



THEME 01

BioMEMS 기술을 이용한 박테리아 바이오필름 연구

김 정 현 | 고려대학교 기계공학부 석사과정 | e-mail : coolkj37@gmail.com

김 한 신 | 고려대학교 건축사회환경공학부 박사과정 | e-mail : knnomaa@gmail.com

정 석 | 고려대학교 기계공학부 부교수 | e-mail : sidchung@korea.ac.kr

박 희 등 | 고려대학교 건축사회환경공학부 부교수 | e-mail : heedeung@korea.ac.kr

바이오필름은 미생물 즉 세균이 있는 모든 환경에서 관찰할 수 있다. 현재 거의 대부분의 산업에서 바이오필름에 대한 이해와 비용절감 및 기술고도화에 핵심적인 역할을 하는 경우가 점차 늘어나고 있다. 이 글은 바이오멤스(BioMEMS) 기술을 이용한 박테리아 바이오필름 연구들의 동향을 설명하고자 한다.

박테리아 바이오필름의 형성

바이오필름(Biofilm)은 미생물이 가혹한 환경조건에서 생존하기 위한 생활방식의 하나로 알려져 있다. 바이오필름은 다수의 미생물 군집들과 미생물의 산물로 형성되며, 특정한 구조를 유지하면서 고정된 표면에 부착된 상태를 의미 한다. 대부분의 미생물은 바이오필름 내에 군집의 형태로 존재하며, 자유롭게 부유하면서 살아가는 미생물은 드물다. 바이오필름은 물체의 표면에 강하게 부착되어 있어 제거가 어려우며, 미생물로 하여금 가혹한 환경조건(pH의 변화, 온도의 변화, 영양분의 고갈 등)과 항생제와 같은 물질들의 공격에 상대적으로 강한 저항력을 갖게 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 미생물들이 바이오필름을 형성할 경우 멸균, 소독을 통해 제거하기가 어렵다.

한 예를 들어, 특정 입자를 분리하는 분리막(membrane)의 경우 미생물에 의하여 바이오필름이 형성되면서, 그 기능을 잃어버리게 된다. 이렇게 분리막에 바이오필름이 형성되는 단계는 크게 다음과 같다. i) 부유상태의 미생물이 분리막 표면으로 이동하여 물리적, 화학적, 혹은 생물학적 요인들에 의해 표면에 고착

되는 단계, ii) 분리막 표면에 고착된 미생물이 2차원적으로 증식하는 단계, iii) 미생물이 3차원적으로 증식하면서 성장하는 단계, 그리고 iv) 특정한 요인들에 의해 미생물이 떨어져 나가는 단계. 이 때 부유상태를 유지하는 미생물들의 경우에는, 그 표면에 고분자 물질이 없기 때문에 비교적 세포의 원형을 유지하게 되지만, 바이오필름을 형성하는 미생물들은 EPS(Extracellular Polymeric Substance)라 불리는 개개의 미생물이 외부로 분비한 고분자 물질에 둘러싸인 채 분리막 표면에 고착되어 분포하게 된다. 이러한 바이오필름 내에는 EPS가 미생물 간의 그물막 구조를 형성하고 있는 것이 보고된 바 있다.

이러한 바이오필름의 형성 및 제거는 다양한 요인에 의하여 조절 된다고 알려져 있다. 이 중 정족수인식(Quorum sensing)은 가장 많이 알려진 바이오필름 형성 원인이다. 만일 정족수인식에 문제가 생길 경우, 즉 정족수인식 돌연변이 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 균주의 경우에는 야생형(wild type)에 비해 덜 단단한 바이오필름을 형성한다고 알려져 있으며, 이 외에도 적변세균(Serratiamarcescens) 균주를 포함한 다양한 균주의 바이오필름 성장과 구조에도

