

인산염 농도에 따른 물성 변화로 발생하는 황색포도상구균 바이오필름 제거 현상

송 상 훈 · 황 병 우 · 손 성 길 · 강 내 규[†]

LG생활건강 기술연구원

(2021년 12월 21일 접수, 2021년 12월 28일 수정, 2021년 12월 29일 채택)

Phosphate Concentration Dependent Degradation of Biofilm in *S. aureus* Triggered by Physical Properties

Sang-Hun Song, Byung Woo Hwang, Seong Kil Son, and Nae-Gyu Kang[†]

LG Household & Health Care Ltd, 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Korea

(Received December 21, 2021; Revised December 28, 2021; Accepted December 29, 2021)

요 약: 본 연구는 인체 친화적인 소재로 균을 제거하는 기술을 만들기 위해서 진행하였다. 균총 상호 균형에 중요한 역할을 하는 황색포도상구균이 바이오필름을 생성시킬 때 다양한 농도의 인산염 투입시 나타나는 물성 변화를 조사하였다. 원자현미경을 이용해서 인산염 5 mM 처리시 황색포도상구균 바이오필름의 크기와 경도가 통계적으로 유의차가 있게 최소값을 가짐을 관찰하였다. 염료 태깅법으로 흡광도를 관찰한 결과 인산염과 함께 성장한 전체 바이오필름의 농도도 감소한 것을 발견하였다. 이것이 카운터 이온으로서 작용하는 염에 의한 영향 인지 확인하기 위하여 소금을 같은 조건에서 처리해보았는데 이때는 바이오필름의 농도 감소가 관찰되지 않았고 이를 통해 인산염이 특별한 생리적인 작용에 관여함을 알 수 있었다. 비행시간형 이차이온 질량분석기를 통해서 이온 검출량을 평가하여 바이오필름 구성성분을 분석한 결과 인산염을 투입하기 전과 후의 모든 바이오필름 외곽에서 세균막만 감지되었는데 특별히 인산염 5 mM에서 이 세균막의 농도가 가장 낮음을 확인하였다. 바이오필름 내부에 어떤 물성 변화가 일어났는지 관찰하기 위해서 시어 응력을 조절하는 유변기로 바이오필름의 점탄성 특징을 측정을 하니 인산염 5 mM에서 바이오필름의 점도는 변화하지 않았으나 탄성률 감소가 일어난 것을 관찰하였다. 이것을 통해 인산염이 5 mM인 환경에서 균은 내부 탄성률 감소를 통해서 세균막을 탈피시키는 것을 알 수 있었다. 인산염 농도 5 mM에서 관찰되는 세균막 농도 감소는 균이 더 많은 성장을 하기 위해 다른 곳으로 이동하기 쉽게 하기 위해서 스스로 표면에서 탈착하는 것과 연관이 있음을 제시하였다. 마침내 인산염을 투입하면 균의 세균막 제거가 유도되어 결론적으로 황색포도상구균이 쉽게 제거될 수 있음을 밝혀내었다.

Abstract: The objective of this study was to establish technology for removing bacteria with human- and eco-friendly material. *Staphylococcus aureus* as an important component for balanced equilibrium among microbiomes, was cultured under various concentrations of phosphate. Experimental observation relating to physical properties was performed in an addition of phosphate buffer. Statistically minimum value of size and hardness using atomic force microscope was observed on the matured biofilm at 5 mM concentration of phosphate. As a result of absorbance for the biofilm tagged with dye, concentration of biofilm was reduced with phosphate, too. To identify whether this reduction by phosphate at the 5 mM is caused by counter ion or not, sodium chloride was treated to the biofilm under the same condition. To elucidate components of the biofilm counting analysis of the biofilm using time-of-flight secondary ion mass spectrometry was employed. The secondary ions from the biofilm revealed that alteration of physical properties is consistent to the change of extracellular polymeric substrate (EPS) for the biofilm. Viscoelastic characterization of the biofilm using a controlled shear stress rheometer, where internal change of physical properties could be detected, exhibited a static viscosity and a reduction

[†] 주 저자 (e-mail: ngkang@lghnh.com)
call: 02-6980-1533

of elastic modulus at the 5 mM concentration of phosphate. Accordingly, bacteria at the 5 mM concentration of phosphate are attributed to removing the EPS through a reduction of elastic modulus for bacteria. We suggest that the reduction of concentration of biofilm induces dispersion which assists to easily spread its dormitory. In conclusion, it is elucidated that an addition of phosphate causes removal of EPS, and that causes a function of antibiotic.

