

총 설

생물막 모델 시스템

김수경 · 이준희*

부산대학교 약학대학 약학과

Biofilm modeling systems

Soo-Kyoung Kim and Joon-Hee Lee*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 49241, Republic of Korea

(Received May 9, 2016; Revised June 1, 2016; Accepted June 1, 2016)

ABSTRACT: Biofilms are considered a complexly structured community of microorganisms derived from their attached growth to abiotic and biotic surfaces. In human life, they mediate serious infections and cause many problems in civil and industrial facilities. While it is of huge interest for scientists to understand biofilms, it has been very hard to directly analyze the various biofilms in nature. A variety of biofilm models have been suggested for laboratory-scale biofilm formation and many methods based on these models are widely used for the biofilm researches. These biofilm models mimic characteristics of environmental biofilms with different advantages and disadvantages. In this review, we will introduce these currently used biofilm model systems and explain their relative merits.

Key words: batch culture, biofilm, biofilm model, Confocal Laser Scanning Microscope, continuous culture, flow cell, shear force

생물막(biofilm)은 미생물이 스스로 분비한 다량체 기질(polymeric matrix) 속에 형성된 미생물들의 3차원적 구조물로써, 일반적으로 고체 표면 위에 막 형태로 형성된다. 미생물들의 생물막 형성은 미생물들이 보여주는 사회적 집단 행동(social group behavior)의 좋은 예이기 때문에 학문적으로도 좋은 연구 대상일 뿐만 아니라, 인체 감염과 산업 시설 및 환경 관리 등 실용적인 측면에서도 매우 중요하게 다루어진다. 실제로 미생물에 의한 생물막은 거의 모든 종류의 고체 표면과 살아있는 생물의 조직에서 형성될 수 있기 때문에, 감염 과정에서 병원균은 숙주의 상피세포, 뼈, 치아, 혈관내벽 등을 비롯해 카테터(catheter), 각종 삽입 보형물(implant), 인공장기 같은 의, 치과 의료기구에도 생물막을 형성할 수 있고(Fux *et al.*, 2005), 수도관, 하수관, 정수기, 공기 정화시설 등 미생물이 접근할 수 있는 모든 종류의 인공 시설물에도 생물막이 형성된다. 이렇게 형성된 생물막은 감염의 만성화와 여러 시설물들의 부식 및 기능저하를 유발하기 때문에, 생물막은 미생물학 뿐만 아니라, 의학, 치의학, 약학 등을 비롯해 토목, 건축, 도시, 환경 공학 등 광범위한 분야에서 높은 관심을 받고 있으며, 생

물막의 형성, 발달, 이산 등과 관련된 일련의 과정을 이해하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

생물막은 미생물 종과 환경 요건에 따라 다양한 형태와 특징을 가진다. 그런데 생물막은 종종 접근하기 어려운 장소에 형성되며, 육안으로 관찰하기 어려운 형태와 크기를 가지고 있고, 형성되는 환경이 매우 다양하기 때문에, 이를 직접 관찰하고 연구하기는 극히 어렵다. 따라서 실험실에서 환경을 통제, 조절하면서 재현이 가능한 상태로 연구하기 위해서는 자연계 생물막을 모사할 수 있는 생물막 모델 시스템이 필요하다. 지금까지 여러 연구자들에 의해 다양한 생물막 모델 시스템이 개발되어 왔으며, 이를 관찰, 정량, 분석할 수 있는 기법들도 함께 개량되어왔다. 본 글에서는 이러한 생물막 모델 시스템들에 대해 알아보려고 한다.

생물막 형성을 모델링하기 위한 요건

생물막 연구를 위해 사용되는 생물막 모델링 시스템은 크게 생물막을 형성시키는 부분과 형성된 생물막을 관찰, 정량, 분석하는 부분으로 나누어 볼 수 있다. 여러 다양한 형태의 생

*For correspondence. E-mail: joonhee@pusan.ac.kr;
Tel.: +82-51-510-2821; Fax: +82-51-513-6754

물막 형성 시스템들이 개발, 시도되어 왔고, 그들의 구조나 원리에 차이가 있으나, 첫 번째 생물막 모델 시스템의 생물막 형성 부분에서는 다음과 같은 요건들이 중요하게 고려되어야 한다.

기층(substratum) 혹은 표면(surface)

생물막은 미생물들이 표면에 부착 성장하여 형성하는 구조물이기 때문에 생물막 모델 시스템에서는 반드시 미생물이 부착 성장할 기층(substratum)으로써의 표면이 제공되어야 한다. 이 표면의 재질, 구조, 성질은 생물막 형성을 좌우하는 중요한 요건이기 때문에 생물막 모델에서는 이를 무엇으로 어떻게 제공할 것인지 고려해야 한다. 예를 들어 미생물의 군집화 정도는 표면의 거친 정도에 따라 달라진다. 또한 표면 재질에 따라 아래에서 설명할 전단력(shear force)도 달라지기 때문에, 기층 표면의 물리 화학적 특성은 미생물의 부착 정도와 생물막 형성 속도에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 생물막 형성 모델에 따라 한 종류의 표면이 제공되기도 하고, 여러 개의 다른 재질이 동시에 제공될 수도 있다. 일반적으로는 고체 표면이 사용되지만, 액체 표면에 펠리클(pellicle) 형태로 형성되는 생물막을 연구할 때에는 액체 표면이 사용될 수도 있다.

매질(medium)

생물막이 존재하는 환경이다. 보통 고체 표면이 기층으로 제공되는 경우 매질은 대개 물을 기반으로 하는 액체가 되지만, 콜로니 생물막(colony biofilm) 모델과 같은 일부 시스템에서는 공기가 되기도 하며, 액체를 표면으로 제공하는 펠리클 생물막(pellicle biofilm)의 경우에도 공기가 생물막이 존재하는 매질이 된다. 사실 생물막은 액체, 기체, 고체 각 상의 계면(interface)에 형성이 되는 미생물의 구조체라고 할 수 있는데, 이들 중 고체 표면을 기층으로 하여 액체 매질을 가지는 고체-액체 계면(solid-liquid interface)이 미생물이 부착되어 성장하는데 가장 일반적인 환경이라고 생각된다. 따라서 생물막 연구는 주로 고체-액체 계면에서 이루어 졌으며, 대부분의 생물막 모델 시스템이 이 환경을 모사하고 있다. 액체-기체 계면 혹은 고체-기체 계면에 형성되는 생물막을 모사하는 모델 시스템은 아직 많지 않으며, 사실 이것이 연구를 제한하고 있는 중요한 이유이다. 최근에는 생체내 점액질층 내에서 형성되는 생물막을 모사하기 위해 매질로 겔(gel)을 사용하는 문헌 생물막(embedded biofilm) 모델이 제시되기도 하였는데(Jung *et al.*, 2015), 이때는 겔이 매질이면서 동시에 기층 역할을 하는 다소 독특한 모델 시스템이다. 보통 매질을 통해 생물막의 성

장을 위해 필요한 영양성분이 공급되지만, 공기를 매질로 할 경우 양분은 기층으로부터 제공될 수도 있다. 콜로니 생물막과 펠리클 생물막 모델이 이에 해당된다. pH, 영양 상태, 염과 이온 농도 등 매질의 특징들은 미생물이 기층에 부착되는 능력에 영향을 미친다는 것이 알려져 있다.

배양 방식(culture design)

생물막 배양을 위한 양분의 조성은 실험의 필요에 따라 달리 적용될 수 있다. 생물막 배양 방식은 일반 미생물 배양에서 처럼 처음 주어진 양분 속에서 배양하는 회분 배양(batch culture), 계속 양분을 추가하는 유가 배양(fed-batch culture), 연속적으로 양분을 공급하면서 동시에 생성물을 회석하는 연속 배양(continuous culture) 방법들이 적용될 수 있다. 이러한 배양 방식에 따라 생물막 모델 시스템의 구조가 크게 달라지게 되며, 보통 회분 배양의 경우 닫힌 시스템(closed system), 연속 배양의 경우 열린 시스템(open system)이 된다.

전단력(shear force)

전단력의 유무 혹은 강도는 생물막 형성에 매우 중요한 환경 요건이며, 생물막 구조를 결정하는 핵심 요인 중의 하나로 여겨진다. 실제로 생물막의 두께와 밀도가 전단력에 따라 증가한다는 사실이 밝혀져 있다(Vieira *et al.*, 1993; Van Loosdrecht *et al.*, 1995; Kwok *et al.*, 1998). 따라서 전단력을 제공하는 방식은 생물막 모델에서 매우 중요한 요건이며, 보통 매질을 통해 전단력을 부여한다. 이 경우 한 방향 흐름(flow), 회전(rotation), 좌우 요동(rocking) 혹은 난류(turbulence) 등의 방식으로 전단력을 부여할 수 있는데, 일반적으로 많이 쓰이는 것은 흐름과 회전이다. 회전의 경우는 매질 대신 매질 속에서 표면을 회전시켜 구현하기도 한다. 이러한 전단력의 유무에 따라 동적 상태(dynamic state) 혹은 정지 상태(static state)에서 형성된 생물막이라 표현한다.

분석(analysis)

일단 생물막이 형성되고 나면 어떤 방법으로 이를 분석할 것인가에 따라 시스템의 구조가 달라지게 된다. 보통 광학 현미경으로 생물막의 형태를 실시간으로 관찰하려는 목적으로 시스템을 사용할 경우 관찰면을 광학적으로 투명한 재질로 덮게 된다.

