한국생물공학회지 제21권 제5호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 21, No. 5, 347-352(2006)

현장에서 초음파 파쇄와 형광시약을 이용한 그람 양성균의 조기 탐지

† 하 연 철 · 최 기 봉 · [1]최 정 도
국방과학연구소 1-2-1, [1]충북대학교 생화학과
(접수 : 2006. 5. 23., 게재승인 : 2006. 10. 11.)

The Early Detection of the Gram Positive Bacteria using Sonification and Fluorescent Dye in the Field

Yeon-chul Ha† , Ki-bong Choi, and Jung-do Choi[1]
GSDC-2-1, Agency for Defense Development
[1]Department of Biochemistry, Chungbuk National University
(Received : 2006. 5. 23., Accepted : 2006. 10. 11.)

This study was carried out to establish the optimum condition for cell disruption with a sonificator in the detection of the gram positive bacteria, *Bacillus globigii* and *Streptococcus epidermidis* for the purpose of developing automatic fluorometer. The efficiency of sonificator on the *Bacillus globigii* and *Streptococcus epidermidis* disruption differed greatly according to the diameter of sonificator probe tip. The larger sonificator probe diameter showed greater disruption. *Bacillus globigii* was more disruptive than *Streptococcus epidermidis*. Sonificator probe of the 13 mm diameter was the most efficient one when sample was sonificated for 20 seconds. The detection limits of *Bacillus globigii* and *Streptococcus epidermidis* were 10^5 CFU/㎖ and 5×10^5 CFU/㎖ respectively when samples were sonificated for 20 seconds with a sonificator probe of 13 mm diameter.

Key Words : Sonification, disruption, fluorometer, detection

서 론

생물학작용제의 조기 경보체계를 구축하기 위하여 현장에서 미생물의 존재 유무를 탐지하는 것이 필요하다. 형광시약을 이용하여 미생물의 존재 유무를 확인하기 위해서는 먼저 세포막을 파쇄해야 하는데, sonification은 파쇄방법이 용이하고 간단하여 cell을 파쇄하고 현장에서 단시간 내에 응용하기가 손쉬운 방법이다(1, 2).

그람양성균은 multilayered network으로 조직화된 세포벽에 단단한 peptidoglycan 구조를 가지고 있어서 그람음성균보다 파쇄하기가 더 어려우며, 또한 구균이 간균보다 열역학적으로 안정하기 때문에 파쇄하기가 어렵다고 알려져 있다(3-5). Sonification에 의해 효모(6, 7), 그람양성균(8), 그람음성균(9, 10) 등을 파쇄하는 연구는 있으나 현장에서 빠른 탐지를 위한 체계적인 연구는 미약하여, 본 연구에서는 sonification을 이용하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 단시간 내에 현장에서 미생물의 존재 유무를 탐지하는 형광측정기를 개발하기 위하여 그람음성균의 탐지에 관한 연구(11)에 이어 그람양성균인 구균과 간균을 대상으로 sonificator의 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

† Corresponding Author : GSDC-2-1, Agency for Defense Development, Yuseong P. O. Box 35-1, Daejeon 305-600, Korea
Tel : +82-42-821-4686, Fax : +82-42-821-2880
E-mail : hyc0311@hanafos.com

재료 및 방법

균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 그람 양성균으로 간균인 *Bacillus globigii* (KCCM 11314)와 구균인 *Streptococcus epidermidis* (ATCC 1917)이며, 배양은 LB배지 (Luria-Bertani ; tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)를 사용하여 37℃ 200 rpm의 교반배양기에서 4시간 배양하였다. 배양후 4℃에서 10분동안 2000 g에서 원심분리하고 PBS buffer로 3회 세척하여 수확하였다. SybrGreen Green 1 nucleic acid gel stain 형광시약은 Molecular Probes사 (S7563)의 제품을 사용하였다.

생균수 측정 및 기기분석

미생물의 생균수 측정은 LB agar 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다. 미생물 농도는 측정시료 950 ㎕를 cuvette에 취한 후 Scinco사

의 UV-visible spectrophotometer (S-3100)를 이용하여 600 ㎚에서의 Optical Density로 측정하였다. 용액 중의 미생물 입자 부피의 측정은 시료 100 ㎕를 10 ㎖의 Diluent에 희석하여 20 ㎖의 sample cup을 사용하여 Beckman사의 Multisizer-3 (Aperture size 30 ㎛, 300 Size Bins)를 이용하여 측정하였다.