표 1 바이오멤스 기술을 이용한 바이오필름 연구 동향

바이오멤스 기술	연구 동향	참고문헌
미세유체 조절	유체흐름이 미생물 부착에 미치는 영향	Bahar O. 등, Fems Microbiology Letters, 2010, 312, (1), 33-39.
	전단응력이 바이오필름 형성에 미치는 영향	Park A. 등, Biochip Journal, 2011, 5, (3), 236-241.
	전단응력 분포에 따른 바이오필름 구조의 변화	Salek M. M. 등, Biofouling 2009, 25, (8), 711-725.
미세유체 구배 형성	바이오필름 주위의 미세유체 흐름과 항생물질 효과의 상관관계	Lee J. H. 등, Biomedical Microdevices, 2008, 10, (4), 489-498.
	화학물질의 농도구배에 따른 바이오필름 형성	Ahmed T. 등, Integrative Biology, 2010, 2, (11-12), 604-629.
High throughput 기술	산소 농도에 따른 바이오필름 형성	Skolimowski M. 등, Lab on a Chip, 2010, 10, (16), 2162-2169.
	특정 모양을 갖는 바이오필름 array	Eun Y. J. 등, Langmuir, 2009, 25, (8), 4643-4654.
	항생물질 농도 구배가 바이오필름에 미치는 영향에 대한 다량 분석	Kim J. 등, Lab on a Chip, 2012, 12, (6), 1157-1163.
실시간 관찰 기술	균일한 밀도를 갖는 바이오필름 array 개발	Sun P. 등, Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26, (5), 1993-1999.
	바이오필름 내부의 화학물질 변화를 관찰	Holman H. Y. N. 등, Analytical chemistry, 2009, 81, (20), 8564-8570.
생물학적 환경 모사 기술	바이오필름의 형성을 실시간으로 관찰	Meyer M. T. 등, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2011, 21, (5).
	치아와 유사한 환경에서 바이오필름 발달 연구	Shumi W. 등, Biochip Journal, 2010, 4, (4), 257-263.
	박테리아와 상피세포 공생배양을 통한 host-pathogen 관계 분석	Kim J. 등, Lab on a Chip, 2010, 10, (1), 43-50.
	3차원 조직 내에서 바이오필름 형성 연구	Lee J. H. 등, Tissue Engineering Part C-Methods, 2011, 17, (1), 39-48.

관여한다고 보고된 바 있다. 그 외에도 바이오필름 형성 초기에는 미생물의 편모(flagellum), 이동성(motility), 그리고 주화성(chemotaxis)이 중요한 요소 중 하나이며, 미생물 내에서 관련 유전자의 발현조절에는 인산 아세틸(acetyl-phosphate)과 같은 외부환경요인이 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 또한 미생물의 전자공여체, 탄소원, 전자수용체 등의 농도 역시 바이오필름 형성에 영향을 미친다. 이렇게 성장한 바이오필름은 특정 조건하에서 분산상태로 변하게 되는데, 이 과정에서도 바이오필름 형성과 마찬가지로 다양한 분자생물학적 요인이 작용한다. 특히 ArcA,

CRP, EtrA 등의 전사조절 단백질은 슈와넬라 오네이덴시스(*Shewanella oneidensis*) 균주의 바이오필름 탈착에 관여한다고 보고되고 있으며, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 경우 호박산염(succinate)과 글루타메이트(glutamate)가 바이오필름으로부터 미생물의 탈착을 촉발한다고 보고된 바 있다. 이와 같이 바이오필름의 형성과 탈착현상은 다양한 외부환경에 대한 미생물의 반응 과정에서 필요한 세포내부의 대사조절(metabolic control)을 통해 이루어진다.

이러한 바이오필름은 미생물 즉 세균이 있는 모든 환경에서 관찰할 수 있다. 상하수 처리, 수질 정화 등



국가기간산업에서부터 음료, 식품, 의료, 위생, 환경 등 거의 대부분의 산업에서 바이오필름에 대한 이해가 비용절감 및 기술고도화에 핵심적인 역할을 하는 경우가 점차 늘어나고 있다. 특히 의학, 생물학 분야에서 인체 곳곳에 존재하는 바이오필름의 질병에 대한 역할에 많은 연구가 진행되고 있다.

