

## 다공성 매질 표면에서 박테리아의 거동: 확산의 영향

조명옥\* · 조지용\* · 박은정\* · 이동희\* · 이정훈\*\* · 김중경†

### Behavior of Bacteria on the Porous Substrates: Diffusion Effect

Myoung-Ock Cho, Jiyong Cho, Eun-Jung Park, Donghee Lee, Jeonghoon Lee and Jung Kyung Kim

**Abstract.** It has been found that the colony size of bacteria grown on an agar plate decreases with increasing agar gel concentration. Evidenc from recent studies suggests that the bacterial colony dynamics is closely related with the mechanical properties of the substrate. We investigate whether bacterial growth on the agar substrate is controlled mostly by the nutrients' diffusion which is hindered more in porous medium than in solution. The number of bacterial cells in single colonies is found to be inversely correlated with agar concentration. High-resolution live cell imaging at the single bacterium level confirms that the bacterial growth rate is reduced with increasing agar concentration. There is a strong correlation between the slowed diffusion and the reduced number of cells in a high concentration of agar medium.

**Key Words:** Bacteria(박테리아), Porous Substrate(다공성 기질), Colony(콜로니), Diffusion(확산), Stiffness(강성), Agar Gel(아가젤), Live Cell Imaging(세포 실시간 이미징)

#### 1. 서 론

박테리아, 곰팡이와 같은 미생물은 물이나 공기 중 에서 부유하다가 고체 표면에 부착되면 생물막이라고 부르는 군집을 이루어 자체적으로 생존하기에 적합한 환경을 유지하는 항상성을 가지게 된다. 냉난방 및 환 기를 위한 공조설비, 콘크리트 및 벽지와 같은 건축자 재뿐만 아니라 식품과 의료기기도 이러한 미생물 오염 에 항상 노출되어있다<sup>(1)</sup>. 현재 미생물 오염을 제어하기 위한 수단으로 다양한 물리, 화학적 방법이 알려져 있 으나 일단 표면에 형성된 생물막에 대해서는 그다지 효과적이지 않다. 따라서 최근에는 표면의 거칠기<sup>(2,3)</sup>, 자유에너지<sup>(3,4)</sup>, 강성<sup>(5)</sup>과 같은 표면의 기계적 성질에 영향을 받는 미생물의 부착과 증식과정의 변화에 초점 을 둔 연구가 시도되고 있다. 이러한 기초연구를 통해 미생물의 부착을 원천적으로 방지하거나 미생물의 초

기 성장을 방해하는 표면을 디자인할 수 있다면 앞서 언급한 각종 미생물 오염에 적극적으로 대처할 수 있 을 것이다.

본 논문에서는 박테리아가 부착된 후에 표면의 기계 적 특성이 박테리아 증식에 어떠한 영향을 미치는지 확 인하고자 일반적으로 박테리아 배양에 사용되는 기질 인 아가젤을 사용하였다. 다양한 아가 농도로 제작한 고체배지 표면에서 박테리아가 증식하여 콜로니를 형 성하는 과정을 실시간으로 관찰하였고, 일정한 시간 동 안 각 콜로니를 구성하는 박테리아 개체수의 변화를 측 정하였다. 또한 기질 특성의 변화가 미생물의 초기 분 열 과정에 미치는 영향을 단일 개체 수준에서 분석하 고자, 아가 농도가 다른 고체배지 표면에서 단일 박테 리아의 거동을 고배율 현미경으로 관찰하였다. 한편, 아가젤로 만들어진 고체배지와 같은 다공성 매질에서 영양분은 확산에 의해 전달되는데, 확산율이 고체배지 표면에서 박테리아의 증식 속도를 제한하는 한 요소가 될 수 있다<sup>(6)</sup>. 아가젤의 농도에 따라 고체배지에서 확 산율과 강성이 모두 변하게 되는데, 이 두 가지 물리적 성질 중에서 박테리아 증식을 지배하는 요소를 찾아보 고자 한다. 이를 위해 농도가 다른 아가젤에서 염료의

†국민대학교 기계자동차공학부  
E-mail : jkkim@kookmin.ac.kr

\*국민대학교 기계자동차공학부

\*\*서울대학교 나노입자제어기술 연구단

확산 현상 이미지를 통해 확산율을 비교하고 박테리아 증식율에 미치는 영향을 정량적으로 알아보았다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1 박테리아 콜로니 크기 측정