DNA 형광 분석은 OptiPlate Black 96-Well plate (PerkinElmer사, 6005279)에 시료 180 ㎕와 최종농도가 1 X가 되도록 형광시약 20 ㎕를 혼합하여 200 ㎕를 분주하고 1분 동안 incubation을 시킨 후 PerkinElmer사의 1420 Multilabel Counter (Ex. 485 ㎚/Em. 535 ㎚, CW-Lamp Energy : 1548, counting time : 1 sec)를 이용하여 측정하였다. 시험에 사용된 20 kHz sonificator는 Sonic & Materials사의 130 Watt Ultrasonic Processor (VCX 130)를 사용하였다.

시료에 잠긴 Sonificator probe tip 깊이

Sonificator probe가 시료 용액에 잠긴 길이에 따른 sonification 효과를 살펴보기 위하여, 10^7 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 2 ㎖를 15 ㎖의

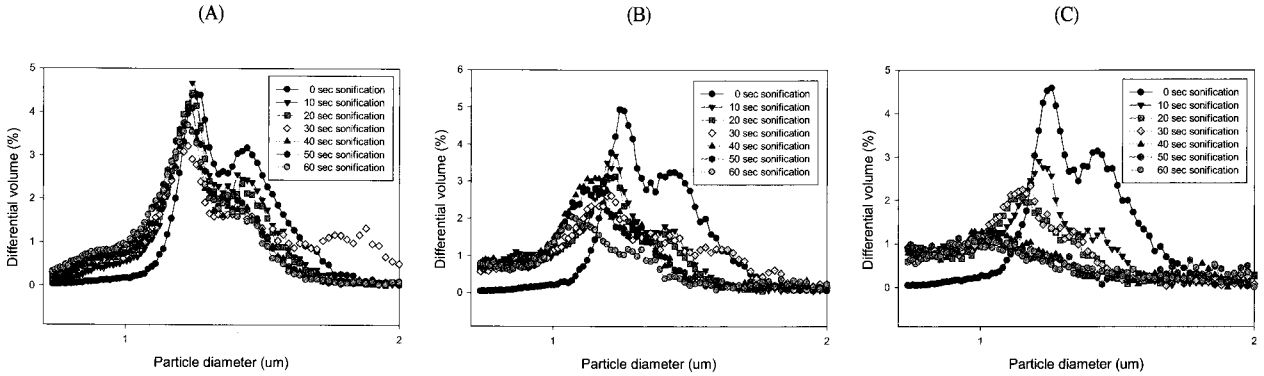

Figure 1. Differential volume of *Bacillus globigii* according to the sonification with a probe of (A) 2 ㎜ depth (B) 9 ㎜ depth (C) 16 ㎜ depth.

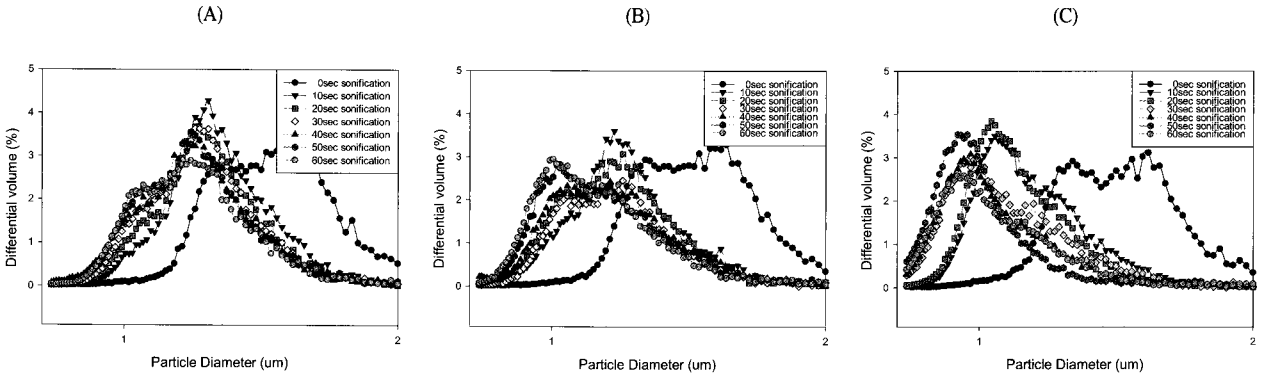

Figure 2. Differential volume of *Streptococcus epidermidis* according to the sonification with a probe of (A) 2 ㎜ depth (B) 9 ㎜ depth (C) 16 ㎜ depth.