지금까지 많은 생물막 모델 시스템들이 개발되어 여러 연구실에서 사용되고 있다. 이 시스템들은 위의 요건들에 비추어 각기 나름대로의 특징과 장단점들을 가지고 있고, 이에 따

라 각 모델 시스템에서 형성되는 생물막들은 고유한 구조와 특징을 갖기 때문에, 이를 잘 고려하여 연구자들은 자신들이 연구하고자 하는 생물막의 실제 형성 환경을 적절히 모사하는 모델 시스템을 선택하여야 한다. Table 1에는 위의 요건들이 현재 연구실에서 일반적으로 많이 쓰이는 생물막 형성 모델들에 어떻게 적용되는지 요약되어 있으며, 이해를 돕기 위하여 아래에 상술할 생물막 모델 시스템의 이미지를 Fig. 1에 첨부하였다.

생물막 형성 시스템

전체 생물막 모델 시스템에서 실제 미생물이 자라서 생물

막이 형성되는 부분을 reactor라고 하는데, 이는 일반적으로 발효학에서 미생물 배양조를 일컫는 용어이다. 현재 사용되는 생물막 모델에서 reactor의 구성과 구조는 흐름(flow)가 있는 동적 상태(dynamic state)에서 생물막을 형성시키느냐 아니면 흐름이 없는 정지 상태(static state)에서 생물막을 형성시키느냐에 따라 크게 달라지게 된다. 이는 매질의 흐름이 생물막 형성에 있어 전단력과 배양 방식을 동시에 결정해 줄 수 있기 때문이다.

정지 생물막(static biofilm) 형성 시스템

흐름이 없는 생물막 형성 모델들에서는 전단력이 없는 상태에서 생물막이 형성된다. 이러한 정지 생물막 형성의 경우

Table 1. Requirements for modeling biofilms

Substratum	Solid	• Most
	Gel	• Embedded biofilm
	Liquid	• Pellicle biofilm on liquid
Medium	Liquid	• Flow cell • Drip flow • CDC reactor • Static biofilm in microtiter plate • MBEC assay
	Air	• Colony biofilm • Pellicle biofilm on liquid
	Gel	• Embedded biofilm
Culture design	Batch	• Static biofilm in microtiter plate • Microfluidic • MBEC assay
	Fed-batch	• Embedded biofilm • Colony biofilm
	Continuous	• Flow cell • Drip flow • CDC reactor/ Rotating disc reactor/ Annular reactor
Shear force	Presence	• Flow cell • Drip flow • CDC reactor/ Rotating disc reactor/ Annular reactor
	Absence	• Colony biofilm • Static biofilm in microtiter plate • Pellicle biofilm on liquid surface • Embedded biofilm • MBEC assay
Analysis	Microscopy	• Flow cell • Drip flow • Embedded biofilm • Microfluidic • CDC reactor/ Rotating disc reactor/ Annular reactor
	Cell number counting	• MBEC assay
	Staining or spectrophotometric detection	• Static biofilm in microtiter plate • Colony biofilm

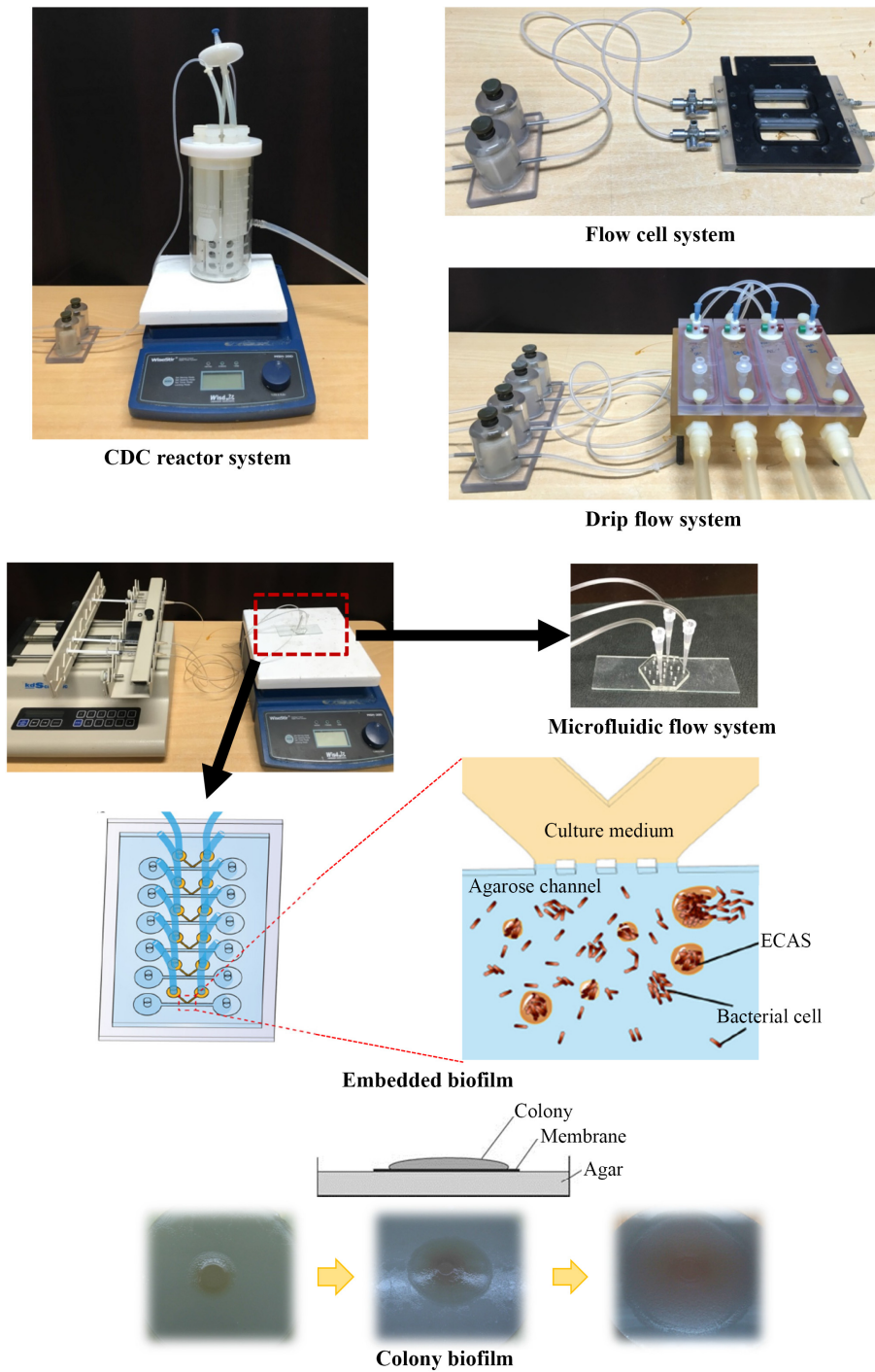


Fig. 1. Biofilm model systems.

회분 배양 방식을 취해야 한다. 연속 배양의 경우 대부분 매질의 흐름이 발생하기 때문에 아주 특수한 조건을 만들지 않는 한 동적 상태에서 생물막이 형성되게 된다. 회분 배양 방식에서는 처음 매질에 주어진 영양분만 사용되지만, 일부 특수한

모델 시스템에서는 유가 배양에 더 가까운 방식으로 생물막이 형성된다. 아래에서 설명할 콜로니 생물막(colony biofilm)과 매립 생물막(embedded biofilm) 같은 경우가 그 예이다. 이 경우는 영양분이 계속 보충 공급될 수 있다.

Static biofilm in microtiter plate : Microtiter plate에서 정지 상태로 생물막을 형성하는 방법은 가장 빈번히 사용되는 생물막 분석법이다. 일반적으로 96-well microtiter plate가 가장 많이 이용된다. 이 microtiter plate에 배지를 넣고 미생물을 접종한 후, 일정시간 가만히 놓아두면 각 웰의 가장자리 쪽 벽면 또는 바닥 부분에 미생물이 부착되어 생물막이 형성된다. 필요하다면 microtiter plate를 흔들어서 전단력을 부여할 수도 있으나 일반적으로는 매질 흐름 없이 전단력이 없는 상태로 진행된다(Heersink and Goeres, 2003). 이 방법은 닫힌 시스템의 회분 배양이므로 실험하는 동안 영양분이 고갈되거나 signaling molecule들이 축적되는 등 환경이 변하게 된다. 그럼에도 불구하고 가지는 장점은 비용이 적게 들고 적은 양의 시약이 사용되며 많은 시료를 동시에 분석하기에 좋은 방법이라는 점이다(Niu and Gilbert, 2004). 이 방법은 돌연변이 라이브러리로부터 생물막 형성 결핍 돌연변이를 찾거나(Heilmann *et al.*, 1996; O'Toole and Kolter, 1998), 각종 항생제, 살균제, 항균 물질들이 생물막에 미치는 효과를 screening하는 작업에 유용하게 쓰일 수 있다(Amorena *et al.*, 1999; Pitts *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2006; Quave *et al.*, 2008). Microtiter plate의 웰에 각기 다른 재질의 쿠폰을 넣는 방식으로 다양한 표면에서의 생물막 형성을 관찰할 수도 있다(Chandra *et al.*, 2001; De Prieck *et al.*, 2007, 2010). 전체 시스템의 구조가 단순하고 크기가 작으며, 적은 양의 배지만을 사용하기 때문에 쉽게 온도, 습도, 또는 산소 등 환경조건을 다양하게 변경할 수 있다는 장점도 있다(Stepanovic *et al.*, 2003; Krom *et al.*, 2007).