Keywords: biofilm, *S. aureus*, AFM, TOF-SIMS, phosphate

1. 서 론

피부 표면의 각질층에 오일층을 만들어 피부장벽의 유수분 균형을 이루게 하기 위해 피지는 필수적인 요소이다 [1]. 하지만 피지가 과다 분비되면 여드름균 같은 두피 상재균이 증가하여 지루성염증, 비듬, 두피취 등의 두피 트러블을 야기하고[2-4], 탈모[5-7] 등을 유발한다. 한편 여드름균을 햄스터 피부에 이식하니 역으로 피지 분비량이 증대된 연구가 있다[8,9]. 이처럼 균 성장과 피지량은 어느 한쪽이 원인이라 말할 수 없는 관계로 엮여있다.

피지에 의해서 일어나는 문제를 해결하기 위한 방편으로 인체에 무해한 아미노산 계열에서 해결하고자 하는 방법들이 시도되었다. D-leucine, D-methionine, D-tyrosine, D-tryptophan 이 *Bacillus subtilis* 균의 바이오필름에 작용하면 바이오필름과 세포간의 아밀로이드 섬유를 완화시켜 바이오필름의 형성을 억제하는 효능이 있음이 밝혀졌다[10]. 프롤린과 하이드록시프롤린도 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다[11]. 공융용매(deep eutectic solvent)를 이용해서 구강균을 제거하기도 한다[12].

이런 소재들은 균 성장을 억제시키는 효능을 보기 위해 의도적으로 첨가하는 것인데, 흥미롭게도 생물이 자라는 환경에 존재해서 생물 실험에서 용해제로 쓰고 있는 인산염 버퍼가 항균작용을 일으키는 결과들이 있다. 대장균은 인산염 10 mM 이하에서는 영향을 받지 않으나 40 mM의 고농도에서 퀴럼센싱(quorum sensing)에 의해 대다수가 제거된다 [13]. *Pseudomonas aureofaciens* (*P. aureofaciens*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*)도 퀴럼센싱에 의해 인산염으로 바이오필름의 생성이 억제된다[14]. 흙의 농도는 인산염이 2 mM인데 *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia tropica* (*B. tropica*), *Burkholderia unamae* (*B. unamae*)에서 인산염이 과다 투입되면 특별히 흙에서 작용하는 환경과 달라서 바이오필름이 성장하지 않게 됨이 밝혀졌다[15]. 이처럼 인산염은 균의 성장에 밀접한 관여를 할 수 있다.

두피 및 피부에는 많은 세균이 있다. 이 세균들은 균총간 상호 균형을 이루어 개체수의 평형을 이루고 있어서 어

느 것 하나만 좋거나 해롭다고 말할 수 없다. 분명한 것은 피부에서 표피포도상구균은 효소 작용을 통해서 황색포도상구균의 개체수를 조절하며[16], 항균 작용으로 여드름균의 증식을 제어한다[17]. 여드름균은 pH 조절에 관여해서 황색포도상구균의 개체수를 조절한다[18].

이와 같은 이유로 최근에는 실제 여드름 치료나 다른 피부 질환에 있어서 황색포도상구균을 다른 균과 함께 통제하는 방법이 진행되고 있다[19,20]. 본 연구에서는 인산염이 특별히 황색포도상구균에 미치는 영향을 관찰하여 특이적인 현상을 이해하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 황색포도상구균 바이오필름 배양

황색포도상구균(ATCC6538, 생물자원센터, Korea)을 37 °C에서 7 일간 성장시켰다. OD 1.3 까지 배양하고 5 min 동안 5,000 G로 원심분리 하였다. 증류수 1.5 mL를 펠레이트에 넣고 vortex 교반한 후 다시 5,000 G로 5 min 동안 원심분리 하였다. 1 h 동안 37 °C에서 부유 상태(planktonic state)로 media에서 성장시키고 증류수로 세정을 한 후에 실험 조건에 따라 인산염도 함께 적정농도로 투입하였다. 직경 6 cm 패트리디쉬(SPL Corporation, Korea) 바닥에 0.45 µm membrane filter를 두고 균이 있는 인산염 용액 1 mL 채우고 60 min간 발현시켰다. 그 후에 멤브레인필터(membrane filter)를 꺼내어 자연건조시켰다.

바이오필름의 세포는 5000 G로 NaCl 용액에 30 min 동안 원심분리하고 남은 펠렛(pellet) 부분에서 취하였고 부유물(supernatant)을 세균막(extracellular polymeric substrate, EPS)으로 취하고 동결건조하여 얻었다.

