Journal of Environmental Science International
30(5); 369~378; May 2021

pISSN: 1225-4517 eISSN: 2287-3503
https://doi.org/10.5322/JESI.2021.30.5.369

ORIGINAL ARTICLE

인돌의 항균 효과에 의한 *Pantoea agglomerans*의 바이오필름 생성 억제 조절에 관한 연구

진슬 · 양웅석[1] · 황철원[2]* · 이재용[3]

한동대학교 생명과학부 , [1]포항노다지마을㈜, [2]한동대학교 GLS학부, [3]경운대학교 항공신소재공학과

Study on the Control of Biofilm Formation Inhibition on *Pantoea agglomerans* by Anti-bacterial Effect of Indole

Seul Jin, Woong-Suk Yang[1], Cher-Won Hwang[2]*, Jae-Yong Lee[3]

Department of Life-Science, Handong Global University, Gyeongbuk 37554, Korea

[1] Nodaji R&D Center, Nodaji Co., Ltd., Pohang, Gyeongbuk 37927, Korea

[2]Global Leadership School, Handong Global University, Gyeongbuk 37554, Korea

[3]Department of Advanced Aerospace Materials Engineering, Kyungwoon University, Gyeongbuk 39160, Korea

Abstract

In this study, we investigated the effects of indole on biofilm formation inhibition in *Pantoea agglomerans* (*P. agglomerans*). In the biofilm growth assay, indole inhibited biofilm formation across all the growth time. Depending on biofilm growth stage, indole exhibited biofilm inhibition and anti-bacterial effects on planktonic cells. Through the analysis of the proportion rate between biofilm and Colony Forming Units (CFU) and inhibition rate of indole, we confirmed that depending on the biofilm stage of *P. agglomerans*, indole treatment timing was more important than the treatment duration. By comparing gene expression rates through rt-qPCR *P.agglomerans* affected by indole was found to significantly change quorum sensing (*pagI/R*) and indole transportation (*bssS*) gene expressions. Throughout all, indole exhibited both antimicrobial and anti-biofilm effects on *P. agglomerans*. In addition, we confirmed the anti-biofilm effects of indole on mature biofilm. In conclusion, indole as a signal molecule, can exhibit anti-biofilm effects through bacterial quorum sensing inhibition and indole affects. Therefore, indole can regulate biofilm bacteria especially gram-negative opportunistic pathogens.

Key words : Anti-bofilm, Indole, *Pantoea agglomerans*, Quorum sensing

1. 서 론

바이오필름(biofilm)은 고체 표면에 미생물들이 부착하여 성장하면서 분비하는 중합체(EPS; extracellular polysaccharide)로 알려져 있으며(Kim et al., 2011; Jahid et al., 2012; Kang et al., 2019), 미생물이 바이오필름을 형성하면 표면에 강하게 부착되어 제거가 어려울 뿐만 아니라, 외부의 자극으로 부터 스스로를 보호하게

Received 18 January, 2021; **Revised** 15 March, 2021;
Accepted 19 April, 2021
***Corresponding author**: Cher-Won Hwang, Global Leadship School, Handong Global University, Gyeongbuk 37554, Korea
Phone: +82-54-260-1304
E-mail: chowon@handong.edu

ⓒ The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되어 유해 미생물 제거에도 영향을 미친다(Jacque et al., 2010; Kang et al., 2019). 특히 바이오필름을 형성하지 않고 부유하는 planktonic 상태와는 달리, 미생물에 형성된 바이오필름은 항생물질에 대한 내성이 500배에서 1000배까지 증가하기 때문에 생태 환경학적으로 유해 미생물 제거를 위한 과정의 어려움으로 인해 효과적인 유해 미생물 억제에 심각한 문제를 일으킨다(El-Azizi et al., 2005; Choi et al., 2011; Kang et al., 2019). 이러한 결과는 인간을 포함한 다양한 동·식물과 관련된 질병의 예방 또는 치료를 어렵게 만드는 요인으로 작용한다.

Pantoea agglomerans (*P. agglomerans*)는 그람 음성균으로 토양 및 농업환경에 널리 분포되어 식물성 병원균으로 작용하며, 사람에게는 기회성 병원균(opportunistic pathogen)으로 감염증을 유발한다(Dutkiewicz et al., 2016). 농업환경에서 *P. agglomerans*는 목화(*Gossypium hirsutum*), 양파(*Allium cepa*)와 완두콩(*Lathyrus maritimus*)의 식물병을 유발해 작물의 생산량 감소를 일으킨다(Dutkiewicz et al., 2016). 특히, 한국을 비롯한 쌀을 주식으로 하는 나라에서 벼(*Oryza sativa*) 잎에 병해를 유발하여 농업형질의 악화 및 수량성을 떨어뜨리는 주된 요인으로 작용한다. *P. agglomerans*의 제거는 환경적 측면에서 중요시 다루어 지지만 바이오필름 형성으로 인하여 항생물질 또는 화학물질에 의한 내성을 증가시켜 미생물의 제거를 어렵게 만든다는 어려움이 있다(Choi et al., 2011; Dutkiewicz et al., 2016; Velmourougane et al., 2017).