MBEC™ assay : MBEC (minimum biofilm eradication concentration)는 최소 생물막 제거 농도를 의미한다. MBEC™ assay는 기본적인 원리와 방법은 microtiter plate를 이용한 static biofilm 형성법과 같지만, 나중에 생물막 성장 정도를 쉽게 확인할 수 있도록 microtiter plate의 뒷면에 못과 같이 튀어나온 구조(peg)를 만든 것이다. 일반적인 microtiter plate 방법에서는 각 웰의 벽면이나 바닥에 형성된 생물막을 관찰 혹은 정량하는 반면, 이 방법에서는 뒷개의 peg에 형성된 생물막을 관찰 혹은 정량한다. 따라서 생물막 배양과정에서 새 microtiter plate로 쉽게 생물막을 옮길 수 있기 때문에 생물막에 여러 물질을 처리하거나, 배양액을 바꾸는 것이 용이하다. 또한 peg은 쉽게 부러뜨릴 수 있는 구조로 되어 있기 때문에, 생물막 속의 미생물을 쉽게 회수할 수 있도록 만든 것도 장점이다. 보통 peg을 부러뜨려 회수한 후 sonication을 통해 미생물 세포를 분리한 후 plate counting 방법으로 생물막 내 살아 있는 세포의 수를 셀 수 있다. 96-well microtiter plate를 사용할

경우 한번에 여러 물질들의 생물막에 대한 효과를 알아 볼 수 있으므로, 물질의 MBEC를 측정하기 용이하게 개발된 방법이라 할 수 있다. 이 장치는 과거에는 Calgary Biofilm Device라고 하였으며, Innovotech이라는 회사에서 판매하고 있다.

Pellicle biofilm : 펠리클 생물막(Pellicle Biofilm)은 액체 표면에 형성되는 생물막이다. 생물막은 일반적으로 고체 표면에 형성된다고 알려져 있고, 실제로 액체속에서 미생물을 배양하여 생물막을 형성시켰을 경우 보통은 바닥, 즉 액체와 고체의 계면에 생물막을 형성하게 된다(O'Toole *et al.*, 2000; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Stewart and Franklin, 2008). 그러나, 때로는 미생물은 공기와 액체의 계면(air-liquid interface)인 수면에 얇은 막 형태로 생물막을 형성하기도 하며 이를 펠리클 생물막이라고 한다. 따라서 펠리클 생물막에서 매질은 공기이며, 액체는 기층인 동시에 양분의 공급원이 된다. 보통은 흐름이 없이 정지된 액체의 수면에 형성되기 때문에 전단력이 없고 산소 농도는 높은 상태에서 형성되는 생물막으로, 자연계에서 영양분이 풍부한 물이 고여있을 경우 실제로 많이 관찰되는 생물막 형태이다. 일반 수계 환경에서 산소는 수면에서 바닥쪽으로, 영양분은 바닥에서 표면 쪽으로 갈수록 농도가 낮아지기 때문에(Wotton and Preston, 2005; Yamamoto *et al.*, 2011), 펠리클 생물막은 액체의 바닥에 해당하는 액체-고체 계면에 형성되는 생물막과는 생리적으로 차이가 난다.

펠리클 생물막 모델에서는 다른 생물막 모델과는 달리 양분을 공급하는 액체가 매질이 아닌 기층 역할을 하기 때문에, 회분 배양, 유가 배양, 연속 배양방법이 모두 적용 가능하지만, 배지를 흘려 연속 배양을 하더라도 전단력은 주어지지 않는다. 간단히 떠 내는 방법으로 생물막을 쉽게 회수할 수 있고, 보통은 다량체를 많이 생성하는 미생물이 수면에 떠서 펠리클 생물막을 형성하기 때문에 이 모델은 생물막을 구성하는 다량체에 관한 연구에 많이 쓰였으며, 녹농균 생물막을 구성하는 주요 당 다량체 중의 하나인 pel이 펠리클에서 유래된 이름이다(Friedman and Kolter, 2004a, 2004b; Colvin *et al.*, 2011). 다량체 생성 양상에 따라 특이적으로 주름이 잡힌 형태를 띠게 되는데, 아래에서 설명할 콜로니 생물막과 함께 생물막의 거시적인 구조를 육안으로 관찰할 수 있는 생물막 모델이다.

Colony biofilm : 콜로니 생물막(colony biofilm)은 고체 배지위에 형성되는 일반적인 콜로니와 유사한 환경에서 형성되는 생물막이다. 사실 콜로니 자체도 생물막의 한 종류라고 볼 수 있는데, 차이점은 콜로니 생물막 모델에서는 생물막의 회수를 쉽게 하고, 부착 생장이라는 특징을 살리기 위해 고체배지 위에 멤브레인을 깔고 그 위에 미생물을 접종하여 생물막

을 형성시킨다. 이 콜로니 생물막 방법은 1984년에 처음 제안되었다(Shapiro, 1984). 따라서 기층은 멤브레인, 매질은 공기이며, 전단력이 없고 산소가 풍부한 환경에서 형성되는 생물막이다(Anderl *et al.*, 2000). 전단력이 없이 형성되는 정지 생물막이지만, 기층으로 제공되는 멤브레인을 일정 시간마다 새로운 고체배지위로 옮겨 주는 방법으로 연속 배양과 유사한 방식의 배양이 가능하다.

콜로니 생물막 모델을 사용하는 가장 큰 이유는 이 모델이 실험실에서 사용할 수 있는 생물막 모델 중 가장 많은 양의 생물막체를 쉽게 얻을 수 있는 방법이기 때문이다. 많은 연구자들이 흐름 있는 생물막 모델 시스템, 특히 flow cell을 이용한 생물막 모델을 사용하지만, 이 방법으로는 한번에 많은 생물막체를 얻기도 힘들다. 콜로니 생물막의 크기가 크다는 점은 또 다른 장점을 제공하는데, 생물막 크기가 커짐에 따라 산소나 영양분, 세포 생장 부산물 등의 농도 구배가 크게 형성되고, 그에 따른 세포의 분화가 일어날 수 있다는 점이다. 생물막의 크기가 깊이에 따라 생물막 내 세포들을 분획할 수 있을 정도로 크기 때문에, 생물막 내 물질 농도 구배에 따른 세포의 생리적 분화양상을 연구하는데 이 모델이 쓰인 바 있다(Kim *et al.*, 2009; Im, 2011). 또한 미생물들이 군집을 이룰 때는 산소의 투과나 다량체 생성 양상에 따라 주름과 같은 독특한 군집 구조를 보이기도 하는데(Dietrich *et al.*, 2006), 콜로니 생물막 모델은 이러한 생물막의 거시적 구조를 육안으로 관찰할 수 있는 방법이다.

Embedded biofilm : 최근에 인체내의 점액질 속에 형성되는 생물막을 모사하기 위해 겔과 같은 매질 속에 묻혀 형성되어 자라는 묻힌 생물막(embedded biofilm) 모델이 제시되었다(Jung *et al.*, 2015). 점액질 속에 묻혀 형성되는 생물막은 위에서 설명한 모델처럼 액체 혹은 공기와 같은 매질 속에 고체나 액체와 같은 기층에 부착한 상태로 성장하는 일반적인 생물막 모델과는 많은 부분 차이가 난다. 따라서 이를 모사할 수 있는 새로운 생물막 모델이 필요하였는데, 최근 Jung 등(2015)은 이를 위해 녹인 agarose와 미생물을 섞어 microfluidic channel에 주입하여 굳힌 다음, 미생물들이 agarose 속에 고정된 상태로 전단력 없이 agarose 겔 속에 묻힌 상태로 군체를 형성하도록 만들고, 이렇게 형성된 미생물 군체가 스스로 생성한 다량체에 둘러싸여 있는 생물막 구조를 띠고 있음을 확인하여 이러한 묻힌 생물막이 새로운 생물막 모델을 제안하였다. 이 묻힌 생물막 모델은 다른 모델과는 달리 기층과 매질이 구분되지 않고, 매질인 겔이 기층 역할도 한다. 또한 겔 속에 있으므로 전단력은 없지만, 양분은 확산을 통해 외부로부터 지속적

으로 공급할 수 있기 때문에 회분 배양과는 다소 다른 유가 배양에 가까운 형태라는 특징을 가진다(Jung *et al.*, 2015). 처음 이 방법이 제안된 연구에서는 매질을 이루는 겔로는 agarose가 사용되었으나, 콜라겐, 젤라틴, 뮤신 등 실제 생체내에 존재하는 겔 성분을 매질로 사용할 경우 보다 실제 감염에 가까운 환경을 모사하는 것이 가능하다는 장점을 가진다.

실제 임상에서 발견되는 감염 환자의 체내 생물막은 상피세포 표면의 점도가 높은 점막 층 내에 묻혀서 형성되거나, 경우에 따라서는 숙주 세포내에 형성되기도 한다(Worlitzsch *et al.*, 2002; Bjarnsholt *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2015). 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)과 같은 만성 폐 질환환자의 기도에 감염하는 녹농균은 기도의 상피세포가 분비하는 두꺼운 점막 층 내에 존재하는 것으로 알려져 있다(Worlitzsch *et al.*, 2002; Bjarnsholt *et al.*, 2009). 이러한 환자들의 객담속에서 녹농균들이 microcolony 상태로 묻혀 있는 것이 관찰되었는데, 이러한 microcolony 들이 생물막의 한 종류라고 제안된 바 있다(Bjarnsholt *et al.*, 2009). 또한 대장균에 의한 요로 감염에서는 방광 내강(bladder lumen)에 콩깍지 형태의 돌출부(pod-like bulge)들이 형성되고 그 안에 대장균들이 들어있는데, 이 세균을 포함하는 콩깍지 같은 구조물은 숙주의 세포질 속에서 탄수화물이 풍부한 기질(matrix)에 의해 둘러싸여 있음이 발견되었다(Anderson *et al.*, 2003). 이 또한 생물막과 유사한 구조로, 이들과 같이 점액질 속에 형성되는 감염균들의 생물막 형태는 전단력이 없는 상태에서 매질속에 묻혀 형성된다는 점에서 묻힌 생물막 모델에서 형성된 생물막과 유사하다. 점토질의 토양이나 식물 표면 등에도 이와 같이 유동성이 없고 점도가 높은 환경속에서 미생물들이 응집되어 형성되는 생물막들이 많이 존재할 수 있기 때문에, 묻힌 생물막 모델은 만성 감염과 관련된 임상에서의 생물막 연구와 비유동성 환경에서의 생물막 연구 등에 보다 적합한 생물막 모델이라 할 수 있다.