2.2. 원자현미경 측정

바이오필름의 세포와 세균막의 크기 및 경도를 측정하기 위해서 원자현미경(atomic force microscope, AFM)을 사용하였다. XE-100 모델 Parksystems (Korea) 제품을 사용하고 모든 모드는 scan rate을 1 Hz로 컨택모드로 측정하였

다. 바이오필름 세포가 건조되면 세포 경도가 달라질 수 있기 때문에 액상에서도 측정할 수 있게끔 AFM 팁을 수중 보호 밴드(Parksystems, Korea)를 착용시켜 측정하였다. 경도 측정을 시행할 경우에는 컨택모드로 측정된 이미지에 그대로 수직으로 입사시킬 지점을 FD (Force-distance) 모드로 지정해서 값을 얻었다. AFM 팁은 바이오필름이 제거된 후 세포의 경도가 크다면 팁이 손상될 수 있으니 비접촉 측정에 사용되는 평형상수가 $42 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ 로 높은 PPP-NCHR (Nanosensors, USA)을 사용해서 측정하였다. 수직 입사 속도는 $4 \times 10^{-5} \mu\text{m}/\text{ms}$ 으로 했다. Drive amplitude는 60 mV로 했고, 바이오필름을 누르는 힘(initial amplitude setpoint)은 1.0 V로 고정해서 측정하였다.

2.3. 바이오필름 농도 측정

황색포도상구균을 배양하는 액에서 배양하기 시작할 때 크리스털 바이올렛(crystal violet) 염료를 0.01% 농도로 첨가하여 바이오필름과 태깅시켰다[21]. 세포배양액을 흡광도 OD 600 까지 마이크로 플레이트(Coming, USA)에서 성장시킨 후 마이크로 플레이트용 분광측정기(Varioskan LUX, Thermo scientific, USA)로 흡광도를 평가하여 바이오필름의 성장 과정을 관찰하였다.

2.4. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) Characterization

비행시간형 이차이온 질량분석기(TOF-SIMS)실험은 기초과학지원연구원(Busan, Korea)의 TOF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Muenster, Germany) 장비로 측정하였다. 주요 펄스 빔은 30 keV Bi_3^{++} 이고 전류는 0.20 pA로 정해서 찍었다. 분석 목표 면적은 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 으로 설정하였다. 음이온 스펙트럼은 H, C, C2, C3, C4 스펙트럼들을 두 번째 전체 이온값(secondary total ion yields)에 정량화시켜(normalization) 얻었

다. 평가 이미지들은 $256 \times 256 \text{ pixel}$ 분해능으로 취합하였다. 이차이온은 아무 것도 증착하지 않은 운모 대비해서 이차이온이 많이 검출된 것을 합산하였는데, O 질량 15.00, 26.00, 42.00, 62.96, 78.96, 96.97과 질량 199.15 $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2$, 질량 241.22 $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{O}_2$, 질량 255.23 $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$ 에서 검출하였다.

2.5. 유변학 측정

점도와 탄성 평가는 유변분석기(Discovery HR-3, TA Instruments, USA)에 60 mm 짜리 스테인리스 스틸 평행 판 두 개를 장착시키고 25 °C에서 평가하였다. 바이오필름 10 mL 용액을 판과 판 사이를 0.5 mm로 맞추고 두고 측정하였다.

2.6. 물질

인산염은 sodium phosphate monobasic dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)과 sodium phosphate dibasic dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)을 대정화금(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 먼저 물에 각각 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 68.4 mL와 1 M 31.6 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 용액을 섞어서 pH가 7.2인 상태로 만들어 사용하였다. 소금은 Sigma-aldrich (US)에서 구입하였다.

3. 결과 및 고찰

황색포도상구균을 기른 후에 부유 상태의 균을 운석 디스크 위에 붓고 AFM으로 액상 상태에서 표면을 관찰하였다. 황색포도상구균이나 대장균을 부유상태에서 고체 평면 위에 올려 원자현미경으로 관찰하면 바닥 위에 둥그렇게 세로가 긴 형태로 솟아있는 것을 관찰할 수 있는데 이것은 세포와 세균막을 포함한 바이오필름을 뜻한다[22,23]. 아무것도 없는 운모디스크는 평평하게 관찰되는데(data not shown), Figure 1에서 보이는 이미지들은 모두 황색포도상구균이 고르게 흡착된 것을 보이고 있다.

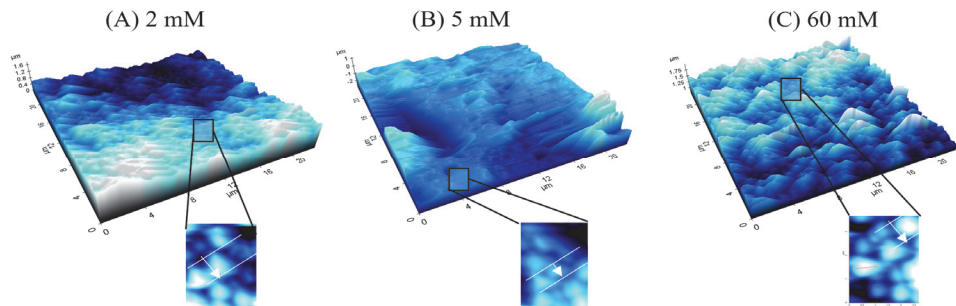


Figure 1. Size of biofilm for *S. aureus* as concentration of PO_4^{4-} increases. Image of small box was obtained from AFM ($2.5 \mu\text{m} \times 4.0 \mu\text{m}$). White arrows represent size dependence of biofilm upon concentration of PO_4^{4-} .

