

전이금속 갈륨($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$)을 이용한 biofilm을 형성하는 어류질병세균의 억제

김동휘¹, 수브라마니안 다라니드다란¹, 장영환², 허문수^{1*}

¹제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과

²제주도특별자치도 해양수산자원연구소

Received: July 28, 2016 / Revised: September 23, 2016 / Accepted: October 4, 2016

Inhibitory Effect of Transition Metal Gallium [$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$] on Biofilm Formation by Fish Pathogens

Dong-Hwi Kim¹, Subramanian Dharaneedharan¹, Young-Hwan Jang², and Moon-Soo Heo^{1*}

¹Marine Applied Microbes and Aquatic Organism Disease Control Lab, Department of Aquatic Biomedical Sciences, School of Marine Biomedical Sciences & Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Jeju Special Self-Governing Province Ocean and Fisheries Research Institute, Jeju 63629, Republic of Korea

The prevalence of pathogenic bacteria such as *Streptococcus parauberis* (Sp), *Streptococcus iniae* (Si), and *Edwardsiella tarda* (Et) in flounder fish farms in Jeju Island and their management by gallium treatment was studied. Sp, Si, and Et were found to exhibit a low rate of cell growth and high biofilm formation. Hence, in the present study, cell growth and biofilm formation were measured spectrophotometrically 72 h after the addition of different concentrations of gallium (2, 4, or 8 mg/ml). In addition, cell death was measured by resazurin and propidium iodide staining assays. The results showed that bacterial cell death increased and biofilm formation decreased with an increasing concentration of gallium. Hence, the present study signifies that the use of gallium against bacterial pathogens could be useful for disease management in flounder farms.

Keywords: Biofilm, fish pathogen, gallium, olive flounder, propidium iodide, resazurin

서론

우리나라는 1980년대부터 어류양식기술을 도입하여 육성하였다. 그 중 우리나라의 대표적인 해상양식어류인 넙치는 1989년부터 종묘생산기술이 확립되어 경제성 증대를 위한 고밀도 사육방법으로 양식기술이 보급되어 왔다. 양식 넙치의 생산력증대는 다각적인 연구 노력으로 2004년 32,141톤, 2009년 56,674톤, 2011년 40,805톤, 2013년 36,944톤, 2014년 42,137톤으로 꾸준히 성장해왔다[14].

국내의 어류 양식 산업은 크게 성장하고 있지만, 양식 도중 발생하는 어류질병이 양식 산업 발전에 심각한 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 육상수조 양식의

경우 단위 면적당 생산량을 극대화시키기 위해 고밀도 사육을 하고 있는데, 이러한 고밀도 사육은 증체율 저하 및 각종 질병 발생의 직접적인 원인을 제공하여 폐사에 따른 경제적 손실을 일으킨다[13].

제주 양식넙치의 경우 폐사현황을 보면 2010년 4,519톤(생산량 21,370톤), 2011년 4,427톤(생산량 22,823톤), 2012년 5,601톤(생산량 24,575톤), 2013년 5,760톤(생산량 23,002톤), 2014년 6,710톤(생산량 26,283톤), 2015년 6,928톤(생산량 27,142톤)으로 해마다 증가하고 있다. 또한 폐사로 인한 피해액은 2010년 294억원, 2011년 376억원, 2012년 513억원, 2013년 403억원, 2014년 485억원, 2015년 529억원으로 조사되었다[18].

넙치의 양식과정에서 발생하는 주요 세균성 질병의 원인균으로 에드워드스증(*Edwardsiella* sp.), 연쇄구균증(*Streptococcus* sp.), 비브리오증(*Vibrio* sp.), 활주세균증(*Flexibacter maritimus*) 등이 보고되고 있다[10, 15]. 하지만 우리나라의 어류 양식

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3473, Fax: +82-64-756-3493

E-mail: msheo@jejunu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

산업은 어류질병의 예방보다는 치료위주의 대책으로, 항생제 및 극약으로 지정된 화학약품 사용으로 인해 항생제 잔류 독성과 항생제에 대한 저항성 세균 출현과 같은 문제로 소비자들의 불신이 사회적으로 팽배해 있다.