묻힌 생물막 모델의 또 다른 장점은 이 모델 시스템이 microfluidic device로 개발되었기 때문에 전체 시스템의 부피가 매우 작고 배지를 소량만 사용한다는 점이다. 또한 미생물이 겔속에 있기 때문에 세포의 움직임이 제한되어 있어 생물막을 형성하지 않고 있는 개별 세포도 현미경으로 관찰이 가능하며, 생물막 형성도 초기부터 관찰이 용이하다는 장점이 있다. 특별히 형광 현미경과 같은 고가의 장비를 쓰지 않더라도 일반 현미경으로 관찰이 가능하다는 것도 큰 장점이다. 또한 묻힌 생물막 모델에서는 전단력이 있는 환경보다 빠른 속도로 생물막이 형성되기 때문에, 실험 시간이 단축된다는 장점도 있다(Jung *et al.*, 2015).

흐름이 있는 환경의 생물막 형성 모델

흐름이 있는 모델 시스템은 생물막 형성 과정 동안 지속적으로 매질의 흐름을 부여하여 동적 상태(dynamic state)에서 생물막이 형성되도록 하는 방식이다. 동적 상태의 구현은 영양분과 부산물의 입출이 없는 회분 배양과 같은 닫힌 시스템에서 매질을 교반(stirring)하거나 회전 혹은 좌우 요동 시켜 전단력만을 부여할 수도 있고, 흐름을 통해 지속적으로 새로운 영양분을 공급하고 부산물을 방출하는 연속 배양 방식의 열린 시스템을 적용할 수도 있다. 이 경우 매질의 흐름만으로 전단력이 부여될 수도 있고, 매질을 추가적으로 휘저음으로써 매질의 균등한 혼합과 추가적인 전단력을 부여할 수도 있다. 이렇게 배양 방법과 전단력을 부여하는 방식에 따라 reactor의 구조가 달라지게 된다. 앞에서도 언급한 것처럼, 전단력이 생물막의 구조에 영향을 줄 수 있기 때문에, 흐름이 있는 생물막 형성 모델은 생물막 연구에 많이 사용된다.

회분 배양법이 적용되는 닫힌 시스템의 경우, reactor 자체의 구조는 단순하지만, 매질을 유동시키는 방법은 자석 막대를 이용한 교반(stirring), rocker를 이용한 좌우 요동(rocking) 혹은 원형 요동(rotation), 배플 플라스크 등을 이용한 난류(turbulence) 등 다양한 방법이 사용될 수 있다. 생물막이 형성될 표면은 쿠펜 혹은 멤브레인의 형태로 reactor 속에 넣어 줄 수 있다. 연속 배양법을 적용할 경우 reactor의 구조는 복잡해지는데, 크게 다음과 같은 두 가지 형태의 reactor가 사용될 수 있다. 첫째는 Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR)인데, 이는 일정 속도로 매질을 공급, 방출하는 연속 배양 방식을 취하면서 완전한 혼합을 위해 다시 reactor 내에서 매질을 휘저어 주는 방식이다. 일반적으로 연속 배양 방식에서는 매질 속 물질 전반의 균형을 뜻하는 매스 밸런스(mass balance)가 중요하게 고려되어야 하는데, 영양분과 부산물이 일정 농도로 유지되도록 하는 chemostat의 경우가 매스 밸런스가 가장 잘 유지되는 경우이다. CSTR의 경우 chemostat을 할 수 있는 reactor이다. 또 한가지는 plug flow reactor (PFR)이다. 이 reactor는

별도의 휘저음 없이 매질의 흐름만 존재하는데, 양분과 부산물이 연속적으로 유입, 방출되지만 내부의 매질이 완전히 섞이지 않을 수도 있으며, 흐름의 방향이 일정하기 때문에 전단력 또한 일정하게 주어진다라는 특징이 있다. 아래에서 설명할 flow cell과 drip flow 시스템의 reactor들이 PFR에 해당되며, CDC reactor, rotating disc reactor, annular reactor 등은 CSTR에 해당된다. Table 2에서는 흐름의 유무 혹은 강약에 따른 특징들을 간략히 정리하였고, Table 3에서는 각 생물막 형성 방법들을 배양 방법과 흐름의 유무 혹은 강약에 따라 구분하고 중요한 특징들을 소개하였다.

Flow cell 시스템 : 일반적으로 흐름이 있는 환경에서의 생물막 형성에 가장 많이 이용되는 모델은 flow cell 시스템이다. Flow cell은 1990년대 처음으로 사용되어(Wolfaardt *et al.*, 1994; Moller *et al.*, 1997) 이후 다양한 생물막 연구에 적용되었다. 이 모델은 앞서 언급한 것처럼 연속 배양 방법이 적용되는 PFR 방식의 생물막 형성 시스템이다. Flow cell 시스템은 일반적으로 세 부분, 배지 저장소, 펌프, 그리고 가장 중요한 flow cell reactor로 구성된다. 모든 구성요소들은 실리콘 튜브를 통해 연결되며, 이를 통해 액체 상태의 매질이 배지 저장소로부터 flow cell reactor를 통해 마지막 빠져 나갈 때까지 펌프에 의해 한 방향으로만 흘러가게 된다. 매질은 보통 연동 펌프(peristaltic pump)를 이용하여 강제적으로 흘러주는데, 이 때 flow rate을 조절함에 의해 전단력을 적절한 강도로 부여할 수 있다. 배지 저장소에서 배지가 계속 reactor 속으로 빠져나가면 배지 저장소 내부에는 음압이 걸리게 되므로, 멸균 상태를 유지하기 위해서는 배지 저장소에 공기가 들어가는 통로에 세균용 필터를 설치하여야 한다. 이들 이외에도 배양하는 동안 reactor로부터 방출되는 배지를 받을 용기와, 때때로 발생할 수 있는 기포들이 flow cell reactor로 들어가지 않게 막아주는 bubble trap 등이 전체 시스템에 포함되어야 한다.

생물막이 형성되는 장소인 flow cell reactor는 여러 가지 다양한 디자인이 존재하나, 일반적으로 광학 현미경으로 직

Table 2. Effects of flow rate on biofilms and biofilm models

No flow	with flow	
	Low flow rate	High flow rate
<ul style="list-style-type: none"> • Easy, cheap, and simple preparation of the system without specialized equipment • Easy multiple operation • Less labor intensive • Hard to see the biofilm structure 	<ul style="list-style-type: none"> • Smooth or flat appearance • Loosely attached 	<ul style="list-style-type: none"> • Highly structured and porous appearance (mushroom-like shape) • Tightly attached
	<ul style="list-style-type: none"> • Similar to most environmental conditions • More labor intensive • Require specialized equipment (more expensive) • Difficulty in multiple operation 	

Table 3. Methods for biofilm formation and their relative merits

Methods	Culture design	Flow rate	Advantage	Disadvantage
Static biofilm in microtiter plate	batch/closed/static	No flow	<ul style="list-style-type: none"> • Screening purposes • Multiple parameters • Small volumes of reagents 	<ul style="list-style-type: none"> • Nutrients depleted • Signaling molecules accumulation
Colony biofilm	fed-batch/closed/static	No flow	<ul style="list-style-type: none"> • Easy to repeat multiple times in parallel • Able to obtain large mass of biofilm 	<ul style="list-style-type: none"> • Not good for following individual cells at early stages of biofilm development
Flow cell	Continuous/open/dynamic	High	<ul style="list-style-type: none"> • Possibility to analyze biofilm formation real-time 	<ul style="list-style-type: none"> • Impracticality of running many biofilms at once
Drip flow	Continuous/open/dynamic	Low	<ul style="list-style-type: none"> • Small volumes of media 	<ul style="list-style-type: none"> • Low shear environment
CDC reactor	Continuous/open/dynamic	High	<ul style="list-style-type: none"> • Large number of coupon attached biofilms for testing • Steady state without changes in concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • High cost • More days to complete
Microfluidic	Continuous/open/dynamic	High	<ul style="list-style-type: none"> • Developing biofilms under physiologically relevant conditions • Screening • Easy to design 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited biological relevance
Embedded biofilm	Fed-batch/closed/static	No flow	<ul style="list-style-type: none"> • Mimic clinical biofilm in mucosal tissues • Faster, easier, and cheaper to study biofilms 	<ul style="list-style-type: none"> • Depended on cell-fixing stress for clinical biofilm
Pellicle biofilm on liquid	Batch /closed/static	No flow	<ul style="list-style-type: none"> • Common ecological niche 	<ul style="list-style-type: none"> • No various condition

접 생물막을 관찰할 수 있도록 생물막이 부착하는 기층 부분을 현미경 관찰이 가능한 재질(보통은 유리)을 사용하여 제작한다. 가장 흔한 형태는 플라스틱으로 만든 일정 크기의 chamber를 현미경 관찰이 가능한 cover glass로 덮어서 실리콘으로 봉합하는 방식으로 만들어진다. 이때 cover glass는 reactor의 한쪽 면을 구성함과 동시에 생물막이 형성되는 기층이 되며, 현미경 관찰을 위한 통로가 된다. 이렇게 제작된 flow cell 시스템에서는 생물막 형성과정을 현미경을 통해 실시간으로 관찰할 수 있다. 이 reactor에 처음 미생물을 접종할 때에는 흐름이 정지된 상태에서 적절한 양의 미생물을 주사기 등을 사용하여 reactor 내로 주입하고, 잠시 미생물 부착을 위해 정지상태로 놓아 둔 후, 배지를 연속적으로 흘려주면서 생물막이 성장하도록 한다.