BioMEMS 기술을 이용한 바이오필름 연구 동향

최근 미세유체기술에 기반한 바이오멤스(BioMEMS) 기술은 세포 배양, 조직 배양 등의 분야에 활발하게 적용되고 있으며, 특히 환경, 에너지, 의료 등의 분야에 존재하는 다양한 미생물을 배양하고 분석하는 데에 활발하게 적용되고 있다. 이러한 기술들은 또한 미생물에 의한 바이오필름 연구에도 적용될 수 있는데, 미세유체 기술에 기반한 실험환경은 미생물에게 폐쇄계(closed system)를 제공하여, 바이오필름이 유기적으로 주위 환경과 정보를 주고 받으며 성장하게 만들 수 있기 때문이다. 시스템 안에서, 미세유체는 낮은 레이놀즈 수(Reynolds number)를 갖기 때문에 매우 안정적이고, 빠른 반응 시간을 갖는데, 이러한 특성은 화학 물질의 농도구배 형성에 유리하며, 미생물의 주화성을 연구하는 데 적합하다. 무엇보다도 미세유체 기술에 기반한 시스템은 배양액의 양, 미생물의 양, 사용되는 단백질 및 시약을 절약할 수 있고, 반응시간을 줄일 수 있으므로 다양한 조건의 실험을 한 번에 수행하거나, 한 번의 실험에서 다층적인 정보를 얻어내는 것도 가능하다. 최근 미세유체 시스템은 다양한 종류의 미생물이 상호작용하면서 형성하는 바이오필름의 실시간 분석에도 사용되어, 무척 흥미로운 결과를 보고한 바 있다. 이렇게 미세유체기술, 바이오멤스 기술은 바이오필름 형성에 미치는 주변환경의 영향, 박테리아 주화성 등을 평가 하는 연구에 적용되고 있으며, 환경, 의료 등 다양한 분야에서 고수율

(high throughput) 시스템, 하이컨텐츠(high contents) 시스템, 실시간 관찰 시스템, 생물학적 환경을 모사한 기술 등과 다양한 방식으로 통합되고 있다.

바이오필름 형성에 대한 유동 환경의 영향 분석

바이오멤스 기술을 이용하여 제작된 미세유체소자는 원하는 방향, 속도로 유체를 정밀하게 조절할 수 있기 때문에, 바이오필름의 미세환경을 정밀하게 조절하면서 연구할 수 있다. 미생물 주위의 유체 흐름이 바이오필름 형성 초기단계에서의 미생물의 표면 부착 능력에 미치는 영향을 확인한 연구가 있으며(Bahar O. 등, Fems Microbiology Letters, 2010, 312, (1), 33-39. 논문에서 인용), 바이오필름 주위의 미세유체가 형성하는 전단응력(shear stress)이 바이오필름 형성에 미치는 영향에 대한 연구 역시 활발하다. 특히 전단응력은 바이오필름 형성에 많은 영향을 미치는데, 초기에는 전단응력이 많은 영양분을 공급하면서 바이오필름 형성을 촉진시키지만, 형성 후에는 침식 등을 유발하여 부정적인 영향을 미치기도 한다.(Park A. 등, Biochip Journal, 2011, 5, (3), 236-241. 논문에서 인용)

흥미있는 현상은 바이오필름은 미생물을 보호하는 역할을 하므로, 전단응력 등의 외부자극이 있을 때 바이오필름의 형성이 더 활발하게 일어난다는 것이다(Salek M. M. 등, Biofouling, 2009, 25, (8), 711-725. 논문에서 인용). 바이오멤스를 이용하여 제작된 미세유체 시스템은 단순히 유체 흐름의 영향뿐 아니라, 유체 흐름 조건과 여러 항생물질 효과의 상관 관계를 분석할 수도 있다(Lee J. H. 등, Biomedical Micro devices, 2008, 10, (4), 489-498. 논문에서 인용). 특히 앞에서 언급한 대로, 미세유체시스템은 폐쇄계이므로, 바이오필름 형성이 개방계(open system)에서와는 다른데(Janakiraman V. 등, Annals of Biomedical Engineering, 2009, 37, (6), 1206-1216. 논문으로 인용), 바이오필름 형성 자체가 주위의 미세유체 흐름에

영향을 끼치게 되고, 그 결과가 다시 미생물에게 영향을 주기 때문이다. 이러한 상호 연결된 형성 과정은 미세유체기술이 없다면 연구되기 어렵다.