다양한 농도의 인산염을 하루 동안 투입하여 바이오필름을 관찰한 결과, 특히하게도 특정 농도에서 크기가 감소하는 것을 관찰하였다. 특별히 5 mM에서 바이오필름의 크기가 가장 작아졌다. 평균적으로 크기는 1.47 μm (± 0.3)의 길이를 보였는데 5 mM에서는 평균 0.89 μm (± 0.1)의 길이가 관찰되었다. 동일한 성분의 액상에서 세균의 크기가 크게 수축 또는 팽창하지 않는다고 가정할 때 이 길이 차이는 세균을 둘러싼 세균막의 변화를 반영할 것이다. 따라서 인산염 5 mM에서 세균막이 제거되는 것으로 생각할 수 있다.

인산염은 균의 생리화학적 환경 조건을 다르게 인지시켜 균의 성장 농도를 변화시킨다[13-15]. 따라서 Figure 1에서 인산염이 변화시킨 세균막 크기 변화가 바이오필름의 물성과 변화가 있는지 살펴보기 위해서 원자현미경으로 경도를 측정하고 바이오필름 농도도 함께 측정하였다.

바이오필름을 성장시키고 자연건조시킨 후, 원자현미경으로 이미지를 측정하였다. 그 중에서 가장 높은 부분을 나노인덴터 모드로 찍었는데 경도값이 16.51 N/m이었다. 다 성장한 바이오필름에 5 mM 인산염을 함유한 액에 1 h 노출시킨 바이오필름은 경도가 3.68 N/m로 감소하는 것을 통계적으로 유의차 있게 관찰하였다. 그런데 인산염의 농도가 증가할수록 경도가 다시 유의차와 함께 증가하는 것을 볼 수 있었다.

이 물성변화가 실제 균의 농도에 어떤 영향을 미쳤는지 염료(crystal violet)로 바이오필름과 태깅시켜 염색한 후 흡광도를 관찰하니 마찬가지로 균의 농도가 인산염이 투입되니

통계적으로 유의차가 있게 감소했으며 5 mM 정도에서 값이 낮은 것을 확인하였다. 인산염의 농도를 계속해서 증가시킬 때 바이오필름의 농도의 변화가 약간 관찰되기는 하였지만 통계적으로 유의차는 관찰되지 않았다. Figure 1과 Figure 2를 종합해 볼 때, 인산염이 바이오필름의 세균막 강도를 감소시키는 효능이 있고 이를 통해 세균막의 크기가 줄어들었으며 전체적으로 바이오필름 농도 변화는 관찰되지 않았다.

인산염 외에 카운트 이온의 염이 바이오필름의 성장에 작용하는 것인지 검증하기 위해서 소금을 바이오필름 용액에 투입하여 성장량을 흡광도로 찍는 실험을 총 5 회 반복하여 Figure 3과 같이 평균값을 얻었다. 염은 소금 단독액 또는 소금과 동일 농도로 맞춘 소금과 인산염을 혼합액을 사용하였다. Figure 3에서 가로축은 황색포도상구균의 부유액을 운모 디스크에 넣고 1 h 동안 균에 투입시킨 소금 또는 소금과 인산염의 농도를 뜻한다.

Figure 3에서 알 수 있는바와 같이 소금만 투입하였을 경우의 흡광도 변화 측정값을 비선형 지수 수리 분석을 통해서 얻은 곡선 그래프로 보면 황색포도상구균의 농도가 소금액 100 mM까지 증가하는 것을 알 수가 있어서 황색포도상구균의 성장이 활발해진 것을 알 수 있다. 이에 반해, 인산염이 함께 투입되었을 경우에는 100 mM에서는 최소 농도를 보이고 있지만 인산염 최종 농도와 비교할 때 통계적 유의차가 평가되지 않았다(data not shown). 다만, 비선형 지수 곡선 그래프를 통해서 포물선을 그리며 400 mM 이상의 농도에서 다시 세포수가 증가하는 것을 볼 수

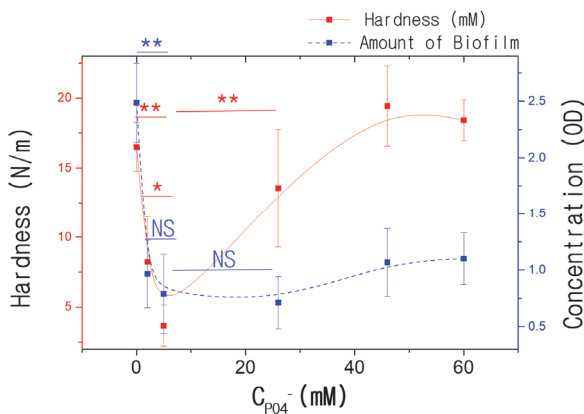


Figure 2. Hardness (left axis) and concentration (right axis) of biofilm for *S. aureus* as concentration of phosphate increases. The lines above the points denote a significant difference (N = 5) calculated using student's *t*-test. NS – not significant, **p* < 0.05, and ***p* < 0.01.