미생물들의 생육에서 환경학적으로 피해를 주는 바이오필름 형성은 쿼럼센싱(quorum sensing)을 통하여 조절할 수 있다는 연구결과들이 최근 들어 주목을 받고 있다. 쿼럼센싱은 미생물 간의 의사소통방식(signaling communication)으로(Wai-Leung and Bassler, 2009), 그람 음성균과 양성균은 서로 다른 방식으로 신호전달 물질을 분비한다. 일반적으로 그람 음성균은 AHL (acyl homoserine lactone)을, 그람 양성균은 AIPs (autoinducing peptide)를 각각 분비하는 것으로 알려져 있다(Miller and Bassler, 2001). *P. agglomerans* 또한 다른 그람 음성균과 마찬가지로 AHL을 신호전달 물질로 사용한다(Jiang et al., 2015). 미생물 밀도가 특정 수준 이상 되었을 때, 이에 따른 신호전달물질의 인식으로 인해서 미생물 발광(Miyashiro and Ruby, 2012), 병원성(Rutherford and Bassler, 2012), 바이오필름 형성(Li and Tian, 2012) 등의 활동이 이루어진다. 이에 따라 쿼럼센싱의 조절기작을 통하여 미생물간의 의사소통을 차단을 통한 바이오필름 형성을 조절하는 쿼럼퀜칭(quorum quenching)에 대한 연구의 관심이 증가하고 있다(Paluch et al., 2020).

인돌(indole)은 분자식 C_8H_7N인 방향족 헤테로 고리 유기 화합물이다. 자연계에 존재하는 인돌은 재스민과 같은 일부 식물의 꽃에 들어있는데 indole-3-carbinol 같은 인돌유래의 물질은 브로콜리, 양배추, 케일, 십자화과 농작물에도 존재하며, 다양한 세균들에 의해 생성될 수 있다. 또한 인돌은 필수 아미노산인 트립토판(tryptophan)의 대사산물로 우리 몸의 장 속에서 생산되어 세로토닌의 전구물질로 작용한다. 세포 간 신호 분자로서 인돌은 포자 형성, 플라스미드의 안정성, 약물에 대한 내성, 생물막 형성, 독력 등을 포함한 세균 생리의 다양한 측면들을 조절한다(Lee and Lee, 2010; Kim and Park, 2013; Kim and Park, 2015). 최근에는 인돌 유래의 화학 성분이 포유동물의 생명을 연장시키는 잠재적인 효과가 있다는 새로운 연구결과가 발표되었다. 예쁜 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 대상으로 한 연구에서 인돌은 기대수명을 크게 높이지는 않았으나 건강수명은 연장시키는 것으로 나타났다. 선충에서와 마찬가지로 실험쥐의 경우에도 인돌을 생산하는 실험쥐는 나이가 들어서도 젊음을 유지했고 건강 체중과 활동성을 유지하는 등 인돌 생산은 생명을 연장시켜주는 것으로 나타났다(Lee et al., 2017; Robert et al., 2017). 이러한 결과는 인돌의 다양한 생리·생화학적 기능적 특성을 보여주며, 미생물을 포함한 다양한 인돌 관련 연구 분야의 중요성을 제시한다.

이전의 연구에서, 대장균 *Escherichia coli* (이하 *E. coli*)에서의 바이오필름 형성과정에서 발현이 변화된 *yliH* (*bssR*), *yecP* (*bssS*) 두 유전자는 미생물의 운동성 조절(motility regulation)에 관여하는 단백질을 코딩한다. 두 유전자의 기능이 제거(gene deletion)된 돌연변이주(mutants)는 야생형(wild type)에 비해 바이오필름 형성량(biofilm mass; 240-290배), 표면 커버리지(surface coverage; 16-31배) 및 평균두께(mean thickness; 2,800배)를 각각 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 대장균의 두 유전자의 돌연변이주(*yliH*, *yceP* mutants)

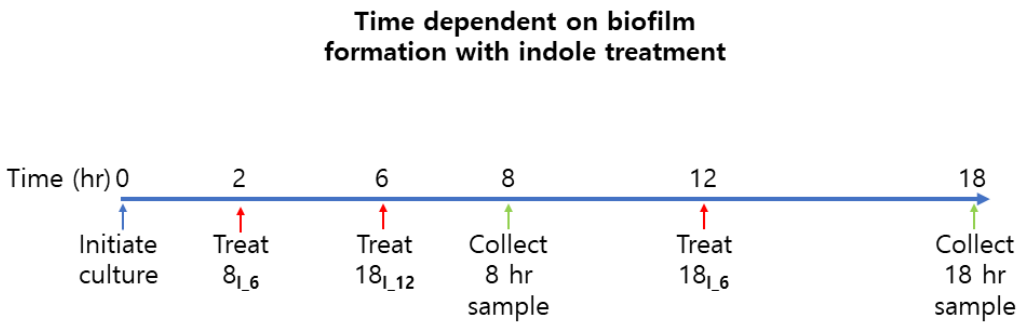

Fig. 1. A schematic diagram of biofilm growth and indole treatment time-course. Abbreviation: 8_{I_6}, 8 h biofilm 6 h indole treatment; 18_{I_6} , 18 h biofilm 6 h indole treatment; 18_{I_6}, 18 h biofilm 6 h indole treatment.

에서의 내·외적으로의 인돌 농도의 감소는 바이오필름 형성을 50-140배까지 증가시켰다(Domka et al., 2006). 이러한 결과는 인돌과 바이오필름형성 억제의 상관관계를 보여준다. 따라서, 본 연구에서는 농작물에 피해를 주는 그람 음성균인 *P. agglomerans*에서 외부적으로 인돌에 의한 바이오필름 형성 억제를 처리 시간에 따라 분석하였으며, 바이오필름 형성 억제와 관련된 쿼럼센싱 신호전달물질인 AHLs 합성 및 결합 유전자(*pagI/R*) 인돌 수송 유전자(*bssS*)의 발현을 비교 분석하였다. 이를 통해, 농작물의 식물병을 유발하는 *P. agglomerans*의 바이오필름 형성을 조절하는 후보물질로서 인돌에 대한 기초적인 지식 확립에 따른 농업 생태계의 식물방제를 조절 할 수 있는 기초자료를 마련하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배지

P. agglomernas (KACC 15275; ATCC 27155) 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원 씨앗은행에서 분양받아 사용하였다. 균주는 LB(Luria-Bertani) broth medium에서 30℃에서 배양하였으며, 차후 실험에서도 동일한 배지 및 온도에서 수행하였다.