Biofilm은 세균이 스스로 분비한 다량체 기질(Polymeric matrix)을 이용하여 다당류 중합체인 EPS (Extracellular Polymeric Substances)로 둘러 쌓여있다[6, 11]. Biofilm은 주로 단일 세균으로 이루어지나, 다양한 종이 모여 형성하고 그 안에 존재하기도 하며, 그들이 생존하기 위한 이온매개체로써 3가 이온인 철 이온이 필수적이다[5, 11]. 특히 병원균에 있어 생체 내에 부착하고 biofilm과 같이 병원성에 관련되는 작용을 할 때 다량의 철 이온이 필요하게 된다[17, 19]. 이러한 미생물의 biofilm은 항생제와 숙주방어에 대한 저항성이 높기 때문에 억제하는데 어려움이 있다.

전이금속 갈륨($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$)은 3가 이온 형태로 수용액상에 존재하며, 고 칼슘 혈증을 치료하는 용도로 사용되고 있으며 생체 내에 안전성을 가지고 있다고 알려져 있다[8]. 이러한 3가 이온 형태의 갈륨이 세균의 철 흡수 기작을 교란하여 biofilm 형성을 억제하는 것으로 사료된다[3, 7].

따라서 본 연구에서는 전이금속 갈륨을 이용하여 어류질병 세균이 생성하는 biofilm을 억제하여 세균을 사멸시키고자 한다.

재료 및 방법

어류질병세균 확보

제주도 내 넙치 양식장에서 주로 발생하는 *Streptococcus parauberis* KCTC 3651 (Sp), *Streptococcus iniae* KCTC 3657 (Si), *Edwardsiella tarda* KCTC 12267 (Et)을 생물자원센터(Korea Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양받았다. 분양받은 균주를 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco., USA)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양하였다[3, 9]. 배양된 균주를 NaCl이 1.5% 첨가된 Brain Herat Infusion Broth (BHIB, Difco., USA)에 접종하여 25°C에서 48시간 배양시킨 후, -80°C에 20% (v/v) glycerol에 보관하였다[7, 19].

어류질병세균의 성장능 및 biofilm 형성능 확인

어류질병세균의 성장능을 측정하기 위해 전 배양한 균주를 멸균 Phosphate Buffered Saline (PBS)에 10^5 CFU/ml로 희석하여 96 well plate (Thermo Scientific Nunc., USA)에 200 μ l씩 접종하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 어류질병세균의 biofilm 형성능을 알아보기 위해 96 well plate에 BHIB 배지 100 μ l를 분주한 뒤, 10^5 CFU/ml로 희석

된 균주를 분주한 배지에 100 μ l씩 접종하여 25°C에서 48시간 동안 정지 배양시켰다. 부유세균이 포함된 배양액을 제거하고 수세 후 0.1% w/v crystal violet (CV)를 부착세균에 30분간 염색하였다. 이 후 염색된 CV를 3회 수세 후, 95% ethanol에 다시 용해시켜 595 nm에서 흡광도를 측정하였다[2].

Biofilm 저해능

갈륨(Gallium nitrate, Sigma., USA)을 이용하여 어류질병세균의 biofilm 저해능을 확인하기 위해 96 well plate에 Muller Hinton Broth (MHB, Difco., USA)를 100 μ l를 분주한 뒤, 어류질병세균을 PBS에 10^5 CFU/ml의 농도로 희석하여 에 접종하여 100 μ l 접종하였다. 갈륨을 농도별(2.0, 4.0, 8.0 mg/ml)로 처리하여 각각 25°C에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하여 biofilm의 저해능을 측정하였다[2, 16].

Resazurin Reduction Test

Resazurin reduction test (RRT)는 지시약인 resazurin이 세포에 의해 resorufin으로 환원되는 양을 측정하는 것이다[1, 6]. 증식중인 세포는 청색의 산화형 resazurin을 적색의 환원형 resorufin으로 환원하며, 이 양은 세포의 증식도를 반영한다[1, 4, 6]. RRT의 실험법은 96 well plate에 MHB를 100 μ l씩 분주를 한 후, 전 배양한 균주를 멸균 PBS에 10^5 CFU/ml로 희석하여 MHB에 50 μ l씩 접종한다. 접종한 후 갈륨을 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml의 농도로 처리하여 25°C에서 48시간 정지배양 한다. 차광된 플라스크에 멸균 증류수 1 L와 Resazurin sodium salt (Resazurin, Sigma Aldrich., USA) 11 mg을 섞어 용해시킨 후, pH 7.0으로 보정하여 최종농도 0.11%의 농도로 사용하였다. 48시간 배양된 균주에 따라 각각 resazurin을 20 μ l씩 접종하여 6시간동안 반응대기 후 색의 변화를 관찰하였다[12].