이 시스템이 자연계의 흐름이 있는 환경에서 형성되는 생물막을 잘 모사한다는 점 때문에 많은 연구자들에 의해 널리 쓰이고 있으나, 구성이 복잡하고 전체 시스템의 부피가 크고 관리가 번거롭다는 단점이 있다. 특히 배지 저장소와 flow cell reactor를 포함해 모든 부분을 사용 전에 멸균해야 하며, 멸균 후에 각 부분들의 연결과 접종 과정에서도 멸균 조작을 해야 하기 때문에 많은 공간과 노력이 필요로 한다. 또한 여러 시료에 대한 실험을 동시에 시행하는데 많은 제약이 따른다. 보통 1-4개 정도의 flow cell reactor를 동시에 운용할 수 있다.

Drip flow 시스템 : 이 시스템도 흐름이 있는 환경을 모사하는 대표적 생물막 형성 모델이다. 연속 배양 방법이 적용되는 생

물막 형성 시스템으로 PFR에 가까우며, 다른 방법에 비해 비교적 약한 강도의 전단력이 부여되는 방식이다(Buckingham-Meyer *et al.*, 2003; Goeres *et al.*, 2009). Drip flow 시스템에서는 멸균된 고체 판에 미생물을 떨어뜨려 부착을 위해 잠시 둔 다음, 살짝 기울여 놓고 그 위에 액체 배지를 일정 속도로 떨어뜨리면서 자연스럽게 흘러 내려가게 한다. 생물막은 그 고체판 표면에서 형성되며 떨어져 흘러가는 배지로부터 지속적으로 양분과 전단력을 받게 된다. 따라서 고체 판이 표면이 되며 매질은 액체인 환경이지만, 배지가 떨어져 흘러가는 중간 중간에 공기에 충분히 접할 수 있는 환경이 조성되므로, flow cell 방식에 비해 산소가 풍부한 상태에서 생물막이 형성될 수 있다. 보통 고체판으로는 slide glass를 사용하지만 금속이나 플라스틱 등 다른 재질을 기층으로 제공할 수도 있다. Flow cell 시스템처럼 배지 저장소와 연동 펌프가 필요하며, drip flow가 일어날 reactor로써의 chamber가 필요하다. 이 drip flow reactor 안에 고체판을 넣고 멸균 상태로 접종과 생물막 배양을 수행하여야 하며, 연동 펌프의 속도를 통해 drip flow rate과 그에 따른 전단력을 조절할 수 있다. 하지만 drip flow 시스템의 경우에는 고체판을 기울인 정도나 매질의 점성에 따라서도 전단력이 변할 수 있다.

Drip flow 모델이 모사하는 생물막은 실제 자연환경이나 생활 속에서도 많이 발견할 수 있다. 특히 화장실, 욕실, 세면대 등에 형성되는 미끄러운 물때가 이 모델에 의해 형성되는 생물막과 비슷하기 때문에, 이러한 생물막을 제어하기 위한 살

균제 혹은 세제 등의 항 생물막 효과 테스트에 유용하게 이용될 수 있다(Elkins *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2001). 그러나 flow cell 시스템처럼 전체의 부피가 크고 동시에 많은 시료에 대한 실험을 수행하기에는 다소 제약이 있다. 보통 1-4개 정도의 drip flow reactor를 동시에 운용할 수 있다.

CDC reactor/ Rotating disc reactor/ Annular reactor 시스템 :

이 reactor들은 기본적으로 미생물의 연속 배양을 위한 Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR) 방식을 그대로 가져온 것들인데, 다만 reactor 내부에 생물막 형성을 위한 표면을 제공할 수 있도록 특별히 디자인된 것들이다. 각 연구실에서 나름의 디자인으로 유사하게 제조할 수도 있으나, 보통은 BioSurface Technologies Corporation에서 제조하여 판매하는 것을 사용한다. 이 reactor들에서는 배지의 공급 속도와 방출 속도를 동일하게 하고 교반을 통해 매질을 혼합하여, 시간에 따른 농도의 변화 없이 시스템내의 매질이 항상 일정한 농도로 유지되게 하는 chemostat이 가능하다. 일반적인 CSTR에서는 연속 배양에서의 희석 비율이 reactor 내의 미생물들의 증식 속도보다 높을 경우, 부유 미생물들이 없어지는 wash-out 현상이 일어나지만, 생물막 형성을 위한 이들 reactor에서는 부유 미생물들이 wash-out 되더라도 부착되어 있는 생물막내 미생물들은 계속 성장을 할 수 있다(Heersink and Goeres, 2003). 이 방식들에서는 쿠폰이나 디스크 위에 생물막이 형성되게 하므로 매질은 액체, 기층은 고체가 되며, 교반에 의해 강력한 전단력을 부여할 수 있지만, 쿠폰을 꺼내기 전에 실시간으로 생물막을 관찰 분석하는 것은 불가능하다. 이 reactor들은 기본적으로는 연속 배양을 위해 디자인 되어있지만, 교반만 해 주고 배지 공급을 하지 않는다면 흐름이 있는 동적 상태에서 회분 배양으로 생물막을 형성시키는 것도 가능하다.

BioSurface Technologies Corporation에서 제조, 판매하는 CDC reactor는 미생물 배양을 위한 유리 용기와, 생물막이 형성될 쿠폰을 삽입할 수 있는 막대로 구성되어 있다. CDC reactor의 중앙부분에 자석 교반기가 위치하게 되고, 연동 펌프가 배지를 반응기에 일정 속도로 유입시켜 연속적인 흐름을 제공하게 된다(Goeres *et al.*, 2005). 쿠폰 삽입용 막대는 polyethylene 재질이며 유리 용기 속에 수직으로 삽입된다. 보통 용기당 8개가 들어갈 수 있는데, 하나의 막대에 다시 3개의 쿠폰을 장착할 수 있으므로 총 24개의 쿠폰이 들어갈 수 있다. 이들 막대에 고정된 쿠폰은 정지해 있고, 주위의 매질을 자석 교반기로 교반시켜 흐름과 전단력을 부여한다(Donlan *et al.*, 2004; Goeres *et al.*, 2005; Buckingham-Meyer *et al.*, 2007). 이 시스템은 강한 전단력을 부여할 수 있기 때문에 부착되지 못한 미생물은 방출

되고, 부착된 미생물만이 쿠폰 위에 생물막을 형성한다. 쿠폰의 재질을 다양하게 적용할 수 있으므로, 표면 특성에 따른 생물막 형성을 연구하기에 적합하다. CDC reactor은 chemostat 하에서 생물막 형성 실험을 할 수 있기 때문에 신뢰성이 높으며, 24개 서로 다른 쿠폰에 동시에 생물막 형성을 테스트 할 수 있고, 실험하는 동안 쿠폰을 쉽게 제거 할 수 있다는 장점이 있다(Buckingham-Meyer *et al.*, 2007; Hadi *et al.*, 2010).

Rotating disc reactor는 기본적인 구조는 CDC reactor와 동일하기 때문에 배양과 관련된 특징은 CDC reactor와 동일하다. 하지만 이 reactor에서는 쿠폰을 자석 디스크 위에 올려놓고 교반기를 이용해 매질 속에서 디스크를 회전시키는 방법을 사용하기 때문에 매질 대신 기층이 움직여 전단력이 부여되는 방식이다. 디스크가 회전함에 따라 매질도 함께 회전하게 되므로 CDC reactor 보다는 약한 전단력을 주는 것으로 알려져 있다(Zelver *et al.*, 1999; Goeres *et al.*, 2005). BioSurface Technologies Corporation사의 rotating disc reactor에는 디스크에 6개의 쿠폰이 장착될 수 있다. CDC reactor처럼 chemostat이 가능하고 쉽게 쿠폰을 제거 할 수 있다.

Annular reactor도 기본적인 배양 원리는 동일하다. 하지만 reactor 내에 고정 외부 실린더를 놓고, 회전 내부 실린더를 회전시켜 매질이 두 실린더 사이에서 움직이도록 디자인 되어 있다. 내부 실린더의 회전은 모터를 통해 이루어지며, 이 회전 속도를 통해 전단력을 제공한다. 기층이 되는 쿠폰은 슬라이드 형태로 안쪽 회전 실린더에 장착되며, BioSurface Technologies Corporation사의 Model 1320LS의 경우 20개의 슬라이드가 장착될 수 있다. 슬라이드 쿠폰의 재질은 stainless steels, carbon steel, polycarbonate, copper 등이 제공되나, 필요에 맞게 적절한 재질로 제작할 수 있다. 슬라이드 쿠폰 표면에 생물막이 형성되면 슬라이드를 제거하여 형성된 생물막을 분석, 관찰한다.

Microfluidic flow system : 앞에서 설명한 flow cell 시스템을 microfluidic channel 형태로 작게 축소한 시스템이다. Microfluidic device를 이용하면 전체 시스템이 매우 작아지며, 사용되는 배지의 양도 극히 적은 양으로 줄일 수 있다. 또한 microfluidic device를 디자인 하기에 따라 동시에 많은 생물막 시료를 분석할 수 있게 시스템을 구축할 수 있어, 스크리닝과 같은 실험에도 쓸 수 있고(Benoit *et al.*, 2010; Conant *et al.*, 2010), flow cell 시스템처럼 실시간 현미경 관찰도 가능하게 만들 수 있기 때문에 최근 많은 인기를 얻고 있다. 또한 생물막 형성시의 유속이나 미생물량, 산소량 등의 여러 환경 조건에서, 모세혈관과 같은 인체 내 미세 조직의 생리적 상황을 더 유사하게 반영할 수 있고, 이를 더욱 정밀하게 조절할 수 있다는

장점이 있다(De La Fuente *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2007). 유속은 보통 0.1–50.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이며 Reynolds number가 낮기 때문에 보다 안정한 laminar flow를 제공한다(De La Fuente *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Eun and Weibel, 2009; Janakiraman *et al.*, 2009).