2.2. 시간에 따른 바이오필름 및 planktonic 상태형성

시간에 따른 바이오필름 형성 및 인돌의 영향을 확인하기 위해 균주 접종 후 48 h 동안 6 h 간격으로 실험을 진행하였다. 96-well plate (Corning. USA)에 배양한 균주를 well당 200 μL (1×10^7 cells/mL)로 분주 후 인돌을 처리하지 않은 대조군(contol)과 1 mM 최종농도의 인돌 처리된 실험군으로 나누어 인돌 처리 시간에 따른 바이오필름 형성 영향 유무를 확인하였다. Planktonic 상태는 균주가 표면에 부착하지 못하도록 180 rpm으로 흔들어 주며 배양했다. 이번 연구에 대한 모식도를 Fig. 1에서 나타내었다.

2.3. 흡광도를 이용한 바이오필름 측정

바이오필름 형성 측정은 이전에 보고된 O'Toole G.A (2011)의 바이오필름 assay를 일부 수정해서 사용하였다. 96-well plate에 바이오필름만 측정하기 위해 배양액만을 간단하게 버린 후, 표면에 미세하게 붙어있는 planktonic cells을 제거하기 위해 웰(well)당 PBS로 3회 수세하였다. 이후 웰 당 0.1% crystal violet (Sigma-Aldrich, USA) 용액 225 μL을 넣은 후 15분간 정치배양 후 PBS로 5회 수세하였다. 이 후 상온에서 8 h 동안 건조한 샘플은 30% acetic acid (Sigma-Aldrich, USA) 용액 225 μL을 넣어준 후 15분간 정치 배양하였다. 이후 SPECTROstar Nano (BMG LABTECG)로 600 nm에서 흡광도(optical density)값을 측정하였으며, 30% acetic acid 용액을 normalization (또는 blank)을 위해 사용하였다.

2.4. 바이오필름 내의 생균 수 비교

인돌의 바이오필름 형성 억제능은 바이오필름 내부의 생균수 측정을 통해서 확인하였다. 13 mL falcon tube에서 초기접종 농도는 1×10^7 cells/mL 로 보정하였다. 30℃에서 정치배양하면서 특정시간에 샘플링 후 cell pellets를 PBS로 2회 수세 후 동일한 buffer solution에 현탁한 cell pellets은 1분간 vortex 및 sonication을

통해 cell aggregation을 최소화하였다. 이 후 적절한 LB broth로 적절히 희석 후 LB agar plate에 도말 후 자란 균 집락을 세어 주었다. 바이오필름 내의 생균수 비율 및 inhibition rate는 이전에 보고된 문헌을 참고하여 산출하였다(Mitra and Jens, 2016).

Biofilm proportion percentage (BP)
= [CFU biofilm/(CFU biofilm + CFU planktonic)] × 100
Percentage inhibition
= [CFU Negative control − CFU Indole /CFU Negative control] × 100

2.5. Real-time qPCR (RT-qPCR)을 통한 유전자 발현 비교

초기접종 농도는 1×10^7 cells/mL의 농도로 LB broth 배지에 접종 후 30℃에서 배양하였다. 측정시간대에서 샘플링 후 원심분리(centrifugation; 10,000 × g, 4℃, 20 min)를 통해서 균주 침전물만을 회수하였다. 회수된 cell pellets은 즉시 액체질소에 담군 후 차후 실험을 위해 -80℃에서 보관하였다. Cell pellets으로부터의 total RNA 추출은 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (Takara, Japan)의 매뉴얼(manufacturer's instructions)에 따라서 수행하였다. cDNA는 PrimeScript 1st cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)을 통해 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 SYBR master mix (Thermo fisher, USA)를 통해 RT-qPCR 분석을 수행하였다. PCR 조건은 이전에 보고된 문헌을 참고하였으며 (Kenneth and Thomas, 2001), 16S rRNA 유전자는 housekeeping control로 사용되었다.

2.6. 통계분석

모든 실험은 최소한 3회 이상 반복 수행하였으며, GraphPad Prism 8.0(GraphPad software, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 인돌의 *P. agglomerans*의 바이오필름 생성 조절

*P. agglomerans*는 *Enterobacter agglomerans*로 명명된 *Enterobaceriace*에 속하는 균주이다. *P. agglomerans*는 식물과 동물 등 자연계에서 흔히 발견되는 그람 음성 세균(gram-negative bacteria)이다. *P. agglomerans*의 기작 중의 하나로 *P. agglomerans*는 병원성 섬(pathogenicity island; PAI)을 지니는 플라스미드(plasmid)를 획득하여 Hrp 의존성 및 숙주 특이적인 종양 형성 병원체(Hrp-dependent and host-specific tumorigenic pathogen)를 지니고 있다. PAI는 유전적으로 다양한 *P. agglomerans* 개체에서 분포하는 IncN 계열의 반복 플라스미드(iteron plasmid)에서 진화하였으며, PAI의 구조는 최근에 새롭게 진화한 병원체의 출현을 뒷받침하기도 한다(Barash and Manulis-Sasson, 2009). 따라서, *P. agglomerans* 유래 새로운 박테리아 병원체의 출현을 억제하기 위한 하나의 방법으로써 *P. agglomerans* 균주의 바이오필름 병리 적응 매커니즘도 관련될 수 있지만, 수평적 유전자 전달의 억제도 매우 중요하다. 이러한 배경 하에 본 연구는 인돌에 의한 *P. agglomerans*의 바이오필름의 억제에 따른 개체수 조절에 대한 연구이다.