액체배지(TSB)에서 20시간 동안 배양한 *Escherichia coli*(E.coli)를  $1/3 \times 10^6 \sim 1/4 \times 10^6$ 로 희석하였다. E.coli를 1  $\mu$ l 접종했을 때 단일 콜로니가 생성되도록 최적화된 희석배수 실험을 미리 수행하였다. 아가 평판배지(TSA) 표면에 2 cm 간격으로 위치한 총 16개의 격자점에 희석한 균을 1  $\mu$ l씩 접종하였다. 박테리아 콜로니 크기 측정에 사용된 실험장치 모식도를 Fig. 1(a)에 나타내었다. 상판과 하판이 가열기로 구성된 배양접시 온도조절용 챔버를 자체 제작하여 배양접시에 담긴 아가 고체배지의 온도를 37°C로 일정하게 유지하였다. 증식하는 박테리아의 콜로니를 스테레오 현미경(SZ61, Olympus)으로 관찰하는 과정에서 상판에 붙어 있는 유리 관측창에 응결현상이 발생하지 않도록 상판 온도를 40°C로 설정하고, 고체배지가 건조해지지 않도록 배양접시 주위에 물을 넣어 챔버 내 습도를 조절하였다.

아가 농도가 0.5%, 1.5%, 2.5%인 각 고체배지 표면에서 성장하는 박테리아 콜로니의 이미지를 현미경에 장착된 CCD 카메라(A-621M, PixelINK)와 이미지 획득 S/W를 활용하여 10분 간격으로 얻었다. 이때 디지털 타이머(HR-PAG2, Herabell)로 현미경 광원이 일정한 시간 동안만 켜지도록 설정하여 콜로니를 촬영하였다. 저장된 이미지는 ImageJ S/W(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)로 분석하여 콜로니 지름을 측정하였다.

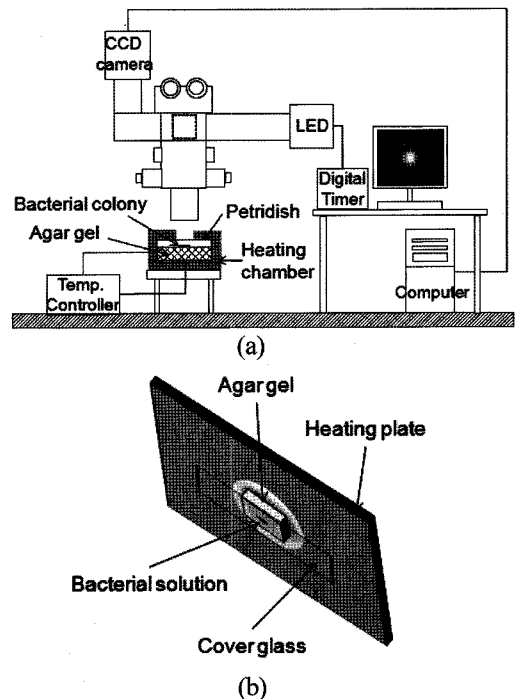
### 2.2 박테리아 생균수 측정

고체배지의 아가 농도에 따른 콜로니의 지름 변화가 콜로니를 구성하는 박테리아의 군집 형태에 기인하는 것인지 아니면 박테리아의 개체수 차이로 발생하는 것인지를 분석하였다. 액체배지에서 하루 동안(18~24시간) 배양된 E.coli를  $1/3 \times 10^6 \sim 1/4 \times 10^6$ 로 희석하였다. 아가 농도가 0.5%, 1.5%, 2.5%인 고체배지를 각각 10개씩 준비하여 4x4 격자점 형태로 1  $\mu$ l씩 접종하였다. 15시간 정도 배양하면 콜로니가 형성되는 것이 관찰되는데 이때부터 각 배지에서 콜로니를 하나씩 추출하고 광학밀도 측정기로 OD(optical density)값을 측정하였다.

각 농도별 아가 고체배지에서 추출한 콜로니 3개의 OD값을 측정하여 평균값을 취했으며, 남은 콜로니는 다시 배양하여 2-3시간 간격으로 OD값을 반복하여 측정하였다. 사전실험에서 얻은 OD값과 생균수의 관계그래프를 이용하여 E.coli의 생균수를 추정할 수 있었다.