Microfluidic flow 시스템에서 생물막이 형성되는 channel의 크기는 모델에 따라 다르지만 일반적으로 넓이 50–500 μm , 폭 30–250 μm , 길이는 5–40 mm 정도의 크기를 가진다. 하지만 보통 flow cell 시스템에서 형성되는 생물막이 200 μm 이상의 두께까지도 자랄 수 있기 때문에, microfluidic channel의 크기에 따라 형성되는 생물막의 크기에 제약이 따를 수 있다. 또한 microfluidic device를 제조하는 기술이 필요하기 때문에, 관련 전문가의 도움이 필요하다는 제약이 있다.

생물막 분석 및 관찰

형성된 생물막의 분석에는 그 목적에 따라 형광 염색(fluorescence staining), 세포 수 측정, 건조 질량(dry mass) 측정, 단백질 혹은 탄수화물 정량, 현미경 관찰(microscopy observation) 등 다양한 방법이 사용된다. 이러한 방법들은 크게 생물막의 크기(biofilm mass)나 생물막 내 세포의 수 측정 등 정량적인 방법들과 생물막 내 세포의 다량체(EPS; extracellular polymeric substance), 혹은 살아있는 세포와 죽은 세포의 구성과 분포 등을 분석하는 정성적인 방법으로 나누어 볼 수 있으며, 또한 생물막을 회수하여 분석하는 방법과 직접 관찰, 분석하는 방법으로도 나눌 수 있다. 생물막을 회수하여 분석하는 경우는 일반적으로 사용되는 모든 분석법을 다 사용할 수 있으나, 회수의 용이성과 회수할 수 있는 양이 문제가 되고, 직접 분석을 할 때는 표면에 부착된 상태 그대로 분석해야 하기 때문에 모델 시스템의 구조가 이를 뒷받침해 주어야 한다. 앞선 설명처럼 쿠펜이나 멤브레인, peg 등 쉽게 회수가 가능한 기층을 사용한 다든지, 실시간 현미경 관찰을 위해 광학적으로 빛이 투과되는 재질로 reactor를 만든다든지 하는 것이 그 예이다. 또한 현미경 관찰을 위해서는 현미경과 분석 프로그램도 생물막 모델 시스템에 포함되어야 한다. 따라서 생물막 분석 및 관찰을 어떻게 하느냐는 전체 모델 시스템의 구조와 구축 비용에 많은 영향을 미치게 된다.

일반적인 생물막 분석 방법

CFU counting : 생물막의 CFU (colony forming unit) 측정은 살아있는 세포의 수로 생물막을 정량하는 가장 기본적인

정량법으로, 생물막에 부착되어 있는 세포를 sonication 등으로 떼어내어 현탁한 후 고체배지에 도말하여 형성되는 콜로니 수를 세는 방법이다(Cloete *et al.*, 1992; Rice *et al.*, 2007; Adetunji and Odetokun, 2012). 이것은 살아있는 세포를 정량하는 것이기 때문에, 이미 형성된 생물막을 사멸하려고 하는 연구에 특히 유용하다. 하지만, 생물막에 부착되어 있는 세포를 떼어내기 위한 sonication 혹은 현탁 과정에서 미생물이 죽거나 혹은 불충분하게 떨어질 수 있고, 이것이 결과에 영향을 미칠 수도 있다(Hannig *et al.*, 2007). 또한, 세포가 기아 또는 스트레스의 상태에 있을 경우 성장을 잘 하지 못할 수도 있다(Shen *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2013). 이 방법은 노력과 시간이 많이 들기 때문에 screening과 같은 작업에는 적절하지 않다(Van den Driessche *et al.*, 2014). 특히 자연계에 존재하는 다중 복합 군집에 의한 생물막을 연구할 때 이 방법을 쓰게 되면, 일반적인 고체 배지 조건에서 배양이 되지 않는 미생물이 많기 때문에 배양 과정에서 특정 종에 대한 선택이 발생할 수도 있다(Donlan and Costerton, 2002; Aas *et al.*, 2005). 앞에서 설명하였던 MBECTM assay의 peg이 이 방법으로 생물막을 쉽게 정량할 수 있도록 고안된 구조이다.

건조 질량(dry mass) : 건조 질량에 의한 생물막의 정량도 일반적으로 널리 이용되는 방법이다. 이 방법은 쉽고 상대적으로 신속하고 바로 결과를 확인할 수 있다. 60–105°C 정도에서 생물막 시료를 건조시킨 후 굵어서 직접 무게를 측정한다. 건조 질량을 측정할 수 있으면 생물막이 차지하는 면적과 두께로부터 단위 면적당 건조 질량과 생물막의 밀도도 산출할 수 있다. 비록 생물막의 성분이나 구조에 대한 정보를 주지는 않지만, 실험실에 흔히 있는 건조기와 저울을 이용하여 쉽게 수행할 수 있다는 장점이 있다.

염색(staining) : 염색법은 생물막을 정량하기 위해서 가장 많이 쓰이는 방법이다. 생물막 염색에서 주된 염색 대상은 세포 자체, EPS (extracellular polymeric substance), 단백질, DNA 등이며, 염색제로는 주로 형광 염색제가 사용되지만, crystal violet과 같은 색깔을 띠는 일반 염색제가 쓰이기도 한다. 염색제가 특정 분자나 특정 종 혹은 상태의 미생물에만 특이적으로 결합하는 경우 정성적 분석을 위해서도 염색이 쓰일 수 있다.

생물막을 단순 염색하는 방법으로 가장 많이 쓰이는 것은 crystal violet에 의한 염색법이다. 보통 microtiter plate를 이용한 정지 생물막 분석에서 많이 쓰이며, 매우 쉽고 빠르며, 재현성이 높은 방법이다. Crystal violet은 살아 있는 세포와 죽은 세포 모두를 염색한다. 아주 많이 성숙한 생물막은 여러 층의 세

포와 EPS로 구성되어 염색에 방해가 되므로 이 방법은 생물막 초-중기 단계에서 주로 유용하다. Microtiter plate에서 미생물을 키워 plate 웰 내벽에 생물막이 형성되면, 배지를 모두 버리고 부유 미생물들도 세척하여 제거한 후 여전히 붙어있는 생물막을 crystal violet으로 염색한다. 염색된 crystal violet의 양이 생물막의 양을 반영하므로, 에탄올로 crystal violet을 녹여낸 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한다. 높은 흡광도는 생물막 형성이 많다는 것을 의미한다(O'Toole, 2011).

생물막은 많은 양의 세포의 다량체(EPS; extracellular polymeric substance)로 이루어져 있다. EPS에는 다당체(polysaccharide), 단백질, 지질, 핵산 등 다양한 다량체들이 포함되며, 미생물에 따라 독특한 다량체들이 합성되어 생물막을 구성하게 된다. 따라서 이러한 다량체를 염색함으로써 생물막을 정량할 수 있으며, 각각의 다량체에 특이적으로 결합하는 염색제를 사용함으로써 EPS의 조성을 정성적으로 분석할 수도 있다. 가장 많이 쓰이는 것은 다당체를 염색하는 것이다. 보통 셀룰로오스 등 특정 다당체에 특이적으로 결합하는 염색제를 쓰거나, 당에 특이적으로 결합하는 렉틴(lectin)에 형광 염색제를 붙인 것을 사용하는데(Lawrence *et al.*, 1998, Strathmann *et al.*, 2002), Concanavalin A (ConA)가 이런 용도로 사용되는 대표적 렉틴이다. 다당체에 특이적으로 결합하는 염색제에는 Congo Red, calcofluor white 등이 있다(Stewart *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2008). 이들을 사용하면 생물막의 주변을 시각화하여 볼 수 있다. 모든 세포의 성분인 단백질 또한 중요한 염색 대상인데, Fluorescein isothiocyanate (FITC) 같이 단백질의 amine 혹은 sulfhydryl 기에 결합하는 형광 염색제로 염색할 수 있다. EPS에서 다당류와 단백질의 비율은 생물막 강도를 제시하기 위해 사용되기도 하는데(Lazarova *et al.*, 1992), 이는 전단력에 영향을 받는다는 것이 알려진 바 있다(Mittelman *et al.*, 1990).

최근 SYTO 시리즈 염색제(SYTO[®] dyes)와 같은 많은 염색 시약들이 개발되어 다양한 파장의 형광으로 세포를 염색하는데 사용되고 있다. 많이 쓰이는 형광 염색 중에 SYTO 9과 propidium iodide (PI)를 사용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하여 염색하는 방법이 있다(Boulos *et al.*, 1999). 이 두 염색제는 모두 세포내 핵산에 결합하여 형광을 내는데, SYTO 9은 모든 세포를 염색하여 녹색을 나타내지만, PI는 세포 막이 손상된 세포만을 염색하여 적색을 발광한다(Peeters *et al.*, 2008). 이 두 염색 시약이 가지고 있는 장점은 형광 감도가 매우 높으며 녹색과 적색의 대조가 강하다는 것이다. 따라서 이 두 염색제를 사용하면 효과적으로 살아있는 세포와 죽은 세포를 변별할 수 있다. 게다가 이 방법은 신속하고 이용하기 쉬우며 세포 수 정량에서 신뢰성이 높다고 알려져 있다(Boulos *et*

al., 1999). 그런데 이 방법을 생물막 분석에 이용할 때는 주의가 따른다. 왜냐하면 앞서 설명한대로 핵산은 생물막에서는 EPS의 주요 성분이다. 이는 생물막 형성시 많은 미생물들이 DNA를 외부로 배출하여 생물막 구조를 형성하는데 사용하기 때문이다(Hans-Curt and Jost, 2010). 즉, 핵산에 결합하는 형광 염색제는 생물막의 EPS를 시각화하거나 정량할 때에도 사용될 수 있으며(Allesen-Holm *et al.*, 2006), 따라서 생물막 내에서 SYTO 9과 PI를 사용할 경우 살아있는 세포와 죽은 세포의 변별에 이러한 사실을 반드시 고려하여야 한다. SYTO 9은 pH에 민감하며 pH 5.5-6.5에서 최대 형광을 나타낸다.