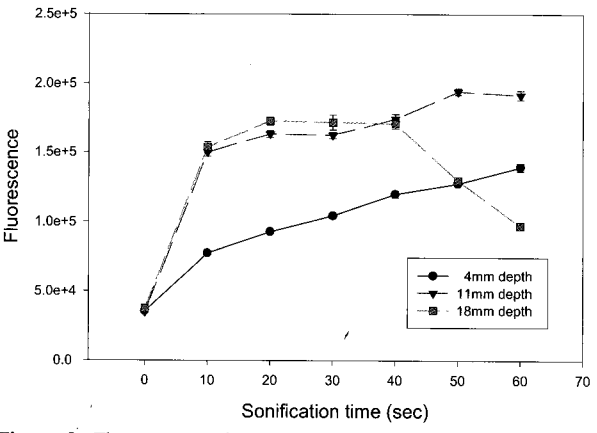

Figure 3. Fluorescence of *Bacillus globigii* according to the probe depth and the sonification time.

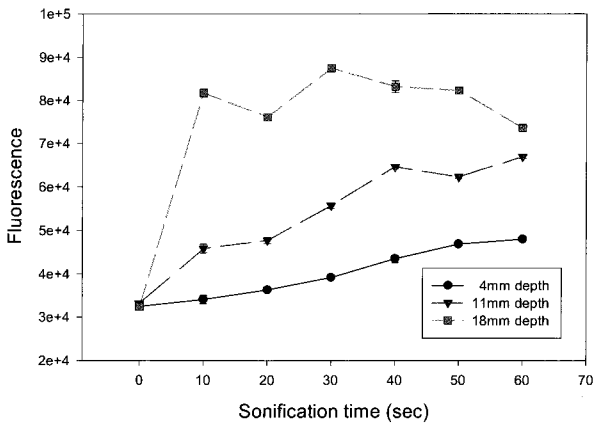

Figure 4. Fluorescence of *Streptococcus epidermidis* according to the probe depth and the sonification time.

disposable centrifuge tube에 주입하고 직경이 6 ㎜인 probe를 시료 표면에서 각각 4 ㎜, 11 ㎜, 18 ㎜ 잠기게 한 후 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification을 시킨 후 용액 중의 미생물 입자 부피의 변화와 DNA의 형광량 변화를 각각 3회, 6회 측정하여 평균하였다.

Sonificator probe 직경 및 처리시간

10^7 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 2 ㎖를 15 ㎖의 disposable centrifuge tube에 주입하고 직경이 2 ㎜, 6 ㎜, 13 ㎜ probe 별로 시료 표면에서 10 ㎜ 잠기게 한 후, 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시키고 시료 중의 미생물 입자의 부피와 DNA 형광량을 각각 3회, 6회 측정하여 평균하였다. Sonification 시킨 시료 100 ㎕를 3개로 분주하고 각각 colony counting 하고 평균하여 생균수를 측정하였으며, 미생물 농도(optical density)는 10^8 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 각각 2 ㎖를 직경이 2 ㎜, 6 ㎜, 13 ㎜ probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification을 2회 시킨 후 Spectrometer로 4회 측정하여 평균하였다.

형광시약 농도별 탐지농도

Sonification에 의한 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis*에 대한 최소탐지능을 알아보기 위하여 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 각각 2 ㎖를 15 ㎖의 disposable centrifuge tube에 주입하여 13 ㎜ probe를 사용하여 20 kHz에서 20초 동안 sonification하고, 형광시약 Sybrgreen의 농도를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 X가 되도록 첨가하고 DNA의 형광량을 각각 6회 측정하여 평균하였다.