### 2.3 단일 박테리아 증식 관찰

고체배지 표면에서 단일 박테리아가 증식하여 콜로니를 형성해가는 과정을 도입형 고배율 현미경(IX71, Olympus)으로 관찰하였다. 20시간 동안 배양한 후 1/100로 희석한 균을 2 cm $\times$ 2 cm 크기로 만든 고체배지에 1  $\mu$ l 접종하였다. 용액이 고체배지에 흡수된 후에 균을 접종한 표면이 유리 슬라이드와 접촉하도록 올려놓았다. Fig. 1(b)와 같이 고체배지 조각 위에 커버글라스를 덮고 배양온도 조절기의 상판을 올려놓아 박테리아가 증식할 수 있는 최적 온도로 유지하였다. 초기 박테리아 분열 과정을 40배 대물렌즈를 통해 관찰하고 저조도용 CCD 카메라(Dicam-Pro, Cooke)와 Camware



**Fig. 1.** (a) Imaging system for the measurement of the size of bacterial colony on agar plate. (b) Observation chamber for high-magnification imaging of the growth of single bacterial cell on agarose gel.

S/W를 사용하여 이미지를 획득하였다. 박테리아 분열 속도가 고체배지의 아가 농도에 따라 차이가 있는지 보기 위해 농도가 각각 0.5%와 2.5%인 고체배지를 제작하였고, 각 배지 위에서 증식하는 박테리아를 1분마다 촬영하였다.

**2.4 고체배지에서 확산을 측정**

아가 농도를 조절하여 강성이 0.5%, 1.5%, 2.5%인 고체배지를 만들었다. 배양온도 조절장치에서 고체배지 온도를 37°C로 유지하였다. 고체배지 중앙 부분에 원통형의 바늘을 꽂아 미세한 홈을 내고, 해밀턴 시린지를 이용하여 염료 1 µl를 주입하였다. 스테레오 현미경에 장착된 CCD 카메라로 2분 간격으로 촬영하였다. 얻어진 이미지를 ImageJ S/W로 분석하여 시간에 따른 염료의 농도 분포로부터 상대적인 확산속도를 추출하여 비교하였다.

**3. 결과 및 토의**

박테리아의 증식은 시간이 경과함에 따라 Fig. 2와 같은 변화를 거치는데, Fig. 3에 나타낸 박테리아 콜로니의 크기 변화도 유사한 양상을 나타낸다. 액체배지에서 증식하는 박테리아의 성장곡선은 지연기(lag phase), 지수성장기(exponential phase), 정상기(stationary phase), 사멸기(death phase)로 이루어지며, Fig. 2에 사멸기는 나타내지 않았다. Fig. 3(a)는 아가 농도가 다른 각 고체배지에 균을 접종한 후 10, 15, 20시간 동안 배양한 콜로니 사진을 나타낸다. 10분 간격으로 얻은 콜로니 이미지에서 측정된 콜로니 지름을 Fig. 3(b)에 나타내었다. 콜로니의 크기는 고체배지의 아가 농도가

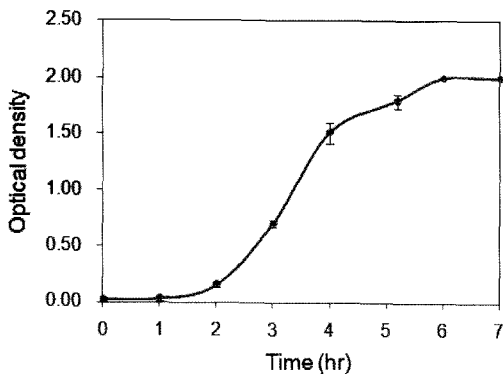


Fig. 2. Growth curve of *Escherichia coli* in liquid medium.

높을수록 감소한다. 아가 고체배지 표면에서 시간에 따른 박테리아 콜로니의 지름 변화 곡선은 지연기가 지난 후 시간  $t$ 에 비례하다가 어느 시점부터  $t^{1/2}$ 에 비례하여 증가한다. 아가 농도가 높을수록  $t^{1/2}$ 에 비례하는 시점이 앞당겨져서 콜로니 크기가 작아지는 결과를 초래한다고 해석할 수 있다.