Crystal violet assay를 통한 인돌에 의한 바이오필름 기반 균주의 개체수 변화를 흡광도를 통해 모니터링 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 접종 후 12 h 전까지는 대조구와 1 mM 또는 2 mM 의 인돌이 첨가된 실험군에서 흡광도 값이 크게 차이를 보이지 않았다. 그러나 12 h 이후부터 대조구와 실험군에서 미세한 변화를 보이다가 18 h 이후부터 흡광도 값의 시각적인 차이가 나타나기 시작했다. 접종 후 30 h 이후부터는 48 h까지 대조군에서 완전한 지수기 성장(exponential growth)을 보였다. 반면에, 1 mM 또는 2 mM 의 인돌이 첨가된 실험군에서는

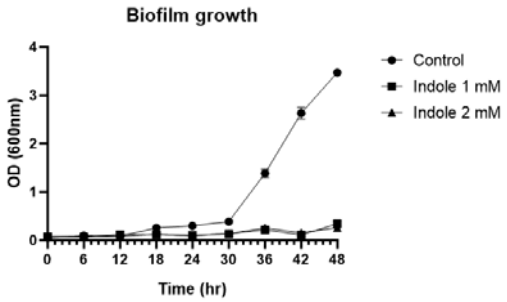

Fig. 2. *P. agglomerans* biofilm growth rate on indole concentrations.

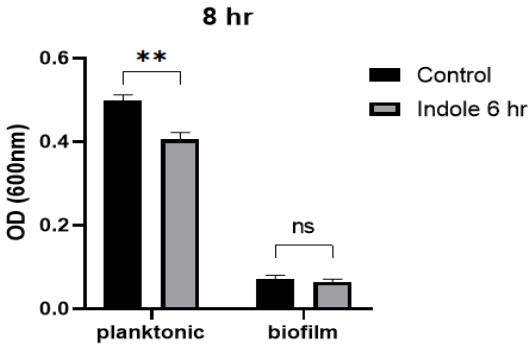

Fig. 3. Biofilm and planktonic growth on indole concentrations at early stage (8 h).

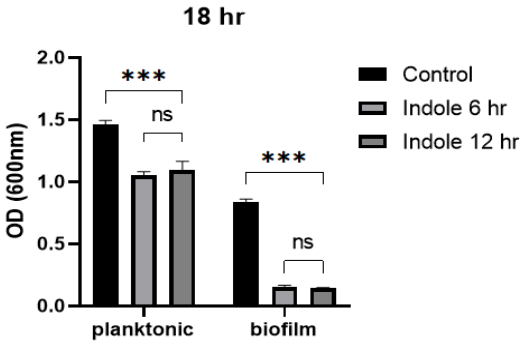

Fig. 4. Biofilm and planktonic growth on indole concentrations at middle stage (18 h).

48 h 동안 흡광도 값의 차이가 거의 없었으며, 지연기(lag phase)에 머물러 있었다. 1 mM 또는 2 mM 의 인돌이 첨가된 실험군에서 흡광도 값의 뚜렷한 차이점이 없어 차후의 실험에는 1 mM의 인돌을 사용하였다.

Fig. 2의 결과를 바탕으로 개체수에 따른 인돌의 바이오필름 형성의 상관관계를 시간에 따라 분석하였다. 실험군의 결과에서 인돌의 유무에 따른 대조군이나 실험군에서 접종 후 8 h까지는 지연기 상태를 유지하였으며, 18 h부터는 실험군에서 초기 지수기(early log phase)에 진입하였다. 지수기로의 진입은 개체수의 급속한 상승을 나타낸다. 이러한 결과를 토대로 지연기와 초기 지수기의 해당하는 8 h과 18 h에 초점을 맞추어 분석을 진행하였다. 초기 8 h째에서는 인돌의 유무에 상관없이 대조군이나 인돌을 처리한 실험군에서의 바이오필름 내의 개체수 변화는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 물론 바이오필름 내의 개체수보다 부유군에서의 흡광도 값이 훨씬 높음을 알 수 있다. 그러나 부유군(planktonic)에서는 대조구에 비해 인돌을 처리한 실험구에서의 흡광도 값이 대략 1.25배 정도 낮게 나타났다(Fig. 3).

다음으로, 접종 후 초기 지수기에 해당하는 18 h에서의 인돌 처리의 유무에 따라 부유군과 바이오필름 내에서의 개체수 변화를 모니터링 하였다. 인돌을 처리한 대조군(control)과 실험군(indole)의 부유군(planktonic)이나 바이오필름(biofilm) 내의 개체수의 변화는 뚜렷하게 나타났다. 뚜렷한 개체수 변화양상은 바이오필름의 대조구와 인돌을 처리한 실험군(인돌 처리군)에서 나타났다. 인돌을 처리하지 않은 대조구에서는 흡광도 값이 거의 0.9에 준하는 값에 이르렀으나, 인돌을 처리한 실험군에서는 흡광도 값이 거의 0.1 수준에 머물렀다. 다른 한편으로, 부유군(planktonic)에서의 대조군과 인돌을 처리한 실험군에서도 흡광도 값의 유의미한 변화를 보였다. 인돌을 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값은 거의 1.5에 도달하였으나, 인돌을 처리한 실험군의 흡광도 값은 대략 1.0 내외에 있었다. 부유군(control)이나 바이오필름(biofilm) 내의 인돌처리 시간에 따른 흡광도 값은 거의 차이가 나지 않는 것으로 보아 인돌의 처리 시간은 크게 중요하지 않음을 나타낸다(Fig. 4). 외재적인 인돌 처리는 *P. agglomerans* 균주의 개체수 조절(population control)에 따른 바이오필름 형성을 컨트롤한다는 것을 나타낸다.