결과 및 고찰

시료에 잠긴 Sonicator probe tip 깊이

Sonificator probe가 시료 용액에 잠긴 깊이에 따른 sonification 후의 *Bacillus globigii*의 입자 분포 변화를 Fig. 1에 그리고 형광량 변화를 Fig. 3에 나타내었고, *Streptococcus epidermidis*의 입자 분포 변화 결과를 Fig. 2에 그리고 형광량 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 4 ㎜ 깊이로 sonification한 *Bacillus globigii* 시료에 가해진 에너지는 각각 78 J, 156 J, 238 J, 291 J, 387 J, 443 J이었고, 11 ㎜ 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 118 J, 237 J, 347 J, 442 J, 580 J, 677 J이었으며, 18 ㎜ 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 212 J, 405 J, 648 J, 826 J, 986 J, 1088 J이었다. 용액 중의 *Bacillus globigii* 입자의 분포를 살펴보면 1.3 ㎛와 1.5 ㎛를 중심으로 하는 2개의 peak를 형성하며 큰 크기의 입자가 더 잘 파쇄되는 것으로 나타났으며, 시료에 잠긴 Sonificator probe tip의 깊이가 길수록 시료에 가해지는 에너지가 증가하며 파쇄 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

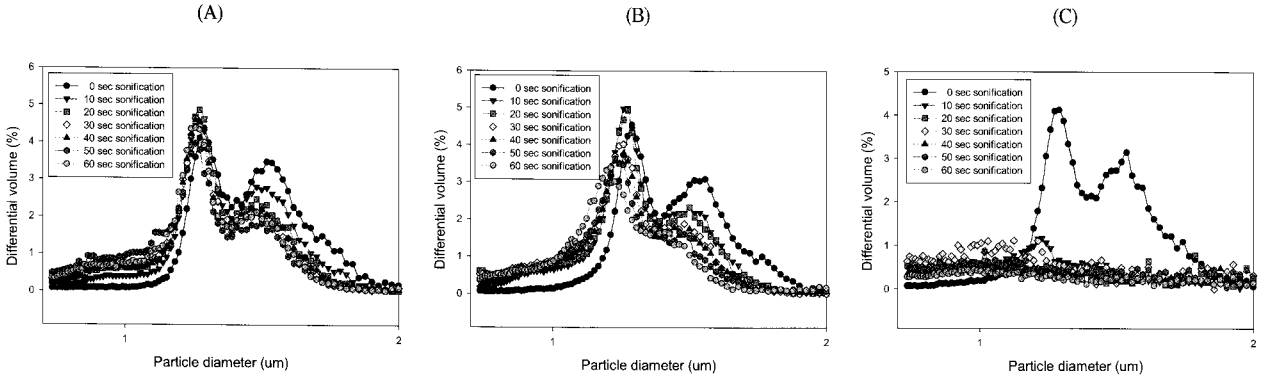

Figure 5. Differential volume of *Bacillus globigii* according to the sonification with (A) 2 ㎜ probe (B) 6 ㎜ probe (C) 13 ㎜ probe.

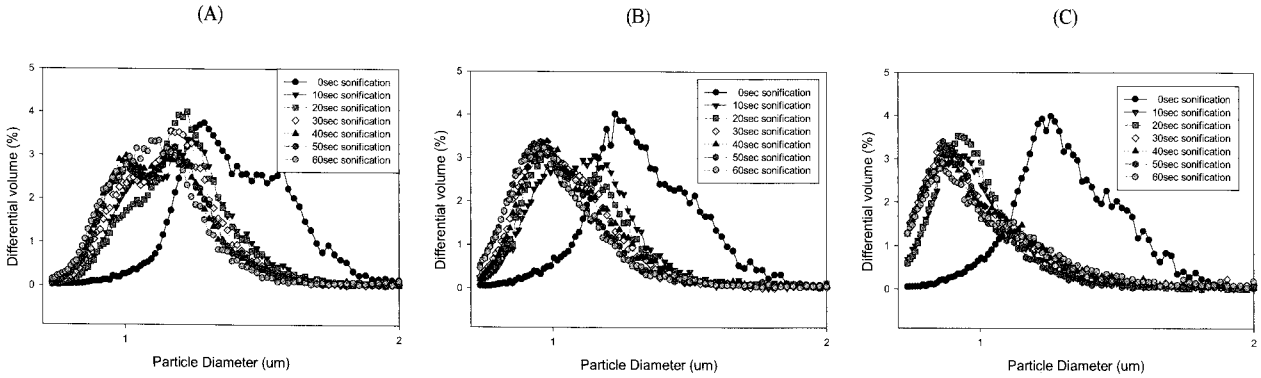

Figure 6. Differential volume of *Streptococcus epidermidis* according to the sonification with (A) 2 ㎜ probe (B) 6 ㎜ probe (C) 13 ㎜ probe.