아가 농도에 따라 달라지는 콜로니의 크기가 세포의 밀집도(density) 차이 때문인지 아니면 콜로니를 구성하는 박테리아 개체수의 차이 때문인지를 분석하고자 2.2절에서 기술한대로 콜로니를 이루는 생균수를 측정하였다. Fig. 4는 아가 농도가 다른 각 고체배지에서 형성된 콜로니를 구성하는 박테리아 개체수의 시간에 따른 변화를 나타낸다. 균 접종 후 동일한 시점에서 측정 한 콜로니의 박테리아 개체수는 고체배지의 아가 농도

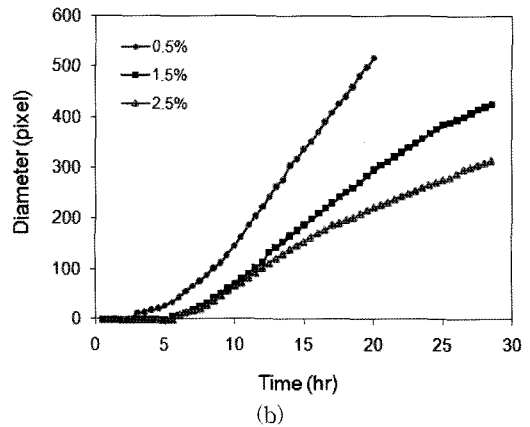
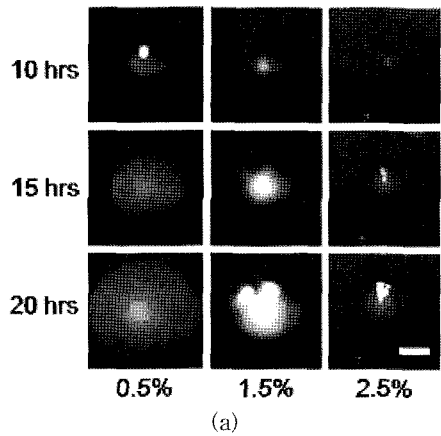
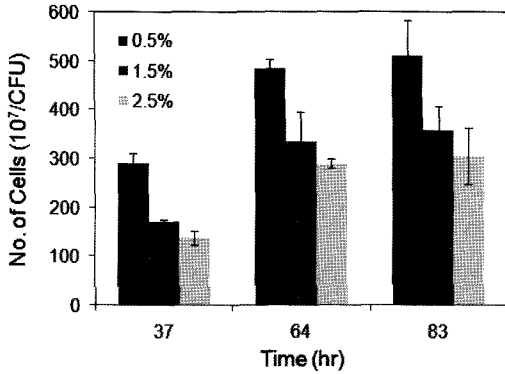


Fig. 3. (a) Images and (b) diameters of bacterial colonies grown on substrates with 0.5, 1.5 and 2.5% agar. Images shown in (a) were captured at 10, 15 and 20 hrs after inoculation. Scale bar = 2 mm

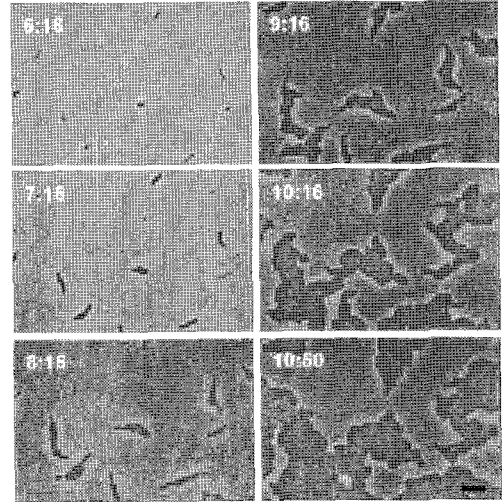


**Fig. 4.** Number of bacterial cells in single colonies grown on substrates with 0.5, 1.5 and 2% agar. Their differences are statistically significant. (1-way ANOVA,  $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0001$  (at 37hr), 0.0016 (at 64hr), 0.0139 (at 83hr).

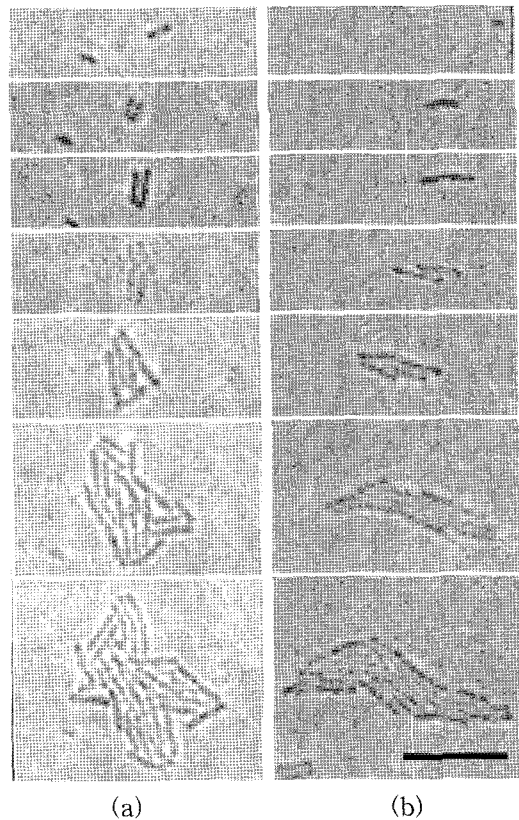
가 높을수록 감소하는 것을 알 수 있다.