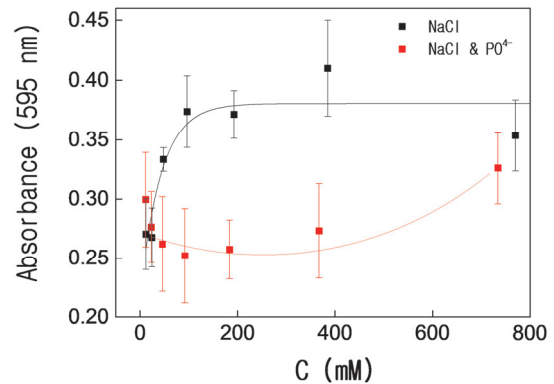


Figure 3. Temporal development of absorbance of cell as the concentration of counter ions increases. Absorbance in the pure solution of sodium chloride was compared to that in the addition of 8 mM phosphate (N = 5). Non-linear exponential fit was depicted as solid line. The curve was obtained by an equation of $y = y_0 + A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + A_2 \cdot \exp(-x/t_2)$. pH was adjusted to 7.6.

가 있다. Figure 2에서 인산염 5 mM에서 개체 성장 최소 농도수를 보였던 것과 비교하면 최소 개체 농도가 증가하였는데 이것은 소금의 영향으로 황색포도상구균에 작용한 성장 환경이 달라져서 황색포도상구균의 성장 인자가 달라져서라고 생각된다. 하지만 인산염 투입은 Figure 2와 Figure 3의 두 결과에서 모두 인산염 농도가 증가할 때 바이오필름의 농도가 감소하게 됨을 알 수 있다.

과거에는 균을 죽임으로써 병리학적인 문제를 해결하기 위해 노력해왔으나, 최근에는 균이 생성하는 바이오필름을 고려해야 함이 밝혀졌다[24]. 바이오필름은 균과 그 균을 에워싸는 폴리머로 이루어진 세균막(EPS)으로 이루어져 있다. 균은 세균막에 의해 스스로를 보호할 수 있는 한편, 외부 환경으로부터 받는 자극으로부터 스스로를 방어하기 위해서도 이 세균막이 필요하다[25]. 비행시간형 이차이온 질량분석기(TOF-SIMS)를 이용하면 표면에 있는 물질의 종류를 구분할 수 있는데 세포 시료에도 이용되고 있으며 [26] 최근에는 바이오필름 연구에 세균막을 이미지화 하는 데도 사용되고 있다[27].

TOF-SIMS 실험 결과 특별히 질량 241.22 $C_{15}H_{29}O_2$ 에서는 균의 신호가 강했고, 세균막에서는 특별히 질량 199.15인 $C_{12}H_{23}O_2$ 의 신호가 상대적으로 강하였다. 다양한 농도로 바이오필름에 인산염을 처리하였을 때 특별하게 $C_{15}H_{29}O_2$ 의 스펙트럼 신호가 더 높지는 않았는데, 이것은 여전히 바이오필름이 전체적으로 세균막으로 덮여있어서 세균막 신호가 검출되고 있음을 뜻한다.

따라서 Figure 4에서 보이는 이미지들은 인산염 처리에 따른 세균막의 농도를 뜻하는 것으로 볼 수 있는데 그 농

도가 5 mM에서 최저점을 가르키며 60 mM이 되었을 때 조금씩 성장하여 다시 회복되고 있는 것을 통계적 유의차로 알 수가 있다. 즉, Figure 2에서 바이오필름 전체의 농도 변화는 통계적 유의차 있게 관찰되지 않았으나 Figure 4에서의 세균막의 변화의 관찰은 인산염이 균의 세균막 성장을 조절하고 있는 것임을 알 수가 있다.

인산염이 균이 만들어내는 세균막의 성장을 저하시킴으로써 세균막의 크기와 농도가 5 mM에서 최저로 감소함을 관찰하였다. 인산염의 투입이 일으키는 균의 성장환경이 균의 내부에 어떻게 작용해서 개체수 변화를 일으키는 지 알아보기 위해서 유변기기를 이용해서 점탄성률을 Figure 5와 같이 측정하였다.

