity Rules Periodic Terrace Generation in Proteus Mirabilis Swarm," *J. Math. Biol.*, Vol. 59, No. 4, pp. 439~466.
- (12) Park, E.-J., Cho, M.-O., Lee, D. and Kim, J. K., 2012, "Growth Responses of Escherichia Coli and Myxococcus Xanthus on Agar Gel Substrates with Different Levels of Stiffness," *Afr. J. Biotechnol.*, in press
- (13) Wu, Y., Hosu, B. G. and Berg, H. C., 2011, "Microbubbles Reveal Chiral Fluid Flows in Bacterial Swarms," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 108, No. 10, pp. 4147~4151.
- (14) Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., De Vos, D. E., Vanderleyden, J., Vermant, J. and Michiels, J., 2006, "Quorum Signal Molecules as Biosurfactants Affecting Swarming in Rhizobium Etli," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 103, No. 40, pp. 14965~14970.