Vitality staining

갈륨을 이용하여 어류질병세균에 대한 저해능을 확인하기 위해 Chamber slide (NUNK, USA)에 MHB를 150 μ l씩 분주를 한 후, 10^5 CFU로 희석한 어류질병균주를 100 μ l씩 접종하였다. 접종 후 갈륨을 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml의 농도로 처리하여 25°C에서 48시간동안 배양하였다. Propidium Iodide (PI, Sigma., USA)는 세포가 사멸할 시 세포의 DNA와 결합하여 빨간색으로 염색이 되는 시약이다. PI를 2 mg/ml의 농도로 chamber slide에 10 μ l씩 분주하여 25°C에서 30분 반응시켰다[3]. 반응 후 공초점현미경(Confocal Laser Scanning Microscope, Olympus Optical Co., Japan)을 이용하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

Biofilm 형성능 확인

어류질병균주를 이용하여 biofilm 형성능과 생육도를 측정하였다(Fig. 1). 어류질병세균의 생육도의 경우 *Et*가 *Sp*, *Si*에 비해 높게 나타났지만, biofilm 형성능의 경우 *Sp*가 *Si*, *Et*에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 균주 별 성장도와 biofilm 형성능간의 특정한 패턴이 없이 나타났으며, 세균의 성장도가 높다 하더라도 꼭 biofilm을 활발히

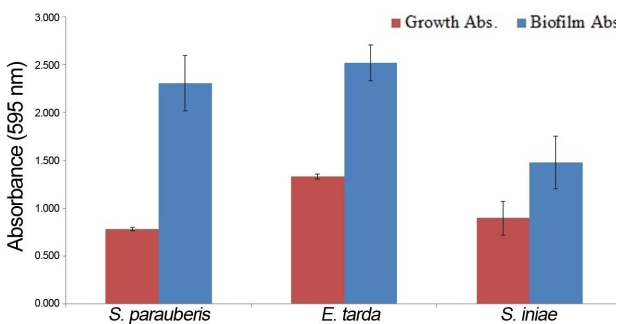


Fig. 1. Biofilm formation activity and growth of fish pathogen.

형성하지 않음을 알 수 있었다.

Biofilm 저해능 확인

어류질병세균에 대해 갈륨이 biofilm을 저해하는지 알아보기 위해 각각의 균주를 배양한 후 갈륨을 농도별(2.0, 4.0, 8.0 mg/ml)로 첨가하여 biofilm을 측정하였다(Fig. 2). 3균주 모두 48시간째부터 biofilm 형성이 저해되기 시작하여, 72시간째 갈륨을 처리하지 않은 컨트롤에 비해 biofilm이 크게 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

*Sp*는 72시간 째 갈륨의 모든 농도에서 컨트롤에 비해 biofilm 형성능이 저해되는 것을 확인하였으며, 이중 갈륨 농도 8.0 mg/ml에서 가장 큰 biofilm 저해능을 보였다(Fig. 2A). *Si*, *Et*는 72시간 째 갈륨의 모든 농도에서 컨트롤에 비해 biofilm 형성능이 저해되는 것을 확인하였으며, 이중 갈륨 농도 4.0 mg/ml에서 가장 큰 biofilm 저해능을 보였다(Fig. 2B, 2C).

어류질병 3균주 중 *Et*에서 가장 큰 biofilm 저해능을 나타냈다. 이는 갈륨이 이미 형성된 biofilm 자체를 파괴하는 효과가 있으며, biofilm의 형성능이 높고 낮음에 상관없이 biofilm을 억제하기 때문에 매우 긍정적인 결과가 할 수 있다[2, 9].