시어 비율(shear rate), γ 는 $0.01\ s^{-1}$ 내지 $100\ s^{-1}$ 로 맞추었

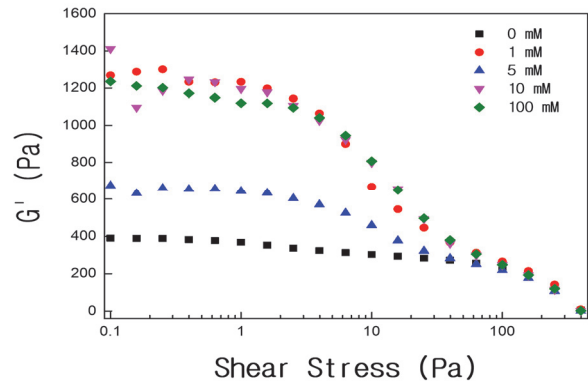


Figure 5. Viscoelastic modulus of biofilm as a function of shear stress. Experimental data acquisition was done at various concentrations of phosphate buffer.

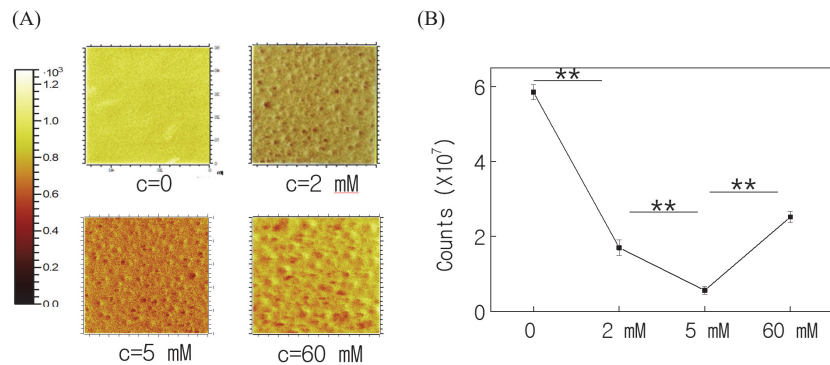


Figure 4. Secondary ion was formed by electron exchange processes in the biofilm. (A) The analyzed area used in this work is a square of $50\ \mu m \times 50\ \mu m$. The chemical images of the analyzed area are recorded with 256×256 pixel resolution during the data acquisition. (B) Averaged count ions reflects cell concentration using TOF-SIMS images. The lines above the points denote a significant difference ($N=5$) calculated using student's *t*-test. NS – not significant, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$.

고 탄성 η 는 $\eta = \frac{\sigma}{\gamma}$ 로 계산되는데 단, 여기서 σ 는 응력 (shear stress)이다[28]. 응력을 증가시키면서 바이오필름에 가해지는 점탄성율을 유변기기로 측정하였는데, 점성에는 변화를 관찰하지 못하였다(data not shown). 그런데 Figure 5에서와 같이 인산염의 투입에 따른 탄성률의 변화를 확인할 수가 있었다.

인산염이 없었을 경우에는 바이오필름의 탄성률이 400 Pa로 평가되었고 시어 응력이 증가할수록 서서히 감소하였다. 인산염이 투입된 환경에서 성장한 바이오필름의 탄성률은 이보다 크게 증가한 것을 알 수 있다. 이를 통해서 균은 일정농도로 인산염을 투입 받으면 생장에 필요한 조건이 충족되어 세균막 팽창을 통해 균 개체수를 성장시키는 것을 알 수가 있다.

그런데 인산염의 농도 5 mM에서는 갑자기 탄성이 상대적으로 감소하였는데 여전히 인산염이 없었을 경우보다는 탄성이 큰 것을 알 수가 있다. 이 점탄성계의 탄성률은 바이오필름 내부 결합력을 반영한다. Figure 2에서 바이오필름의 농도가 감소하였음과 Figure 1과 Figure 4에서 세균막의 감소를 볼 때, 바이오필름의 영역확장 및 축소는 인산염 농도 5 mM에서 일어나는 내부 결합력과 연관됨을 알 수 있다.

이 탄성률의 감소는 바이오필름의 내부 네트워크 결합력에 변화가 생겼음을 제시한다. 탄성률이 감소했음은 균이 정착해 있으면서 군집해있기 보다 탈착할 수 있는 상태에 가까움을 시사한다. 균은 성장하기 최적합한 환경으로 인지하여 자발적으로 다른 환경으로 분산하는 영역확장 (dispersion)을 한다[29]. 인산염의 농도가 5 mM 정도로 증가하였을 때 영역확장을 위해서 균이 바이오필름의 내부 결합력을 감소시켜 세균막의 크기와 농도를 줄이는 것인지는 현재로서는 불명확하지만 조심스럽게 연관성을 유추해 본다. 향후 균이 실제 영역확장을 하였는지 확인하기 위해서 원자현미경으로 추적하는 추가 연구가 필요해 보인다.