10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 4 ㎜ 깊이로 sonification한 *Streptococcus epidermidis* 시료에 가해진 에너지는 각각 84 J, 181 J, 275 J, 342 J, 421 J, 474 J이었고, 11 ㎜ 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 90 J, 253 J, 366 J, 384 J, 451 J, 756 J이었으며, 18 ㎜ 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 239 J, 439 J, 615 J, 805 J, 945 J, 1063 J이었다. 용액 중의 *Streptococcus epidermidis* 입자는 *Bacillus globigii* 입자와는 달리 큰 입자들이 파쇄되어 작은 입자로 변화되는 것을 볼 수 있으며, 시료에 잠긴 Sonificator probe tip의 깊이가 길수록 입자 중심 peak의 크기가 더 작은 크기로 이동되어 파쇄 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

또한 *Bacillus globigii*에 대한 DNA 형광량의 변화를 보면 18 mm 깊이로 10초 동안 sonification한 경우 초기보다 형광량이 약 4배 증가하였고 40초 이후부터는 DNA의 열에 의한 denaturation으로 형광량이 감소하였으며 11 mm로 sonification한 경우도 잘 파쇄되는 것으로 나타난 반면, *Streptococcus epidermidis*는 초기보다 형광량이 약 3배 증가하고 깊이별로 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 따라서 구균이 간균보다 sonification에 더 강한 것으로 판단되며 시료에 잠긴 probe tip의 길이가 길수록 cell의 파쇄 효과가 큰 것으로 나타났다.

Sonificator probe 직경 및 처리시간

10^7 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 2 ㎖를 직경이 2 ㎜, 6 ㎜, 13 ㎜인 probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시킨 후 측정한 미생물 입자의 크기 분포를 각각 Fig. 5와 6에 나타내었다. 13 ㎜ probe로 10초간 sonification시킨 시료의 *Bacillus globigii*의 부피 분포 변화는 원액 대비 급격한 감소를 볼 수 있으며 *Streptococcus epidermidis*가 *Bacillus globigii*보다 sonification에 대해 훨씬 강한 것으로 나타났다.

10^7 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 2 ㎖를 직경이 2 ㎜, 6 ㎜, 13 ㎜인 probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시켜 측정한 형광량을 Fig. 7과 8에 나타내었다. 13 ㎜ probe로 sonification한 *Bacillus globigii*는 10초 후에 형광량이 약 5배 크게 상승하였으며 10초 이후에는 감소하는 경향을 보이가가 30초 이후에는 형광량이 급격히 감소되었다. 13 ㎜ probe로 sonification한 *Streptococcus epidermidis*은 20초 후에 형광량이 약 3.5배 크게 상승하였으며 20초 이후에는 *Bacillus globigii*보다는 형광량이 완만하게 감소되었는데, 이것은

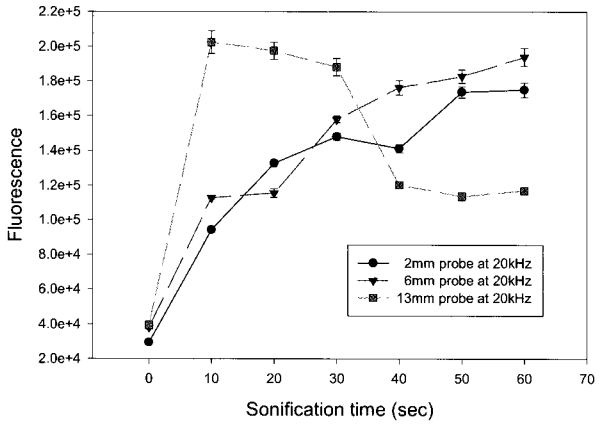

Figure 7. Fluorescence of *Bacillus globigii* according to the probe diameter and the sonification time.