따라서 위의 결과를 종합하면 고체배지에 접종된 박테리아가 일정시간 배양된 후 콜로니를 형성하는데, 그 크기는 아가 농도 증가에 따라 감소하고 박테리아 개체 수 역시 감소한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 고체배지 표면의 특성이 박테리아의 활동에 영향을 주는 것이라 생각되며 이와 같은 다공성 매질표면의 특성이 미치는 영향을 단일 박테리아 수준에서 살펴보았다.

우선 고체배지의 표면에서 단일 박테리아의 거동을 확인하였는데 Fig. 5는 접종된 단일 박테리아의 거동을 한 시간 간격으로 촬영한 것으로 단일 박테리아가 물질의 표면에서 군집을 이루어가는 과정을 상세하게 관찰할 수 있다. 또한 아가 농도가 단일 박테리아의 분열에 미치는 영향을 평가하기 위해 아가 농도가 다른 고체배지에서 같은 실험을 반복 수행하였다. Fig. 6은 아가 농도 0.5%와 2.5%인 고체배지에서 박테리아가 증식, 분열하는 과정을 촬영한 사진이다. 아가 농도 0.5%와 2.5%인 고체배지에서 박테리아의 분열 속도를 비교해보면 약간의 차이를 보였는데 0.5%의 배지 위에서 보다 빠르게 증식하는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 현상은 다공성 매질에서 물질의 확산을 차이에 기인할 수 있으므로 아가 젤에서 염료의 상대적인 확산속도를 측정하였다. Fig. 7은 세 가지 아가 농도에서 촬영한 염료의 확산 이미지로부터 추출한 정규화된 농도 프로파일의 반치폭(Full width at half maximum;



**Fig. 5.** Time-lapse bright field images of microcolonies formed from single bacterial cells on agar substrate. Scale bar = 10  $\mu$ m



**Fig. 6.** Comparison of growth rates of bacteria on substrates at (a) 0.5% and (b) 2.5% agar concentrations. Images were captured every 30 mins. Scale bar = 10  $\mu$ m

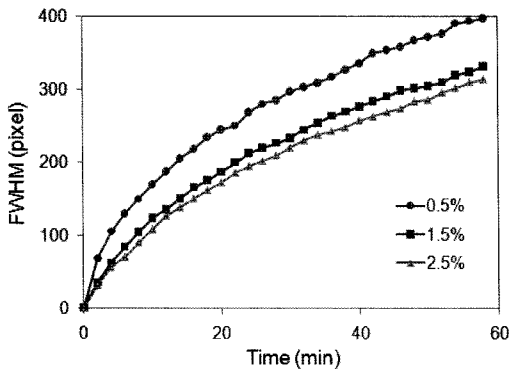


Fig. 7. Full width at half maximum (FWHM) measured for time-lapse images of dye dispersion in 0.5, 1.5, and 2.5% agar.

FWHM)의 시간에 따른 변화를 나타내며, 아가 농도가 높을수록 확산율이 감소하는 사실을 확인할 수 있다.

아가 젤과 같은 다공성 매질 위에서 박테리아 콜로니의 크기는 여러 가지 요소의 영향을 받아 변하게 된다. pH, 영양분 총량, 온습도가 동일한 상태에서는 영양분의 확산속도가 지배하는 박테리아 증식율과 배지 표면특성에 따른 박테리아 운동성의 변화가 주된 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그 중 확산에 의한 영향은 Fig. 3과 Fig. 7을 비교해 보았을 때 상당한 비중을 차지하는 것으로 보인다. 본 논문에 포함시키지는 않았지만 염료 확산실험에서 얻은 확산율을 고려하여 영양분의 양을 조절해서 배양한 결과 아가 농도가 다른 각 배지에서 콜로니의 크기를 비슷하게 형성시킬 수 있었다. 따라서 확산에 의한 영양분의 전달 속도가 아가 배지 위에서 박테리아의 증식패턴이나 분열속도를 결정하는 중요한 요소라고 판단된다.