미세유체 구배 형성 및 박테리아 주화성 평가

미세유체 기술은 실험 환경 내에 특정한 형태의 농도 구배(chemical gradient)를 아주 쉽게 형성할 수 있으며, 이러한 여러 화학물질의 농도 구배는 미생물의 주화성 연구를 수행하는 데 알맞은 환경을 제공한다. 이 때, 미생물의 주화성은 미생물이 표면에 부착할 수 있는 능력을 조절하여, 결과적으로 바이오필름 형성 초기 단계에 큰 영향을 미치므로, 바이오필름을 이해하는 데 있어 반드시 필요하다. 미세유체시스템 중 T-센서 시스템이 미생물의 주화성을 분석하는 데 사용된 바 있는데(Mao H. B. 등, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100, (9), 5449-5454. 논문에서 인용), 연구자들은 미세 유체 채널의 구조를 조절함으로써 다양한 농도 구배에 따른 미생물의 반응을 살펴 볼 수 있었다(Ahmed T. 등, Integrative Biology, 2010, 2, (11-12), 604-629. 논문에서 인용). 또한 다공성 재료를 사용하여 일정한 산소 농도 구배를 마이크로 채널 내에 형성하고, 그에 따른 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 균주의 부착 정도를 평가하기도 하였다(Skolimowski M. 등, Lab on a Chip, 2010, 10, (16), 2162-2169. 논문에서 인용). 흥미로운 사실은 산소 농도가 높은 곳에서 박테리아의 부착이 더 활발하게 일어나며, 이는 결과적으로 더 많은 바이오 필름 형성을 유발한다는 것이다. 이처럼 바이오멤스를 이용한 박테리아 주화성 평가는 바이오필름을 이해하고 분석하는 데 있어서 중요한 역할을 하고 있다.

고수율 기술

바이오멤스를 이용하여 제작된 미세유체소자는 그

크기가 매우 작기 때문에, 한 번에 여러 가지 조건으로 실험을 수행할 수 있어서, 고수율 연구에 가장 적합한 시스템이다. 바이오필름 연구에도 이러한 장점을 활용한 다양한 고수율 시스템이 소개된 바 있다. 특정 형태를 갖는 얇은 폴리머(polymer) 스텐실(stencil)을 사용하면, 미생물의 선택적 부착을 유발하여 원하는 모양의 바이오 필름을 형성할 수 있는데(Eun Y. J. 등, Langmuir 2009, 25, (8), 4643-4654. 논문에서 인용), 이를 기존의 미세유체 시스템과 결합하여, 유체 흐름의 효과 또는 항생물질의 효과를 분석하는 연구에 사용하기도 하였다. 또한 미세유체 채널 자체를 배열로 만들어, 특정 항생물질의 농도 구배하에서 바이오필름 형성 정도를 평가한 연구도 있다(Kim J. 등, Lab on a Chip, 2012, 12, (6), 1157-1163. 논문에서 인용). 최근에는 미생물 양을 최대한 일정하게 유지하는 바이오필름 배열을 만들기 위한 연구가 계속되고 있다. 초기의 미생물 양을 정밀하게 조절한다면, 바이오필름 배열을 또한 정밀하게 조절할 수 있으며(Sun P. 등, Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26, (5), 1993-1999. 논문에서 인용), 이를 이용하여 고속 스크리닝이 가능하다. 하지만 아직도 완전히 균일한 바이오필름을 갖는 고수율 시스템은 완성되지 않았는데, 미생물에 의한 바이오필름 형성은 주위환경에 예민하게 영향을 받고, 그 번식속도가 무척 빠르기 때문에, 바이오필름을 완전히 균일하게 만드는 것은 무척 어렵다.