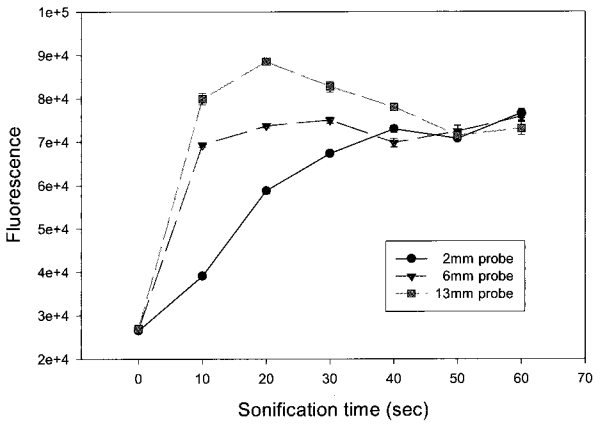

Figure 8. Fluorescence of *Streptococcus epidermidis* according to the probe diameter and the sonification time.

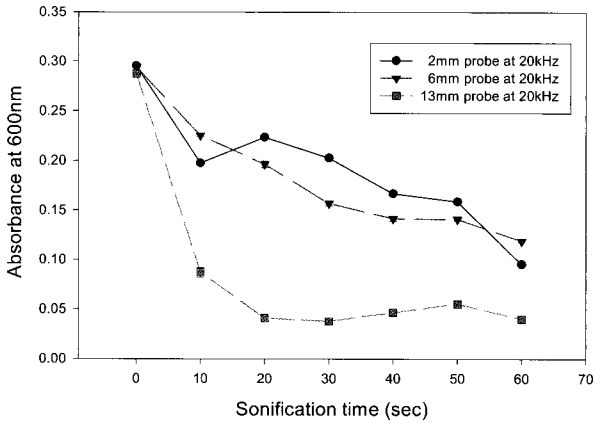

Figure 9. Absorbance of *Bacillus globigii* according to the probe diameter and the sonification time.

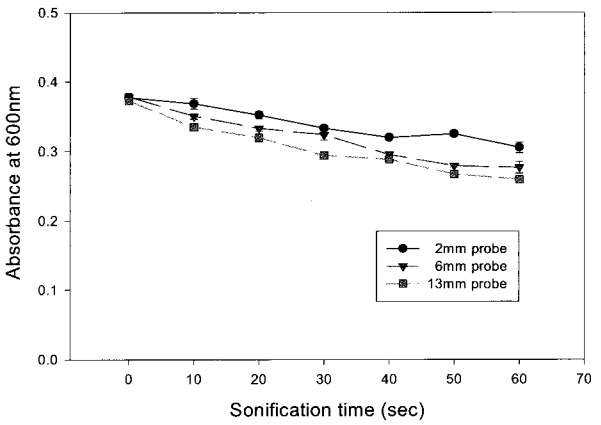

Figure 10. Absorbance of *Streptococcus epidermidis* according to the probe diameter and the sonification time.

sonification에 대하여 *Streptococcus epidermidis*가 더 강하다는 것을 의미한다.

10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification한 *Bacillus globigii*에 가해진 에너지는 2 ㎜ probe 경우 각각 75 J, 151 J, 191 J, 260 J, 347 J, 409 J이었고, 6 ㎜ probe 경우 각각 113 J, 218 J, 330 J, 482 J, 577 J, 663 J이었으며, 13 ㎜ probe 경우 각각 557 J, 976 J, 1235 J, 1354 J, 1351 J, 1602 J이었다. *Streptococcus epidermidis*에 가해진 에너지는 2 ㎜ probe 경우 각각 64 J, 130 J, 198 J, 264 J, 301 J, 352 J이었고, 6 ㎜ probe 경우 64 J, 223 J, 304 J, 401 J, 541 J, 629 J이었으며, 13 ㎜ probe 경우 각각 531 J, 992 J, 1272 J, 1447 J, 1561 J, 1664 J이었다 13 ㎜ probe로 10초 sonification한 시료에 가해진 에너지가 2㎜ probe로 60초 sonification한 시료보다도 높게 나타났으며 sonificator의 probe 직경이 클수록 파쇄 효과가 높은 것으로 나타났다.