형광 염색제를 쓰는 방법과 함께 생물막을 형광을 이용해 분석하는데 많이 쓰이는 방법이 미생물에서 녹색 형광 단백질(GFP; green fluorescence protein)과 같은 형광 단백질을 발현시키는 것이다. 이는 생물막을 형성시키고자 하는 미생물에 GFP를 코딩하는 유전자를 가진 플라스미드를 도입하거나 염색체에 삽입함으로써 구현할 수 있다(Lambertsen *et al.*, 2004). GFP 뿐만 아니라 YFP (yellow fluorescence protein), RFP (red fluorescence protein), CFP (cyan fluorescence protein) 등 여러 다른 색의 형광 단백질도 도입이 가능하다. 이렇게 형광 단백질을 발현하는 미생물로 생물막을 형성시킬 경우, 형광을 통해 쉽게 생물막의 정량이 가능하고, 생물막 내 세포들의 위치를 간단히 확인할 수도 있다. 또한 여러 다른 색 형광을 이용하여 복수의 미생물에 의해 형성된 생물막에서 종에 따른 분석도 가능하다(Sternberg *et al.*, 1999).

FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)는 종 특이적 DNA probe를 사용하여 실제 환경에서 미생물 종을 판정하는 유용한 방법이다(Dige *et al.*, 2007, Schaudinn *et al.*, 2009). FISH와 아래에서 설명할 CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)을 이용하면 구강에 존재하는 생물막의 3차원 이미지를 재구성할 수 있다(Diaz *et al.*, 2006; Al-Ahmad *et al.*, 2007; Dige *et al.*, 2009; Palmer, 2010). 이 방법은 기존의 antibody를 이용한 방법과 비교하였을 때 배양이 어려운 미생물을 확인할 수 있다는 장점이 있다(Al-Ahmad *et al.*, 2007).

생물막의 영상 분석

생물막 영상 분석에는 현미경이 이용되어야 하는데, 앞서 설명한 형광 염색법들을 사용할 경우, 형광 현미경과, 형광 분석을 위한 소프트웨어가 필요하게 된다. 특히 생물막 연구에서는 생물막의 복잡한 3차 구조를 보기 위해 수직 방향(Z-축)으로 단계적 관찰을 할 수 있는 현미경을 필요로 한다. 이를 위해 생물막 영상 분석에서는 공초점 레이저 주사현미경(CLSM)이 많이 이용된다. 이 장치는 단파장 레이저와 pinhole을 도입

하여 기존의 광학 현미경의 초점면 이외 부분의 상변집 문제를 극복하였다. 따라서 CLSM은 초점이 맞는 초점면만의 선명한 상을 얻을 수 있으므로, 초점면을 Z-축으로 움직여 가며 연속적인 상을 얻을 후 이를 컴퓨터에서 재조합, 3차원 이미지를 구성할 수 있다. 이러한 3차원 영상 구성에는 보통 형광 이미지가 사용되기 때문에, CLSM 영상 분석에는 형광 염색이 필요하다. 따라서 생물막내 세포들이 스스로 형광을 내게 하기 위해 GFP 등을 발현하게 하거나(Chalfie *et al.*, 1994), 아니면 형광 염색제로 생물막을 염색하여야 한다.

실시간 관찰을 할 수 없는 모델의 경우에는 생물막 reactor로부터 생물막을 회수하여 현미경 관찰을 해야 하지만, flow cell과 microfluidic channel 시스템처럼 실시간으로 현미경 관찰이 가능하게 한 모델의 경우, 현미경이 전체 시스템의 일부로 함께 구성되게 된다. 특히 CLSM을 사용하면 생물막 연구에 매우 유용하다(Pamp *et al.*, 2009). 하지만 형광 현미경과 영상 분석 소프트웨어들은 고가의 장비이고, 특히 CLSM은 아주 고가의 장비이기 때문에 이를 생물막 연구 전용으로 사용하는 것은 매우 어렵다. 그래서 microfluidic channel을 이용한 맵 생물막 모델의 경우 겔 속의 생물막이 일반 현미경으로도 잘 관찰된다는 점은 비용 면에서 큰 장점이 될 수 있다.

CLSM 등을 이용한 영상분석에 있어 소프트웨어가 차지하는 중요성은 매우 크다. 대부분 현미경 제조사는 자신들의 전용 소프트웨어를 제공하여 영상을 분석할 수 있게 하는데, 이들 외에도 Imaris (Bitplane), Amira (Visage Imaging), Volocity (Improvision), Voxblast (Vaytek), Metamorph (Molecular Devices) 등 범용 영상 분석 소프트웨어들도 있다. 이들 소프트웨어는 이미지를 좀 더 선명하고 깨끗하게 보여주기 위한 노이즈 조절과 형광의 정량 등 다양한 기능을 가지고 있는데, 특히 여러 이미지들을 렌더링을 통해 이미지를 3차원 또는 2차원으로 조합할 수도 있다. 또한 이미지들을 애니메이션화할 수도 있다. 현미경 제조사의 소프트웨어들은 나름의 독특한 파일 포맷으로 이미지를 저장한 후 이를 분석에 이용하는 경우가 많은데, 호환이 되지 않는 경우도 있으므로 주의해야 한다. 예를 들어 Leica 현미경의 소프트웨어는 LIF 포맷, Zeiss 현미경의 소프트웨어는 LSM 포맷으로 이미지를 저장하여 분석한다.

이들 영상 분석 소프트웨어는 정량 분석을 위해 이미지에 기록된 형광이나 색깔의 강도(intensity)를 측정한다. 그런데 생물막은 3차원 구조라는 점이 생물막 정량에 고려되어야 한다. 그러나 3차원 이미지의 정량과 분석이 어렵기 때문에 여러 생물막 연구 그룹에서 이를 해결하기 위한 COMSTAT이라는 전용 소프트웨어 패키지를 개발하였다. 이 소프트웨어

는 생물막의 3차원 구조로부터 biomass, height, distribution, roughness, thickness average, substratum coverage 등 세부화된 항목에 따라 생물막을 정량적으로 분석할 수 있게 만든 알고리즘으로써, MATLAB이나 image J 등의 소프트웨어 내에서 구동된다(Heydorn *et al.*, 2000a, 2000b).

맺음말

지금까지 설명한 여러 생물막 형성 모델들과 이들을 분석하기 위한 새로운 방법들의 개발은 실험실에서 여러 다양한 특성을 갖는 생물막들을 모사할 수 있게 하였으며, 실시간 관찰을 통해 생물막 발달과정의 세부적인 부분과 생물막 구조 및 기능의 변화와 분화 등을 밝힐 수 있게 하였다. 또한 생물막 형성과정에서 미생물들이 보여주는 행동 양식을 단일 세포 수준에서부터 연구할 수 있는 기반을 제시하였다. 따라서 이러한 여러 모델들과 방법들에 대한 이해는 생물막에 대한 새로운 시야를 가지고 보다 발전된 연구를 하기 위한 필수적인 요소라 할 수 있다.

적 요

생물막은 미생물들의 표면 부착 성장으로부터 유래된 복잡하게 구조화된 미생물들의 군집이다. 인간의 삶속에서 생물막은 다양한 감염을 매개하고 여러 사회, 문화, 산업 시설물들에서 많은 문제를 일으킨다. 생물막에 대한 이해가 과학자들에게 큰 관심을 끌고 있기는 하지만, 자연계에 존재하는 다양한 생물막을 직접 연구하는 것은 매우 어렵다. 따라서 다양한 연구실에서 생물막을 형성하기 위한 다양한 모델 시스템들이 제안되어 왔으며, 이들 모델에 기반한 많은 생물막 연구 방법들이 실제 생물막 연구에 쓰이고 있다. 이러한 생물막 모델들은 실제 환경속의 생물막들의 특징들을 모사하고 있지만 각기 나름대로의 장단점들을 가지고 있다. 본 리뷰에서는 현재 사용되고 있는 생물막 모델 시스템들을 소개하고, 그들의 장단점들을 설명하고자 한다.