한편 아가 배지의 기계적인 표면특성이 박테리아 운동성에 미치는 영향도 배제할 수는 없다. Steager<sup>(7)</sup>는 아가 고체배지에 형성된 박테리아 콜로니의 바깥쪽 경계영역에 존재하는 액체 분비물 속에서 박테리아 운동이 활발하게 일어난다는 사실을 정량적으로 관찰하였다. DiLuzio<sup>(8)</sup>는 박테리아가 아가 고체배지와 같은 다공성 매질 표면에서는 일반 유리 표면에서보다 더 빠른 속도로 운동한다는 사실을 관찰하였고, 이는 다공성 매질 표면에서 박테리아가 받는 유동저항이 감소하기 때문이라고 주장하였다. 따라서 이러한 선행연구에서 관찰된 표면특성과 박테리아의 운동성 사이의 연관성을 고려한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또

한 표면의 기하학적인 구조와 형상에 따라 군집을 형성한 박테리아는 주화성, 정족수 인식(quorum sensing) 등의 기작으로 인해 각 개체로 존재할 때에는 다른 특이한 거동을 보인다는 사실이 보고된 바 있으므로<sup>(9,10)</sup>, 보다 종합적인 관점에서 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통해 아가 젤로 구성된 다공성 기질의 물질 확산율이 아가 농도로 조절될 수 있음을 실험적으로 알게 되었으며, 영양분의 확산속도가 다공성 매질 표면에서 박테리아의 증식을 제한하는 주된 요소가 됨을 확인하였다. 본 연구진은 확산에 의한 원인 외에 박테리아가 부착되는 표면의 강성, 표면 거칠기 등의 기계적 성질이 각종 박테리아의 증식에 미치는 요인을 연구 중에 있다. 심도 있는 추가 연구를 통해 미생물의 부착과 증식을 제어할 수 있는 표면 디자인 기술을 개발하고자 한다.

#### 후 기

이 논문은 2008년도 국민대학교 교내연구비와 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원(KRF-2007-331-D00588)을 받아 수행된 연구임.

#### 참고문헌

- 1) Fux, C. A., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. and Costerton, J. W., 2003, "Bacterial Biofilms: A Diagnostic and Therapeutic Challenge," *Expert Rev. Anti-infect. Ther.*, Vol. 1(4), pp. 667-683.
- 2) Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L. Y., Wanner, O. and Harms, H., 2002, "Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion," *Biofouling*, Vol. 18(3), pp. 193-203.
- 3) Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. and Quirynen, M., 2006, "Effect of Material Characteristics and/or Surface Topography on Biofilm Development," *Clin. Oral Imp. Res.*, Vol. 17(Suppl. 2), pp. 68-81.
- 4) Satriano, C., Messina, G. M. L., Carnazza, S., Guglielmino, S. and Marletta, G., 2006, "Bacterial

- Adhesion onto Nanopatterned Polymer Surfaces," *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 26(5-7), pp. 942-946.
- 5) Lichter, J. A., Thompson, M. T., Delgadillo, M., Nishikawa, T., Rubner, M. F. and Van Vliet, K. J., 2008, "Substrata Mechanical Stiffness Can Regulate Adhesion of Viable Bacteria," *Biomacromolecules*, Vol. 9(6), pp. 1571-1578.
  - 6) Cooper, A. L., Dean, A. C. R., Hinshelwood, C., 1968, "Factors Affecting the Growth of Bacterial Colonies on Agar Plates," *Proc. R. Soc. B*, Vol. 171(1023), pp. 175-199.
  - 7) Steager, E. B., Kim, C.-B. and Kim M. J., 2008, "Dynamics of Pattern Formation in Bacterial Swarms," Vol. 20(7), pp. 073601-1-073601-5.
  - 8) DiLuzio, W. R., Turner, L., Mayer, M., Garstecki, P., Weibel, D. B., Berg, H. C. and Whitesides, G. M., 2005, "Escherichia Coli Swim on the Right-hand Side," *Nature*, Vol. 435(7045), pp. 1271-1274.
  - 9) Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Lin, H., Darnton, N. C., Stock, J. B., Silberzan, P. and Austin, R., 2003, "Influence of Topology on Bacterial Social Interaction," Vol. 100(24), pp. 13910-13915.
  - 10) Cho, H., Jönsson, H., Campbell, K., Melke, P., Williams, J. W., Jedynak, B., Stevens, A. M., Groisman, A. and Levchenko, A., 2007, "Self-organization in High-density Bacterial Colonies: Efficient Crowd Control," Vol. 5(11), pp. 2614-2623.