10^8 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis* 2 ㎖를 직경이 2 ㎜, 6 ㎜, 13 ㎜인 probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시켜 측정한 흡광도와 생균수의 변화를 각각 Fig. 9, 10과 Fig. 11, 12에 나타내었다. Sonification 시간에 따른 *Bacillus globigii*의 흡광도 변화는 *Streptococcus epidermidis*보다 훨씬 크게 감소한 것으로 나타났으며, 흡광도의 변화 차이로도 구균이 간균보다 확실히 sonification에 강한 것을 알 수 있다. *Streptococcus epidermidis*의 생균수 변화는 *Bacillus globigii*와 차이를 보이지 않는 것으로 나타났는데, 이것은 sonification에 의해 파쇄는 되지 않더라도 생존에는 영향을 미치는 것으로 판단된다.

형광시약 농도별 탐지농도

sonification에 의한 형광시약 농도 별로 *Bacillus globigii*와 *Streptococcus epidermidis*에 대한 탐지능을 측정한 결과를 Fig. 13과 14에 나타냈다. 13 ㎜ probe로 20초 동안 sonification을 시켜도 형광시약 Sybrgreen의 농도 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 X 모두 10^5 CFU/㎖의 *Bacillus globigii*, 5 × 10^5 CFU/㎖의 *Streptococcus epidermidis*를 충분히 탐지 가능한 것으로 나타났으며, 10^8 CFU/㎖의 고농도 에서는 형광시약 Sybrgreen의 농도 0.75 X 이상이 적합한 것으로 나타났다.

요 약

본 연구에서는 sonificator를 장착하여 세포막을 파쇄하고

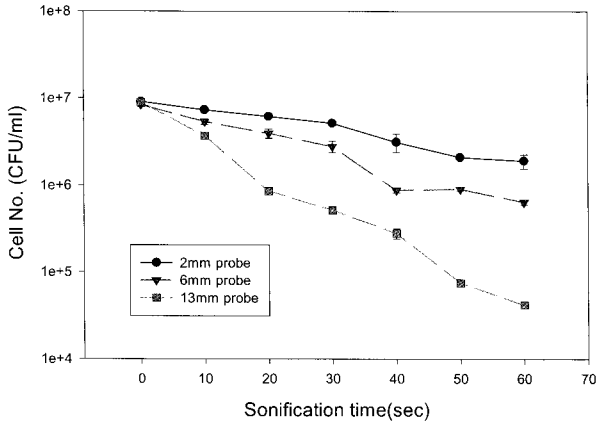

Figure 11. Live cell number of *Bacillus globigii* according to the probe diameter and the sonification time.

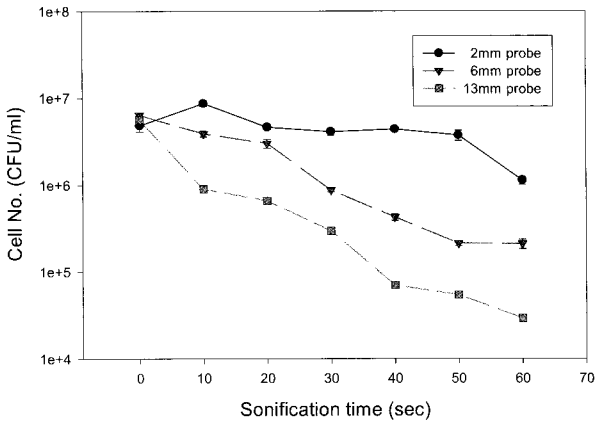

Figure 12. Live cell number of *Streptococcus epidermidis* according to the probe diameter and the sonification time.

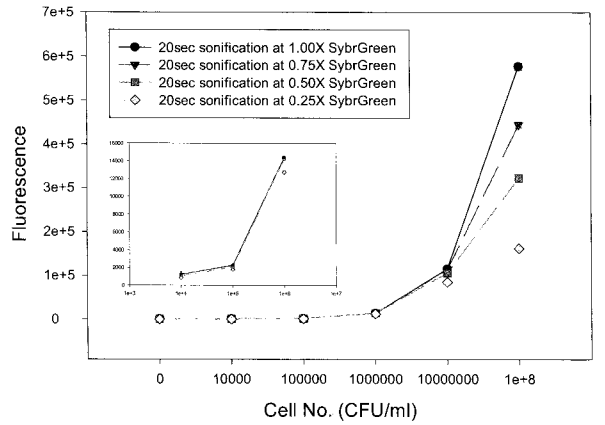

Figure 13. Detection profile of *Bacillus globigii* with the different fluorescent dye concentrations.