감사의 말

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., and Dewhirst, F.E. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732.
- Adetunji, V.O. and Odetokun, I.A. 2012. Assessment of biofilm in *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* strains: Influence of cultural conditions. *Am. J. Food Technol.* **7**, 582–595.
- Al-Ahmad, A., Wunder, A., Auschill, T.M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E., and Arweiler, N.B. 2007. The *in vivo* dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by fivecolour multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *J. Med. Microbiol.* **56**, 681–687.
- Ali, A., Khambaty, F., and Diachenko, G. 2006. Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. *Bioresour. Technol.* **97**, 1887–1893.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114–1128.
- Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J.L., and Hernandez-Yago, J. 1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 43–55.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1818–1824.
- Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S.J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105–107.
- Benoit, M.R., Conant, C.G., Ionescu-Zanetti, C., Schwarz, M., and Matin, A. 2010. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4136–4142.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M., and Hoiby, N. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **44**, 547–558.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., and Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* **37**, 77–86.
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D.M., and Hamilton, M.A. 2007. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *J. Microbiol. Methods* **70**, 236–244.
- Buckingham-Meyer, K., Heersink, J., Pitts, B., Rayner, J., and Werner, E. 2003. Alternative biofilm growth reactors. In Hamilton, M., Heersink, J., Buckingham-Meyer, K., and Goeres, D. (eds.), The biofilm laboratory: Step-by-step protocols for experimental design, analysis, and data interpretation, pp. 31–51. Cytergy Publishing, Bozeman, USA.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., and Ward, W.W. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., and Ghannoum, M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385–5394.
- Cloete, T.E., Brozel, V.S., and Von Holy, A. 1992. Practical aspects of biofouling control in industrial water systems. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **29**, 299–341.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., and Parsek, M.R. 2011. The *pel* polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **7**, e1001264.
- Conant, C.G., Schwartz, M.A., and Ionescu-Zanetti, C. 2010. Well plate-coupled microfluidic devices designed for facile image-based cell adhesion and transmigration assays. *J. Biomol. Screen* **15**, 102–106.
- De La Fuente, L., Montanes, E., Meng, Y., Li, Y., Burr, T.J., Hoch, H.C., and Wu, M. 2007. Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2690–2696.
- De Prijck, K., De Smet, N., Rymarczyk-Machal, M., Van Driessche, G., Devreese, B., Coenye, T., Schacht, E., and Nelis, H.J. 2010. *Candida albicans* biofilm formation on peptide functionalized polydimethylsiloxane. *Biofouling* **26**, 269–275.
- De Prijck, K., Nelis, H., and Coenye, T. 2007. Efficacy of silver-releasing rubber for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in water. *Biofouling* **23**, 405–411.
- Diaz, P.I., Chalmers, N.I., Rickard, A.H., Kong, C., Milburn, C.L., Palmer, R.J.Jr., and Kolenbrander, P.E. 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2837–2848.
- Dietrich, L.E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., and Newman, D.K. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1308–1321.
- Dige, I., Nilsson, H., Kilian, M., and Nyvad, B. 2007. *In situ* identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *Eur. J. Oral Sci.* **115**, 459–467.
- Dige, I., Raarup, M.K., Nyengaard, J.R., Kilian, M., and Nyvad, B. 2009. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* **155**, 2116–2126.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–193.
- Donlan, R.M., Priede, J.A., Heyes, C.D., Sani, L., Murga, R., Edmonds,

- P., El-Sayed, I., and El-Sayed, M.A. 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms *in situ* and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4980–4988.
- Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P., and McDermott, T.R. 1999. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4594–4600.
- Eun, Y.J. and Weibel, D.B. 2009. Fabrication of microbial biofilm arrays by geometric control of cell adhesion. *Langmuir* **25**, 4643–4654.
- Freitas, A.I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., and Cerca, N. 2013. Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. *J. Basic Microbiol.* **54**, 750–757.
- Friedman, L. and Kolter, R. 2004a. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**, 675–690.
- Friedman, L. and Kolter, R. 2004b. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**, 4457–4465.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**, 34–40.
- Goeres, D.M., Hamilton, M.A., Beck, N.A., Buckingham-Meyer, K., Hilyard, J.D., Loetterle, L.R., Lorenz, L.A., Walker, D.K., and Stewart, P.S. 2009. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat. Protoc.* **4**, 783–788.
- Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W., and Donlan, R.M. 2005. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* **151**, 757–762.
- Hadi, R., Vickery, K., Deva, A., and Charlton, T. 2010. Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. *J. Hosp. Infect.* **74**, 160–167.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. 2007. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch. Oral Biol.* **52**, 1048–1056.
- Hans-Curt, F. and Jost, W. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633.
- Heersink, J. and Goeres, D. 2003. Reactor design considerations. In Hamilton, M., Heersink, J., Buckingham-Meyer, K., and Goeres, D. (eds.), *The Biofilm Laboratory: Step-by-step Protocols for Experimental Design, Analysis, and Data Interpretation*, pp. 13–15. Cytergy Publishing, Bozeman, USA.
- Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F., and Götz, F. 1996. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* **64**, 277–282.
- Heydon, A., Ersbøll, B.K., Hentzer, M., Parsek, M.R., Givskov, M., and Molin, S. 2000a. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* **146**, 2409–2415.
- Heydon, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., and Molin, S. 2000b. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395–2407.
- Im, S.J. 2011. Differential regulation of genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm depending on spatial structure. Master thesis, Pusan National University.
- Janakiraman, V., Englert, D., Jayaraman, A., and Baskaran, H. 2009. Modeling growth and quorum sensing in biofilms grown in microfluidic chambers. *Ann. Biomed. Eng.* **37**, 1206–1216.
- Jung, Y.G., Choi, J., Kim, S.K., Lee, J.H., and Kwon, S. 2015. Embedded biofilm, a new biofilm model based on the embedded growth of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 211–219.
- Kim, J., Park, H.J., Lee, J.H., Hahn, J.S., Gu, M.B., and Yoon, J. 2009. Differential effect of chlorine on the oxidative stress generation in dormant and active cells within colony biofilm. *Water Res.* **43**, 5252–5859.
- Krom, B.P., Cohen, J.B., McElhaney Feser, G.E., and Cihlar, R.L. 2007. Optimized candida biofilm microtiter assay. *J. Microbiol. Methods* **68**, 421–423.
- Kwok, W.K., Picioreanu, C., Ong, S.L., van Loosdrecht, M.C.M., Ng, W.J., and Heijnen, J.J. 1998. Influence of biomass production and detachment force on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 400–407.
- Lambertsen, L., Sternberg, C., and Molin, S. 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* **6**, 726–732.
- Lawrence, J.R., Neu, T.R., and Swerhone, G.D.W. 1998. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *J. Microbiol. Methods* **32**, 253–261.
- Lazarova, V.Z., Capdeville, B., and Nikolov, L. 1992. Biofilm performance of a fluidized bed biofilm reactor for drinking water denitrification. *Water Sci. Technol.* **26**, 555–666.
- Lee, J.H., Kaplan, J.B., and Lee, W.Y. 2008. Microfluidic devices for studying growth and detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Biomed. Microdevices* **10**, 489–498.
- Mittelman, M.W., Nivens, D.E., Low, C., and White, D.C. 1990. Differential adhesion, activity and carbohydrate: protein ratios of *Pseudomonas atlantica* monocultures attaching to stainless steel in a linear shear gradient. *Microb. Ecol.* **19**, 269–278.
- Moller, S., Korber, D.R., Wolfaardt, G.M., Molin, S., and Caldwell, D.E. 1997. Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2432–2438.
- Niu, C. and Gilbert, E.S. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6951–6956.
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis.*

- Exp.* **30**, 2437.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295-304.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49-79.
- Palmer, R.J.Jr.** 2010. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **31**, 104-106.
- Pamp, S.J., Sternberg, C., and Tolker-Nielsen, T.** 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* **75**, 90-103.
- Peeters, E., Nelis, H.J., and Coenye, T.** 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* **72**, 157-165.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N., and Stewart, P.S.** 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* **54**, 269-276.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., and Bennett, B.C.** 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 418-428.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Enders, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S., and Bayles, K.W.** 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8113-8118.
- Richter, L., Stepper, C., Mak, A., Reinthaler, A., Heer, R., Kast, M., Brückl, H., and Ertl, P.** 2007. Development of a microfluidic biochip for online monitoring of fungal biofilm dynamics. *Lab Chip* **7**, 1723-1731.
- Schaudinn, C., Carr, G., Gorur, A., Jaramillo, D., Costerton, J.W., and Webster, P.** 2009. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J. Microsc.* **235**, 124-127.
- Shapiro, J.A.** 1984. The use of Mudlac transposons as tools for vital staining to visualize clonal and non-clonal patterns of organization in bacterial growth on agar surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1169-1181.
- Shen, Y., Stojicic, S., and Haapasalo, M.** 2010. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J. Endod.* **36**, 1820-1823.
- Stepanovic, S., Djukic, V., Djordjevic, V., and Djukic, S.** 2003. Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 955-958.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J.B., Givskov, M., and Molin, S.** 1999. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4108-4117.
- Stewart, P.S. and Franklin, M.J.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 199-210.
- Stewart, P.S., Murga, R., Srinivasan, R., and de Beer, D.** 1995. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Res.* **8**, 2006-2009.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F., and Rees, W.M.** 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 525-532.
- Strathmann, M., Wingender, J., and Flemming, H.C.** 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* **50**, 237-248.
- Van den Driessche, F., Rigole, P., Brackman, G., and Coenye, T.** 2014. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J. Microbiol. Methods* **98**, 31-34.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., and Heijnen, J.J.** 1995. Biofilm structures. *Water Sci. Technol.* **32**, 35-43.
- Vieira, M.J., Melo, L.F., and Pinheiro, M.M.** 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* **7**, 67-80.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., Caldwell, S.J., and Caldwell, D.E.** 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 434-446.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al.** 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* **109**, 317-325.
- Wotton, R.S. and Preston, T.M.** 2005. Surface films: areas of water bodies that are often overlooked. *Bioscience* **55**, 137-145.
- Yamamoto, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y.** 2011. Trade-off between oxygen and iron acquisition in bacterial cells at the air-liquid interface. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 83-94.
- Yang, L., Haagenen, J.A.J., Jelsbak, L., Johansen, H.K., Sternberg, C., Høiby, N., and Molin, S.** 2008. *In situ* growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J. Bacteriol.* **190**, 2767-2776.
- Zilver, N., Hamilton, M., Pitts, B., Goeres, D., Walker, D., Sturman, P., and Heersink, J.** 1999. Measuring antimicrobial effects on biofilm bacteria: from laboratory to field. *Methods Enzymol.* **310**, 608-628.