서론부분에서 언급한 바와 같이 *E. coli*에서의 미생물의 운동성 조절(motility regulation)에 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자의 결핍(*yliH*△, *yceP*△)은 바이오필름 형성능을 수십 배 이상 증가시켰으며, 세포 내의 인돌 농도도 현저히 감소했다. 동일한 변이주에서의 외재적인 인돌의 주입은 바이오필름의 형성능을 야생형(wild type)의 수준까지 회복시켰다(Domka et al., 2006). 이러한 결과를 종합하면, 현재의 결과는 *P. agglomerans*에서 인돌의 주입은 세포의 개체수를 조절을 통한 항균효과임을 제시한다. 나아가서 항균효과에 따른 바이오필름 생성능의 억제를 유발함을 암시함과 동시에, 바이오필름 형성은 미생물의 개체수가 일정 수준에 도달해야 함을 의미한다.

인돌의 planktonic 상태에서의 bacteria 성장 억제는

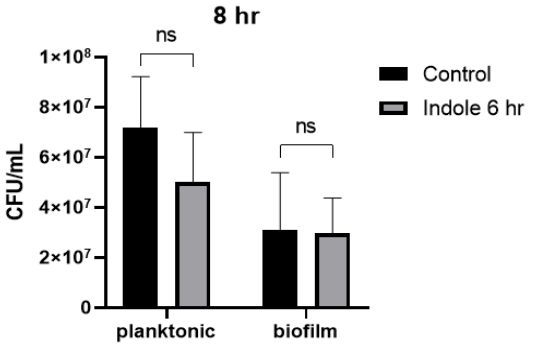

Fig. 5. Colony forming units (CFU) of planktonic and biofilm on indole concentrations at early stage (8 h).

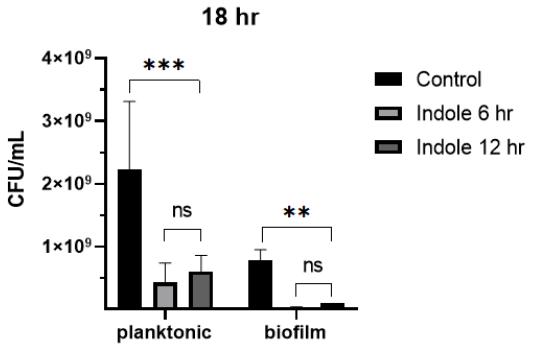

Fig. 6. Colony forming units (CFU) of planktonic and biofilm on indole concentrations at middle stage (18 h).

Table 1. Biofilm proportion rate (BP) against indole

Time	$BP_{Control}$	BP_{Indole}		Inhibition rate	
8 h	47.941	37.238		22.325	
18 h	25.856	5.109	14.150	80.238	45.270

같은 그람 음성균인 *Xenorhabdus nematophilus*에서의 항균작용과 같았다(Sunder and Chang, 1993). 이를 통하여 인돌의 *P. agglomerans* 바이오필름 성장 억제가 군집 성장 초기에 균 밀도가 모자라 쿼럼센싱에 도달하지 못하여 바이오필름 생성이 제대로 되지 않을 것이라 추측된다.

3.2. CFU를 통한 인돌의 항균능에 따른 바이오필름 내의 개체수 비교 분석

인돌의 항균능에 따른 바이오필름 내의 개체수 변화를 먼저 흡광도의 변화를 통해 분석하였다. 그러나 흡광도 값을 기반을 둔 결과에는 매우 중요한 단점이 존재한다. 즉, 생균과 사균의 구별이 어렵다는 것이다. 이러한 단점을 극복하고자 Colony Forming Units (CFU)를 도입한 생균수를 측정하였다. 인돌의 처리 유무에 따른 개체수 변화는 흡광도 값과 유사한 결과를 보였다. 8 h째에서의 샘플에서 부유군(planktonic)에서의 대조군(control)과 인돌 처리 실험군(indole)에서의 개체수는 대조군이 실험군보다 약 1.4배 정도 높았다. 반면에 바이오필름 내의 대조군과 실함군에서의 개체수는 차이점이 나타나지 않았다(Fig. 5). 18 h째 샘플에서는 부유군과 바이오필름 내의 대조군과 인돌 처리 실험군에서의 개체수 변화는 뚜렷한 차이점을 보였다. 인돌을 처리하지 않은 부유군과 바이오필름 내의 개체수는 인돌을 처리한 군(부유군 및 바이오필름군)과의 비교 시에 현저히 증가하였다. 즉 대조군 내의 부유군과 바이오필름 내의 개체수는 인돌을 처리한 군보다 약 10배 이상 높았다. 위에서 언급한 바와 같이 생균수 결과에서도 인돌의 처리 시간은 개체수 변화의 중요한 요인이 아님을 보여주었다(Fig. 5.). 생균수의 결과와 흡광도 분석 결과 사이에는 미세한 차이가 존재할지라도 대조군보다 인돌을 처리한 실험군에서 개체수가 감소하는 양상은 같았다.