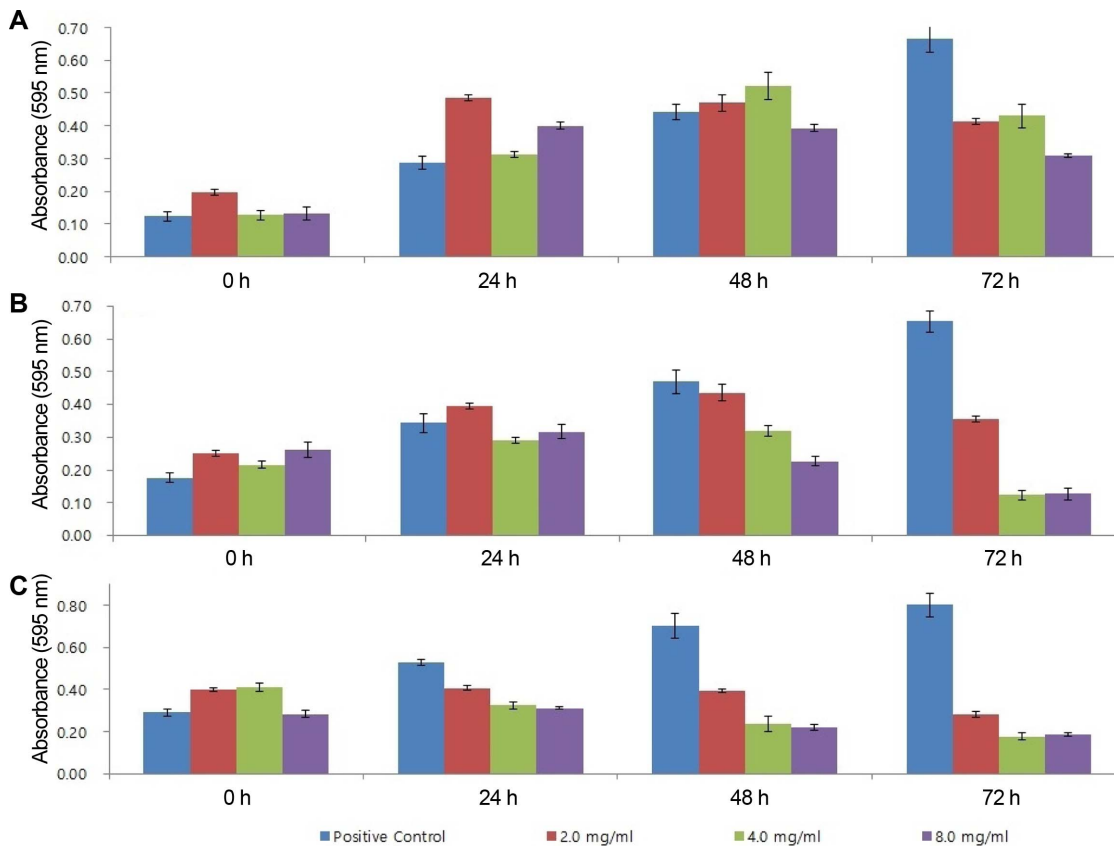


Fig. 2. Biofilm inhibition activity of gallium for fish pathogen. (A) *S. parauberis*, (B) *S. iniae*, (C) *E. tarda*.