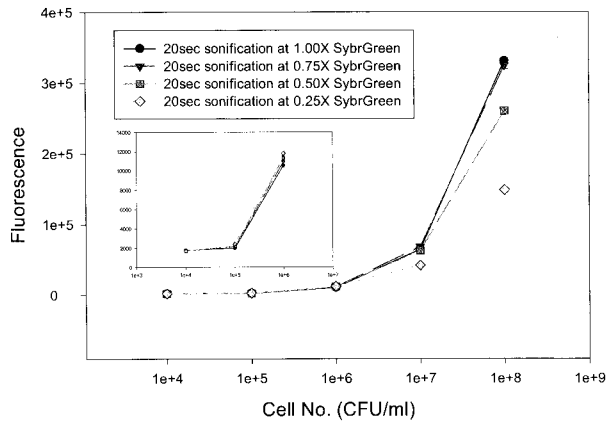

Figure 14. Detection profile of *Streptococcus epidermidis* with the different fluorescent dye concentrations.

현장에서 형광을 이용하여 조작이 간편하고 단시간에 DNA를 측정할 수 있는 자동화된 형광기를 개발하기 위하여 그람 양성균으로 간균인 *Bacillus globigii*와 구균인 *Streptococcus epidermidis*를 대상으로 최적의 세포 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

Sonificator probe 직경에 따라 세포의 파쇄 효과가 큰 차이를 보였으며 13 ㎜ probe로 20초동안 sonification시키는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났으며 간균인 *Bacillus globigii*가 구균인 *Streptococcus epidermidis*보다 더 파쇄가 잘 되는 것으로 나타났다. 시료에 잠긴 Sonificator probe tip 깊이에 따라서도 세포의 파쇄 효과가 크게 나타났는데 시료에 잠긴 probe tip의 깊이가 깊을수록 큰 파쇄 효과를 발휘하였다. 선정된 최적의 파쇄 조건에서 최저 탐지농도는 *Bacillus globigii*, *Streptococcus epidermidis* 모두 5×10^5 CFU/㎖의 농도를 탐지 가능한 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Borthwick, K. A. J., W. T. Coakley, M. B. McDonnell, and H. Nowotny (2005), Development of a novel compact sonicator for cell disruption, *J. Microbial. Methods* **60**, 207-216.
2. Belgrader, P., D. Hansford, G. T. A. Kovacs, K. Vanketeswaran, R. Mariell, F. Milanovich, S. Nasarabadi, M. Okuzumi, F. Pourahmadi, and M. A. Northrup (1999), A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis, *Anal. Chem.* **71**, 4232-4236.
3. Gannon, V. P. J, P. K. King, J. Y. Kim, and E. J. Thomas (1992), Rapid and sensitive method for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3809-3815.
4. Fykse, E. M., J. Stand, and G. S. Olsen (2003), Application of sonification to lease DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR, *J. Microbiol. Methods* **55**, 1-10.
5. Bury, D., P. Jelen, and M. Kalab (2001), Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling, *Innovative Food science & Emerging Technologies* **2**, 23-39.
6. Blechl, A. E., K. S. Thrasher, W. H. Vensel, and F. C. Greene (1992), Purification and characterization of wheat α-gliadin synthesized in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* **116**, 119-127.
7. James, C. J., W. T. Coakley, and D. E. Hughes (1972), Kinetics of protein release from yeast sonicated in batch and flow systems at 20kHz, *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 33-42.
8. Calderira, J. C. G. and J. M. S. Cabral (1994), Extraction of a steroid 1,2-dehydrogenase by sonification of *Arthrobacter simplex* cells, *Bioseparation* **4**, 271-278.
9. Kuboi, R., H. Umakoshi, N. Takagi, and I. Komasawa (1995), Optimal disruption methods for the selective recovery of β-galactosidase from *Escherichia coli*, *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 335-341.
10. Feliu, J. X., R. Cubarsi, and A. Villaverde (1998), Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells, *Biotechnology and Bioengineering* **58**(5), 536-540.
11. Ha Y. C., K. B. Choi, and J. D Choi (2006), The studies on the early detection of the gram positive bacteria using sonication and fluorescent dye in the field, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **100**, 341-346.