다음으로, 대조군과 인돌을 처리했을 때의 biofilm proportion rate (BP) 및 저해율(inhibition rate)도 흡광도 및 생균수 결과와 크게 다르지 않았다. 두 시간대 모두(8 h 및 18 h) 인돌을 첨가해 주었을 때 BP가 감소하였다. 8 h대보다 18 h에 바이오필름 저해율이 더 큰 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 이것은 바이오필름의 형성 조건이 개체수에 비례하며, 일정한 농도 이상의 개체수에 도달했을 때 바이오필름의 효과가 나타난다는 것을 보여준다. 바이오필름의 형성 사이클은 크게 5 단계로 나뉘는데 다음과 같다. 부유 세균의 생체표면 부착, 세균의 응집 및 끈적이는 물질 분비, 바이오필름 형성, 3차원적인

성장을 통해 성숙한 바이오필름 형성, 그리고 임계량에 도달한 다음 부유 세균의 방출이다. 이러한 바이오필름의 유도인자(inducer)로는 영양상태, 침투압, pH, 이온강도, 산소분압, 온도 등이 있다(O'Toole et al., 2000; Rabin et al., 2015; Hall and Mah, 2017; Koo et al., 2017). 미생물이 바이오필름을 형성하는 이유는, 미생물은 세포사이에 상호 커뮤니케이션을 해서 자기기능을 제어하여 환경변화에 적응하는 본능을 가지고 있는데, 영양조건 등 특정의 환경요인 변화에 따라 바이오필름의 형성을 시작하며, 형성 요인은 다양해서 그램 음성세균은 부영양 조건에서 바이오필름을 형성하고 신선한 영양이 공급되는 한 성장을 계속하다가, 영양상태가 결핍되면 일부가 부유 상태로 되어 좋은 환경을 찾아서 이동한다(Hall and Mah, 2017; Koo et al., 2017). 또한, 세균이 극한 환경 등 생물권 전체에 생존할 수 있는 이유는 다양한 물질대사 경로(different metabolic pathway)와 유전학적 형질의 유연함(genetic rearranagement) 때문이다. 이러한 적응능력의 중요요소 중 하나는 편모운동이나 고체표면에 간단하게 수축하거나 활주함으로서 증식에 적합한 장소로 이동하여 안착하는 메커니즘이며, 또 하나는 응집과 부착메커니즘으로 세포가 응집하여 침강율과 세포 간 상호작용이 증진되고 부착에 의해 고체표면에 정착하고 커뮤니티를 형성해서 집단으로 생리생태학적 다양성을 얻게 되는 것이다(Solano et al., 2014; Roy et al., 2018). 미생물은 단독으로 존재할 수도 있으나, 대부분은 바이오필름의 형태로 존재하는데 이는 세균에게 가장 효율적인 서식 형태이며, 집단 형성에 의해서 화학물질 매개의 커뮤니케이션 뿐 아니라, 접촉함으로서 주변 환경을 인지하고 유전자 발현이나 대사 활성을 제어하여 커뮤니티로서 개개 세균의 역할을 부여하고 있다(O'Tooleet al., 2000; Solano et al., 2014; Hall and Mah, 2017). 따라서, 현재의 결과는 인돌 처리에 따른 *P. agglomerans* 균주의 개체수 감소를 초래함으로써 바이오필름 형성능을 억제한다는 것을 제시한다. 즉, 바이오필름 기반 집단 형성에 있어 인돌물질 매개의 커뮤니케이션을 통해, 주변 환경을 접촉·인지하여 유전자 발현이나 대사 활성을 제어하여 커뮤니티로서 개개 세균의 역할을 차단함을 보여주는 결과라고 판단된다. 바이오필름 형성 사이클에 비추어 보면, 현재의 결과는 부유 세균의 생체표면 부착, 세균의 응집 및 끈적이는 물질 분비까지는 가능하리라 판단되나, 추후 관련 연구의 필요성이 남아 있다.

3.3. 유전자 발현 통한 인돌의 *P. agglomerans*의 바이오필름 생성 억제능

다음으로, 인돌이 세포 내의 어떠한 커뮤니케이션 기작을 통해 항균능을 가지는지를 검정하기 위해서 쿼럼센싱 및 인돌 전달과 관련한 유전자 발현 분석을 RT-qPCR을 통해 수행하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, 쿼럼센싱 신호전달물질 합성 및 수용체 유전자인 *pagI/R*의 발현은 지연기에 해당하는 8 h째인 부유군(planktonic)에서는 인돌을 처리하지 않은 대조구와 인돌을 처리한 실험군 사이에서 발현의 변화가 없었으나, 바이오필름군(biofilm)에서는 대조구에 비해 실험군에서 발현이 현저히 감소하였다. 인돌 수송 역할을 하는 bssS 유전자의 발현양상은 부유군 및 바이오필름군에서 대조구에 비해 인돌이 처리된 실험구에서 발현이 3.5배 이상 증가하였다(Fig. 7.).