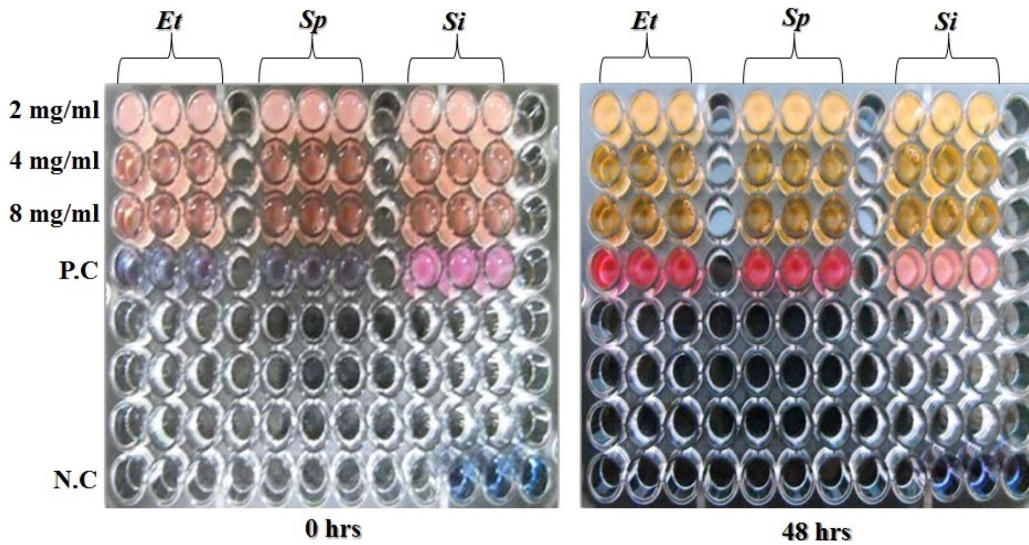


Fig. 3. Effect of gallium on viable cell count of bacterial fish pathogen. (P.C) Positive Control (well contain untreated bacterial cells), (N.C) Negative Control (well contain only culture medium), (Et) *E. tarda*, (Sp) *S. parauberis*, (Si) *S. iniae*.

Resazurin reduction test

갈륨이 biofilm을 억제하는 동시에 균주를 직접적으로 사멸시키는지 알아보기 위해, RRT를 이용하여 어류질병세균의 사멸을 확인하였다. 갈륨을 처리하지 않은 어류질병세균에 resazurin을 각각 처리하였을 시, 청색에서 진한 분홍색으로 색이 변하였다(Fig. 3).

균주를 10⁵ CFU/ml로 접종하여 갈륨을 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml의 농도로 처리한 그룹에서는 연한분홍색에서 진한 노란색으로 색이 변한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 레사주린을 첨가한 직후의 pH가 7.0이었고, 색의 변화가 노란색으로 변하였을 때 pH는 4.8로 나왔다.

이는 갈륨을 처리하지 않은 컨트롤 그룹에서 세균의 증식에 따라 청색에서 진한 분홍색으로의 색의 변화가 일어난 반면, 갈륨을 처리한 그룹에선 세포의 사멸로 인한 세포호흡의 저해로 인하여 색의 변화가 연분홍에서 노란색으로 변한 것을 확인하였다[12].

Vitality staining 결과

갈륨이 병원균을 직접적으로 사멸시키는지 확인하기 위해 균주를 배양한 후 갈륨을 처리하여 PI로 염색을 하여 병원균의 사멸을 확인하였다. 갈륨을 처리하지 않은 그룹에서 세포의 사멸이 일어나지 않았지만, 갈륨을 처리한 그룹에서 세포의 사멸이 눈에 띄게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 갈륨의 농도가 높아질수록 사멸되는 균주도 같이 증가하는 것을 확인할 수 있었다[19].

이러한 일련의 실험을 통하여 갈륨이 어류질병을 유발시

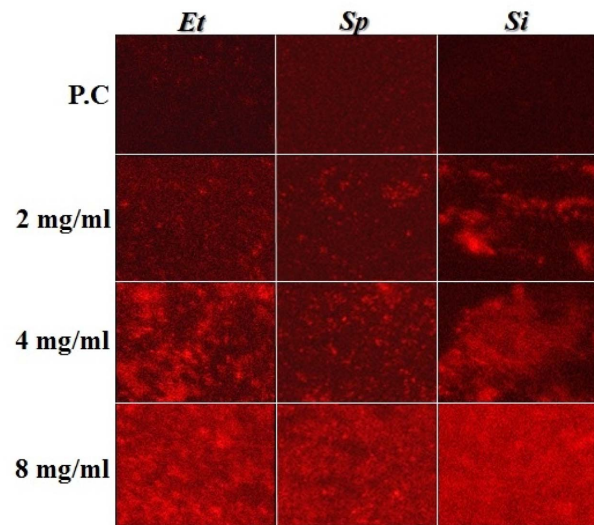


Fig. 4. Confocal microscopic image of gallium treated fish pathogenic bacterial cells after 48 h. (P.C) Positive Control (well contain untreated bacterial cells), (Et) *E. tarda*, (Sp) *S. parauberis*, (Si) *S. iniae*.

키는 3가지 균주에 biofilm을 억제시키는 동시에 사멸까지 일으키는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 수행된 갈륨이 어류질병세균을 억제하고 항생제 내성균의 요인이 되는 biofilm을 억제하는 물질로서 가치가 있다고 사료된다.