대장균 바이오필름에 인산염을 투입하여 성장시키면 바이오필름의 농도가 감소하는데 인산염 처리 시간을 증가시키면 대장균 바이오필름의 농도가 다시 증가한다[13]. 마찬가지로 추가적으로 인산염의 농도를 증가시키니 다시 바이오필름의 탄성이 증가하는 것을 볼 수가 있는데 이것은 바이오필름의 결합력이 다시 증가하고 있음을 의미한다. 더 많은 인산염에서는 외부환경으로부터 균을 보호하기 위해서 균의 세균막을 생성시키는 퀴럼센싱이 일어났을 가능성을 제시하고 있다[30].

4. 결 론

균은 세균막을 성장시켜 자신을 보호하고 성장하는데 무한대로 성장하는 것이 아니라 외부환경에 있는 성분들과의 신호전달을 통해서 바이오필름을 성장시키게 된다. 인산염을 투입하였을 경우 특별히 5 mM에서 세균막의 크기가 작아지고 경도가 약화됨을 보았고 균에 태깅시킨 물질의 흡광도를 통해 균 전체의 개체수가 감소함을 확인하였다. 이렇게 감소되고 변화하는 것이 무엇인지 추적하기 위해서 TOF-SIMS로 이차이온 개수를 평가해보니 세균막의 개체수 감소를 감지하였다. 이 세균막의 개체수 변화의 원인을 알아보기 위해서 점탄성을 측정하는 유변학 기기로 탄성률을 측정해보니 탄성률이 감소한 것을 보았다. 이를 통해서 내부 결합력의 감소가 균의 변화를 만들고 있음을 확인하였다.

본 연구는 항진균제를 통해서 균을 제거하는 현실에서 생체 환경에 있는 인체에 유해하지 않은 인산염을 이용하면 균의 개체수를 감소시킬 수 있음을 제시하고 있다. 다만, 인산염이 5 mM 투입되었을 때 탄성률 감소 효과가 인산염이 있다해도 투입되지 않은 환경과 비교하면 여전히 탄성률이 높은 것을 감안한다면 바이오필름의 내부 결합을 완화시킬 수 있는 다른 효능 성분과 함께 사용될 필요가 있음을 제시하고 있다.

그리고 이렇게 균의 세균막을 자발적으로 탈피시키는 것을 유도하는 인산염의 농도는 균마다 다를 것으로 보인다. 따라서 인산염이 작용하는 개체수 최저 유도 농도는 생활 속에 인간이 접하는 다양한 균에 따라 다른 연구가 이루어져야 할 것이다. 그럼에도 본 연구에서 보인 외부환경 조절에 의해서 균 개체수를 감소시키는 결과는 향후 ESG 경영철학 시대에 맞추어 항균 시장에서 크게 이용될 것이라 본다.

References

1. B. W. Barry, Breaching the skin's barrier to drugs, *Nature Biotechnol.*, **22**, 165 (2004).
2. C. Iwata, N. Akimoto, T. Sato, Y. Morokuma, and A. Ito, Augmentation of lipogenesis by 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 in hamster sebaceous glands: identification of cytochrome P-450-mediated 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 production, *J. Invest. Dermatol.*, **125**(5), 865 (2005).