초기 대수기에 해당하는 18 h째의 샘플에서는 *pagI/R*의 발현은 정도의 차이는 존재하나, 부유군이나 바이오필름군 모두에서 대조구(control)에 비해 인돌 처리 실험군에서 유의미한 감소가 있었다. 동일한 시기의 세포에서의 *bssS* 유전자의 발현양상은 상이한 차이점을 보였다. 전체적인 발현양상은 인돌을 처리하지 않은 대조구에 비해 인돌을 처리한 실험군에서 발현이 현저히 증가하였다. 자세히 들여다보면, 대조구에서 bssS 발현은 부유군에 비해 바이오필름군에서 약 2배 정도 증가하였다. 인돌을 처리한 실험군에서는 부유군이나 바이오필름군에서 인돌 처리 후 6 h에서 발현이 가장 높았으며, 처리 후 12 h에서는 다시 감소하는 양상을 보였다. 이러한 현상은 다음과 같이 정리할 수 있으리라 본다. 인돌을 처리한 6 h 내에서는 인돌의 uptake를 통한 개체수의 조절을 위해 세포가 왕성하게 활동하다가, 어느정도 안정기에 접어든 12 h에서 mRNA의 saturation을 통한 전사 후 변형과정에 돌입한 것이라고 사료된다(Fig. 8). 이러한 결과는 Fig. 2의 결과를 통해서도 알 수 있다. 대조구는 12 h에서는 개체수의 변화를 보이는 반면, 인돌을 처리한 실험군에서는 동일한 시간 때에도 개체수의 변화가 없었다. 즉, 인돌에 의한 *P. agglomerans* 개체수의 조절에 있어 안정기에 접어 들었다고 보여진다.

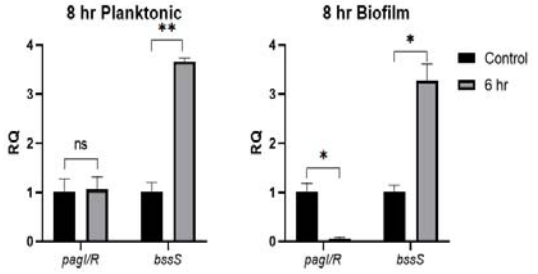

Fig. 7. Gene expression in early stage biofilm against indole.

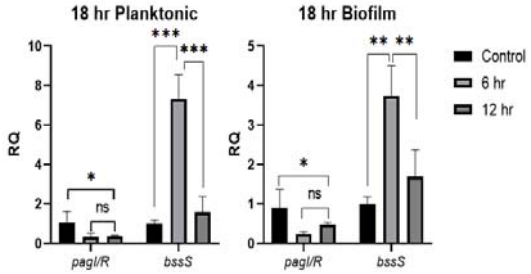

Fig. 8. Gene expression in middle stage of biofilm against indole.

인돌을 처리했을 때 두 가지 유전자 발현의 비교에서 *pagI/R*의 발현 감소는 쿼럼센싱 신호전달을 억제를 통해 세포간의 커뮤니케이션 단절을 초래한다. 반면 bssS의 발현 증가는 인돌의 세포 내 유입을 활성화시켜 인돌의 기능적 특정을 극대화할 수 있다(Piñero-Fernandez et al., 2011; Ma et al., 2018). 이전의 연구에 의하면, *E. coli yliH*(*bssR*), *yecP*(*bssS*) 유전자 관련 각각의 변이주(mutants)는 quorum sensing과 관련된 extracellular autoinducer 2 (*gadAB*, *flgBCEGHHIJLMN*)의 발현을 약 50배 정도 증가시킴으로써 바이오필름 형성능을 야생형에(wild type) 비해 수십 배 이상 증가시켰다(Domka et al., 2006). 세포의 운동성(cell motility)과 관련이 있는 이 두 유전자는 유전자 기능을 상실함으로써 세포의 운동성이 7배까지 감소하였다.특히 , *yecP*△ 변이주에서 이러한 현상이 더욱 더 뚜렷하게 나타났으며, 이는 flagella 및 motility loci관련 전사물(transcripts)의 활성화에 기인하였다(Domka et al., 2006). 이러한 결과는 인돌수송 또는 세포 운동성에 관여하는 *bssR*, *yliH*, *bssS* 및 *yceP* 유전자를 바이오필름의 주된 조절인자(regulator)라고 알려져 있다(Domka et al., 2006). 따라서, 분자적 수준에서 *P. agglomerans*에서의 항균 효과에 따른 바이오필름 생성 억제는 *pagI/R* 의 발현 감소에 따른 세포 간의 의사소통 단절 및 운동성 감소를 통한 바이오필름 형태가 아닌 세포 단독으로의 유도 촉진 및 bssS의 발현 증가에 따른 인돌의 세포 내 흡수율을 증가시켜 항균효과의 극대화를 도모하는 것으로 사료된다.

4. 결 론

*P. agglomerans*에 대한 인돌의 항균효과에 따른 바이오필름 생성억제능을 표현형 기반 생존율(흡광도 및 생균수 측정)을 통해 규명하였다. 또한 분자적 수준에서 인돌의 항균 매커니즘은 *pagI/R*의 발현 감소로 인한 다른 세포간의 의사소통의 무력화 및 *bssS*의 발현 증가에 따른 인돌의 세포 내로의 유입 촉진을 통한 인돌의 항균 작용이 있음을 제시하였다. 따라서 *P. agglomerans*에 있어 인돌의 처리는 세포의 개체수 조절을 통한 바이오필름 생성을 억제하는 것으로 결론을 내림과 인돌이 직접적으로 바이오필름 형성 기작에 관여하여 억제하는지에 대한 차후 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

본 논문은 2019년도 정부(교육부)의 제원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구 사업(2017 R1D1A1B03032867)입니다.

REFERENCES

Barash, I., Manulis-Sasson, S., 2009, Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming Pantoea agglomerans case, Annu Rev Phytopathol, 47, 133-52.

Choi, Y. W., Lee, H. W., Kim, S. M., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., Kim, J. M., 2011, Biofilm forming ability and production of curli and cellulose in clinical isolates of Enterobacteriaceae, The Korean Journal of Microbiology, 47, 335-341.