추후 이러한 *in vitro* 상에서의 실험결과를 이용하여 양식업계에 적용하여 독성 및 안전성에 대한 실험을 진행하고자 한다.

요약

제주도 넙치 양식장에서 주로 발생하는 어류질병세균인 *S. parauberis*, *S. iniae*, *E. tarda*에 대한 피해를 줄이고자 갈륨을 이용하여 어류질병세균을 억제하고자 한다. 본 연구진은 *Sp*, *Si*, *Et*의 생육도와 biofilm 형성능을 확인하였으며, 세균의 성장도와 biofilm 형성능간의 특정한 패턴은 없었으며 세균의 성장도가 높다 하더라도 biofilm을 활발히 형성하지 않음을 알 수 있었다. 어류질병세균이 형성하는 biofilm을 저해하기 위해 갈륨을 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml로 첨가하여 저해능을 확인한 결과 72시간째 biofilm의 형성이 크게 저해되는 것을 확인하였다. 또한 biofilm을 저해하는 동시에 균주의 사멸능을 확인하기 위해 resazurin assay와 propidium iodide를 이용하여 염색한 결과 갈륨의 농도에 따라 균주의 사멸이 증가하는 것을 확인하였다. 이에 따라 *in vitro* 상에서 갈륨이 어류질병세균의 biofilm을 억제하는 동시에 균주를 사멸시키는 물질로서 가치가 있다고 사료된다.

Acknowledgments

This research was supported by The Leading Human Resource Training Program of Regional Neo industry through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future Planning (2016H1D5A1911152 & 2013H1B8A2032163).

References

1. Ansar AS, Gogal RM, Walsh JE. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Method.* **170**: 211-224.
2. Banin E, Lozinski A, Brady KW, Berenshtein E, Butterfield PW, Moshe M, et al. 2008. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 16761-16766.
3. Chiang WC, Cilsson M, Jensen PØ, Høiby N, Nielsen TE, Givskov M, et al. 2013. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 2352-2361.
4. De Fries R, Mitsuhashi M. 1995. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *J. Clin. Lab. Anal.* **9**: 89-95.
5. Deleon K, Balldin F, Watters C, Hamood A, Griswold J, Sreedharan S, et al. 2009. Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1331-1337.
6. Im JT, Park IK, Koh TS. 2007. Proliferation assay of splenocyte and PBMC by the evaluation of alamar blue dye reduction value in broiler chicks. *J. Anim. Sci. Technol.* **49**: 213-224.
7. Jung SH, Choi DL, Kim JW, Jo MR, Jee BY, Seo JS. 2009. Pharmacokinetics of oxolinic acid in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* by oral administration, injection and dipping. *J. Fish. Pathol.* **22**: 125-135.
8. Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, Britigan BE, Singh PK. 2007. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* **117**: 877-888.
9. Kim JH, Kim CH, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, Cho SH. 2008. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 28-34.
10. Lee CH, Kim PY, Ko CS, Oh DC, Kang BJ. 2007. Biological characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Jeju. *J. Fish. Pathol.* **20**: 33-40.
11. Lee JH. 2015. A review on microbialites: a Korean perspective. *J. Petrol. Soc. Korea* **24**: 291-305.
12. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid, simple, and inexpensive methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3616-3619.
13. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries. 2014. Statistical year book of maritime affairs and fisheries.
14. National Fisheries Research & Development Institute. 2015. Prevention of bacterial fish disease and medical treatment for produce health fish.
15. Nguyen HT, Kanai K. 1999. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 769-776.
16. Oh KO, Kim KK. 2009. Prevention of Biofilm Infections. *J. Bacteriol. Virol.* **39**: 237-246.
17. Park JS, Ju SA, Heo MS, Jung CR, Ju JW. 1999. Purification siderophore from *Vibrio mimicus* ATCC 33653 and its effect to bacterial pathogenicity. *J. Korean Soc. Microbiol.* **34**: 461-470.
18. Statistics Korea. 2015. Aquaculture Status Survey.
19. Woo SH, Lee JH, Kim YK, Cho MY, Jung SH, Kim JW, et al. 2010. Effects of garlic *Allium sativum* extract immersion on the immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus* pre-challenged with pathogenic bacteria. *J. Fish. Pathol.* **23**: 199-209.