실시간 관찰 기술

기존의 존재하던 정량화 시스템과 결합하여, 바이오멤스 기술은 바이오필름을 실시간으로 관찰하고 분석하는 것을 가능하게 하였다. SR-FTIR spectroscopy를 미세유체채널과 통합하여 직접적으로 바이오필름 내의 화학물질의 변화를 관찰하는 연구가 진행되었으며(Holman H. Y. N. 등, Analytical chemistry, 2009, 81, (20), 8564-8570. 논문에서 인용),



또한 광학, 형광 현미경 위에 미세유체 장치를 설치하여, 실시간으로 바이오필름 형성 과정을 관찰하는 것이 가능해졌다(Meyer M. T. 등, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2011, 21, (5). 논문에서 인용). 현미경과의 결합뿐 아니라, 미세유체소자 내에 트랜스듀서를 삽입하여 바이오필름 형성에 따른 저항 변화를 실시간으로 분석한 연구도 보고 되었다(Richter L. 등, Lab on a Chip, 2007, 7, (12), 1723-1731. 논문에서 인용). 이러한 시도들은 무척 간단한 미세유체소자를 가지고도 미생물의 바이오필름 형성 과정을 실시간으로 연구할 수 있도록 하였으며, 결과적으로 바이오필름 형성에 대한 풍성한 지식을 던져 주었다. 따라서 더 발전된 미세유체 시스템을 실시간 관찰 시스템과 결합하면, 바이오필름의 다양한 특성들을 보다 정밀하게 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

생물학적 환경 모사

인체 내에 존재하는 미생물들은 살아남기 위해, 인체 내의 여러 가지 환경에 대응하면서 바이오필름을 형성하고, 또한 인체 내 주변환경과 다양한 방식으로 상호작용한다. 이러한 과정에 대한 이해는 치료가 어려운 다양한 질병을 치료하는 데에 중요한 아이디어를 제공할 수 있다. 바이오멤스 기술은 인체 내 다양한 생물학적 환경을 모사한 인비트로(in vitro) 시스템 제작을 가능하게 해준다. 한 예로, 글라스비드(glass bead)를 이용하여 치아의 형태를 모사하여, 치아 위에서 바이오필름 형성과정을 연구한 결과가 보고 되었다(Shumi W. 등, Biochip Journal, 2010, 4, (4), 257-263. 논문에서 인용). 다른 예로 위장관 안에는 상피세포 조직과 비병원성 바이오필름이 공존하는데, 이

때 병원성 박테리아의 침입은 이러한 공생관계에 혼란을 주어서 미생물이 전체적으로 병원성을 갖도록 한다. 공기압식 밸브(Pneumatic valve)와 바이오멤스 기술을 이용하면, 하나의 디바이스 안에서 앞에 언급한 여러 종류의 조직과 다양한 환경을 공동 배양하고 원하는 시기에 서로 접촉 하도록 할 수 있다(Kim J. 등, Lab on a Chip, 2010, 10, (1), 43-50. 논문에서 인용). 최근에는 미세유체 시스템을 활용하여 바이오필름 형성을 3차원으로 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 기존의 2차원의 well plate 기술을 넘어서 3차원 배양 환경하에서 골아세포(osteoblast)와 표피포도균(Staphylococcus epidermidis) 균주의 바이오필름 형성 상관관계 분석을 통해 인공관절 등을 삽입할 때 일어나는 감염과정을 연구한 결과가 보고된 바 있다.(Lee J. H. 등, Tissue Engineering Part C-Methods, 2011, 17, (1), 39-48. 논문에서 인용)

앞에서 설명한 대로 바이오멤스 기술은 미세 환경에서 미생물이 바이오필름을 형성할 때 미치는 유체의 영향, 물리적 환경, 화학적 환경의 영향을 분석하고, 농도, 온도, 습도, 산소 등의 다양한 구배가 바이오필름에 미치는 영향에 대한 새로운 지식을 전해주고 있다. 나아가 고수율시스템, 실시간 관찰 시스템, 생물학적 환경을 모사한 실험 환경 구축을 통해, 더 복잡하고 어려운 실험이 가능하다. 이로써 기존에 관찰하지 못했던 바이오필름에 영향을 미치는 다양한 환경적 요소들을 종합적으로 파악하고 비교하여, 그것들의 상관관계를 밝힐 수 있을 것이다. 이와 같이 바이오멤스 미세유체 기술은 바이오필름 연구에 많은 기여를 할 것으로 보이며, 의료, 환경, 산업, 보건 등 다양한 분야에 성공적으로 적용될 수 있을 것이다.