3. S. Mukherjee, R. Mitra, A. Maitra, S. Gupta, S. Kumaran, A. Chakraborty, and P. P. Majumder, Sebum and hydration levels in specific regions of human face significantly predict the nature and diversity of facial skin microbiome, *Sci. Rep.*, **6**, 36062 (2016).
4. L. Ma, A. Guichard, Y. Cheng, J. Li, O. Qin, X. Wang, W. Liu, and Y. Tan, Sensitive scalp is associated with excessive sebum and perturbed microbiome, *J. Cosmet. Dermatol.*, **18**(3), 922 (2019).
5. B. Siu-Yin, E. X. Ho, C. Chu, S. Ramasamy, M. Bigliardi-Qi, P. Florez de Sessions, and P. L. Bigliardi, Microbiome in the hair follicle of androgenetic alopecia patients, *PLoS One*, **14**(5), e0216330 (2019).
6. E. Filaire, A. Dreux, C. Boutot, E. Ranouille, and J. Y. Berthon, Characteristics of healthy and androgenetic alopecia scalp microbiome: Effect of *Lindera strychnifolia* roots extract as a natural solution for its modulation, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **42**(6), 615 (2020).
7. D. Pinto, E. Sorbellini, B. Marzani, M. Rucco, G. Giuliani, and F. Rinaldi, Scalp bacterial shift in Alopecia areata, *PLoS One*, **14**(4), e0216330 (2019).
8. C. C. Zouboulis, *Propionibacterium acnes* and sebaceous lipogenesis: a love-hate relationship?, *J. Invest. Dermatol.*, **129**(9), 2093 (2009).
9. K. Iinuma, T. Sato, N. Akimoto, N. Noguchi, M. Sasatsu, S. Nishijima, I. Kurokawa, and A. Ito, Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands *in vivo* and *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **129**(9), 2113 (2009).
10. I. Kolodkin-Gall, D. Romero, S. Cao, J. Clardy, R. Kolter, and R. Losick, d-Amino acids trigger biofilm disassembly, *Science*, **328**(5978), 627 (2010).
11. P. Roy, S. Amdekar, A. Kumar, R. Singh, P. Sharma, and V. Singha, *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers, *J. Ethnopharmacol.*, **140**(1) 186 (2012).
12. J. H. Lim, Y. Jeong, S. H. Song, J. H. Ahn, J. R. Lee, and S. M. Lee, Penetration of an antimicrobial zinc-sugar alcohol complex into *Streptococcus mutans* biofilms, *Sci. Rep.*, **8**, 16154 (2018).
13. M. Grillo-Puertas, J. M. Villegas, M. B. Rintoul, and V. A. Rapisarda, Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*, *PLoS One*, **7**(11), e50368 (2012).
14. R. D. Monds, P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole, Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA, *Mol. Microbiol.*, **63**(3), 656 (2007).
15. R. Ghosh, S. Barman, and N. C. Mandal, Phosphate deficiency induced biofilm formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate, *Sci. Rep.*, **9**, 5477 (2019).
16. T. Iwase, Y. Uehara, H. Shinji, A. Tajima, H. Seo, K. Takada, T. Agata, and Y. Mizunoe, *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization, *Nature*, **465**, 346 (2010).
17. G. J. M. Christensen, C. F. P. Scholz, J. Enghild, H. Rohde, M. Kilian, A. Thuermer, E. Brzuszkiewicz, H. B. Lomholt, and H. Brueggemann, Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis, *BMC Genomics*, **17**, 152 (2016).
18. W. Francuzik, K. Franke, R. R. Schumann, G. Heine, and M. Worm, *Propionibacterium acnes* abundance correlates inversely with *Staphylococcus aureus*: Data from atopic dermatitis skin microbiome, *Acta Derm. Venereol.*, **98**(5), 490 (2018).
19. K. Nakase, H. Nakaminami, and Y. Takenaka, N. Hayashi, M. Kawashima, and N. Noguchi, Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan, *J. Med. Microbiol.*, **63**(Pt 5), 721 (2014).
20. T. Simonart, M. Dramaix, and V. De Maertelaer, Efficacy of tetracyclines in the treatment of acne vulgaris: a review, *Br. J. Dermatol.*, **158**(2), 208 (2008).
21. A. C. Jahns, H. Eilers, and O. A. Alexeyev, Transcriptomic analysis of *Propionibacterium acnes* biofilms *in vitro*, *Anaerobe*, **42**, 111 (2016).
22. Y. Fu, Y. Zu, L. Chen, T. Efferth, H. Liang, Z. Liu, and W. Liu, Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic

- force microscopy, *Planta Med.*, **73**(12), 1275 (2007).
23. T. Gan, X. Gong, H. Schonherr, and G. Zhang, Microrheology of growing *Escherichia coli* biofilms investigated by using magnetic force modulation atomic force microscopy, *Biointerphases*, **11**(4), 041005 (2016).
 24. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, **284**(5418), 1318 (1999).
 25. P. S. Stewart and J. William, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet*, **358**(9276), 135 (2001).
 26. S. V. Nuffel, M. Quatredeniens, A. Pirkel, J. Zakel, J. P. Le Caer, N. Elie, Q. P. Vanbellingen, S. J. Dumas, M. K. Nakhleh, M. R. Ghigna, E. Fadel, M. Humbert, P. Chaurand, D. Touboul, S. Cohen-Kaminsky, and A. Brunelle, Multimodal imaging mass spectrometry to identify markers of pulmonary arterial hypertension in human lung tissue using MALDI-ToF, ToF-SIMS, and hybrid SIMS, *Anal. Chem.*, **92**(17), 12079 (2020).
 27. X. Hua, M. J. Marshall, Y. Xiong, X. Ma, Y. Zhou, A. E. Tucker, Z. Zhu, S. Liu, and X. Y. Yu, Two-dimensional and three-dimensional dynamic imaging of live biofilms in a microchannel by time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Biomicrofluidics*, **9**(3), 031101 (2015).
 28. A. Ahuja, A. Potanin, and Y. M. Joshi, Two step yielding in soft materials, *Adv. Colloid Interface. Sci.*, **282**, 102179 (2020).
 29. H. C. Flemming and J. Wingender, The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 623 (2010).
 30. C. Guilhen, C. Forestier, and D. Balestrino, Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties, *Mol. Microbiol.*, **105**(2), 188 (2017).