Domka, J., Lee, J., Wood, T. K., 2006, YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate Escherichia coli K-12 biofilm formation by influencing cell signaling, Applied and environmental microbiology, 72(4), 2449-2459.

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Glolec, M., Milanowski, J., 2016, Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good, Annual of Agricultural and Environmental Medicine, 23(2), 206-222.

El-Azizi, M., Rao, S., Kanchanapoom, T., Khardori, N., 2005, In vitro activity of vancomycin, quinupristin/ dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of Staphylococci, Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob, 4, 2.

Hall, C. W., Mah, T. F., 2017, Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 41(3), 276-301.

Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y. D. N., 2010, Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance, Animal Health Research Reviews, 11, 97-121.

Jahid, I. K., Ha, S. D., 2012, A Review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety, Food Science and Biotechnology, 21, 299-316.

Jiang, J., Wu, S., Wang, J., Feng, Y., 2015, AHL-type quorum sensing and its regulation on symplasmata formation in Pantoea agglomerans YS19, J. Basic Microbiol., 55(5), 607-16.

Kang, E. J., Park, J. H., Jin, S., Kim, Y. R., Do, H. K., Yang, W. S., Lee, J. Y., Hwang, C. W., 2019, Comparison of in vitro anti-biofilm activities of natural plant extracts against environment harmful bacteria, J. Environ. Sci. Int., 28(2), 225-233.

Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017, Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies, Nat. Rev. Microbiol., 15(12), 740-755.

Kim, J. Y., Yoo, H. L., Lee, Y. D., Park, J. H., 2011, Detection of Bacillus cereus Group from Raw rice and characteristics of biofilm formation, Korean J. Food. Nutr., 24, 657-663.

Kim, J. S., Park, W. J., 2013, Indole inhibits bacterial quorum-sensing transmission by interfering with quorum-sensing regulator folding, Microbiology, 159(Pt_12), 2616-2625.

Kim, J., Park, W., 2015, Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration?. Journal of Microbiol, 53, 421-428.

Li, Y. H., Tian, X., 2012, Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms, Sensors (Basel, Switzerland), 12(3), 2519-2538.

Livak. K. J., Schmittgen. T. D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔct Method, METHODS 25, 402-408.

Lee, J. H., Lee, J. T., 2010, Indole as an intercellular signal in microbial communities, FEMS Microbiology Review, 34(4), 426-44.

Lee, J. H., Kim, Y. G., Kim, M. S., Kim, E. M., Choi, H, J., Kim, Y, H., Lee, J, T., 2017, Indole-associated predator-prey interactions between the nematode Caenorhabditis elegans and bacteria, Environ. Microbiol., 19(5), 1776-1790.

Ma, Q., Zhang, X., Qu, Y., 2018, Biodegradation and biotransformation of indole: advances and Perspectives, Frontier in microbiology, 9, 2625.

Miller, B. M., Bassler, B. L., 2001, Quorum Sensing Bacteria, Annu. Rev, Microbiol., 55, 165-99.

Mitra, M. B., Jens, R., 2016, Antibiofilm activity of essential oils, and plant extracts gainst Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms, Food Control., 61, 156-164.

Miyashiro, T., Ruby, E. G., 2012, Shedding light on bioluminescence regulation in Vibrio fischeri. Molecular microbiology, 84(5), 795 - 806.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, Annu. Rev. Microbiol., 54, 49-79.

O'Toole, G. A., 2011, Microtiter dish biofilm formation assay, Journal of visualized experiments : JoVE, (47), 2437.

Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K., 2020, Prevention of biofilm formation by quorum quenching, Applied microbiology and biotechnology, 104(5), 1871-1881

Piñero-Fernandez, S., Chimerel, C. Keyser, U. F., Summers, D. K., 2011, Indole transport across Escherichia coli membranes, Journal of bacteriology, 193(8), 1793-1798.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O., 2015, Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents, Future. Med. Chem., 7(4), 493-512.

Sonowal, R., Swimm, A., Sahoo, A., Luo, L., Matsunaga, Y., Wu, Z., Bhingarde, J. A., Ejzak. E. A., Ranawade, A.,

Qadota. H., Powell, D. N., Capaldo, C. T., Flacker, J. M., Jones, R. M., Benian, G. M., Kalman, D., 2017, Indoles from commensal bacteria extend healthspan, PNAS, 114(36).

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., Tiwari, V., 2018, Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action, Virulence, 9(1), 522-554.

Rutherford, S. T., Bassler, B. L., 2012, Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control, Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2(11).

Sunder, L., Chang. F. N., 1993, Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by Xenorhabdus nematophilus, Journal of General Microbiology, 139, 3130-3148.

Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I., 2014, Biofilm dispersion and quorum sensingm, Curr. Opin. Microbiol., 18, 96-104.

Velmourougane, K., Prasanna, R., Saxena, A. K., 2017, Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects, J. Basic Microbiology, 88, 512-520.

Ng, W. L., Bassler, B. L., 2009, Bacterial quorum -sensing network architectures, Annual review of genetics, 43, 197-222.

• Master's course. Seul Jin
Department of Life-Science, Handong Global University
21837004@handong.edu
• Research director. Woong-Suk Yang
Nodaji R&D Center, Nodaji Co., Ltd.
yangws91@naver.com
• Professor. Cher-Won Hwang
Global Leadership School, Handong Global University
chowon@handong.edu
• Professor. Jae-Yong Lee
Department of Advanced Aerospace Materials Engineering, Kyungwoon University
geoblue@ikw.ac.kr