

생물막형성 장내세균의 Curli 및 Cellulose 세포외 바탕질 분석

최예환 · 이희우¹ · 김성민² · 이제철 · 이유철 · 설성용 · 조동택 · 김정민*

경북대학교 의학전문대학원 의학과 미생물학교실

¹현주소: 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소

²현주소: 한국기초과학지원 연구원 자기공명연구부

Biofilm Forming Ability and Production of Curli and Cellulose in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*

Yeh-Wan Choi, Hee-Woo Lee, Sung-Min Kim, Je-Chul Lee, Yoo-Chul Lee,
Sung-Yong Seol, Dong-Taek Cho, and Jungmin Kim*

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

¹Present address: Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine,
Seoul National University

²Present address: Division of Magnetic Resonance Research, Korea Basic Science Institute

(Received November 4, 2011 / Accepted December 5, 2011)

In this study, 22 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* including *Citrobacterfreundii* (6 strains), *Enterobacter cloacae* (5 strains), *Enterobacter aerogenes* (3 strains), *Serratia marcescens* (7 strains) and *Pantoea* spp. (1 strain) were investigated for the biofilm forming ability and biosynthesis of curli and cellulose. Biofilm forming ability was the highest among the isolates of *E. cloacae* and the lowest among the isolates of *E. aerogenes*. The expression of the biofilm-forming extracellular matrix components, cellulose and curli fimbriae, was examined by Congo-red (CR) staining and calcofluor staining methods. PCR screening for the presence of curli gene (*csgA*) revealed that 4 strains of *E. cloacae* and 1 strain of *C. freundii* carried the *csgA*, showing a good correlation between the phenotypic detection of curli fimbriae by CR staining method and the genotypic detection of curli gene by PCR in *E. cloacae*.

Keywords: *csgA*, *Enterobacteriaceae*, biofilm, curli, cellulose

생물막(biofilm)의 형성은 세균의 부착 및 정착에 관여하는 중요한 병원성 인자이며, 생물막형성균은 병원에서 의료용 인공 삽입기구의 세균오염으로 인한 원내감염을 일으키는 중요한 원인이 되고 있다. 의학의 발달로 여러 가지 인공 의료장치의 사용이 급증하였고, 인공 의료장치 중에는 세균이 정착하여 생물막을 형성하기 쉬운 플라스틱과 고무 등 중합체로 만든 제제가 많은 이유로 생물막 관련 감염증이 급속히 증가하여, 선진국의 경우 치료를 요하는 세균 감염증의 60% 이상이 생물막 형성과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다(3, 14, 16, 21, 24). 따라서 병원에서 분리되는 주요 원내 감염균의 생물막 형성능, 생물막형성 기전 및 생물막의 성상에 관한 연구는 매우 중요하다.

생물막의 형성은 세균이 자기 생식에 있어 불리한 환경에

놓일 경우 주위에 다당체를 생산하고 이것을 매개로 인접한 세균이 응집하고 한 덩어리가 되어 고체나 생체 표면에 세균이 막(film)을 형성하는 상태를 가리키며, 이때 만들어지는 다당체는 glycocalyx, mucoid, alginate, extracellular polymeric substance (EPS) 등으로 표현되어 왔다(2). 생물막의 형성과정은 세균이 고체의 표면에 부착(가역성 부착)함으로써 시작되는데, 세균과 고체표면 사이의 흡착이 지속되면 비가역성 부착으로 바뀔으로써 세포 외 중합체나 EPS가 생성하게 된다(20). 또한 세균은 생물막에 여러 가지 물질을 생성하여 첨가하게 되고 생물막은 다른 유기체의 성장과 부착을 유도하면서 성장하게 된다. 생물막은 단순한 세균의 축적이 아니라 세균이 자유 유영할 때와는 여러 가지로 다른 일련의 유전자들을 사용하기 쉽게 하는 복합 구조이다. 때로 서로 다른 많은 종을 포함하기도 하는 이러한 세균 집합체는 항생물질이나 다른 해로운 물질들로부터 자신들을 보호하고 동시에 영양분을 효율

* For correspondence. E-mail: minkim@knu.ac.kr; Tel.: +82-53-420-4845; Fax: +82-53-427-5664

적으로 전달하기도 한다(4, 5, 6, 10, 13, 25). 생물막으로 둘러 싸여져 부착한 세균들은 동일한 균주라 할지라도 부유 상태의 세균보다 항생물질에 대한 저항성이 500배에서 1000배 정도 더 강한 것으로 나타났다(7, 12, 15).

장내세균의 생물막 형성에 관한 연구는 대장균과 살모넬라에서 많은 연구가 진행되어 왔다(9, 23). 장내세균들은 그들이 생성하는 curli, 셀룰로오스 및 다당류 등의 세포외 바탕질의 구성성분에 따라 Congo-red 한천 배지에서 다양한 형태의 균 집락(morphotype)을 표현하는 것으로 알려졌는데, *S. typhimurium*과 대장균의 경우 주요 세포외바탕질 성분의 주는 curli이며 셀룰로오스 및 다당류가 일부를 구성하는 것으로 알려져 있다(18, 19, 26). Curli는 1980년대 후반에 소의 유방염을 일으키는 대장균에서 최초로 발견되었는데, 대장균과 살모넬라 속 균종에서 감염을 일으키는 과정에 관여하며 특히 curli는 표면 부착과 세포응집형성에 관여하고, 숙주세포와의 부착과 침입을 매개할 뿐만 아니라 염증반응에 중요한 자극인자로 작용하기도 한다. Curli는 세균의 생물막을 형성하는데 기여하는데, 대장균이 만드는 curli는 단백질이 세균 주변에 그물과 같은 구조를 만들어 생물막 형성을 가능하게 한다는 사실이 밝혀졌다(1). 대장균의 curli는 *csgBA(C)*와 *csgDEFG* 오페론의 작동으로 인해 생성되는데, 살모넬라균종에서도 *csgBA(C)*와 *csgDEFG* 오페론과 상동성이 매우 높은 *agfBA(C)* 및 *agfDEFG* 오페론의 작동으로 curli의 생성이 이루어진다(8, 17). 최근에는 *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* 속에 속하는 일부의 세균들도 이에 연관된 유전자를 지니고 있는 것이 확인되었다(26). *Citrobacter*, *Enterobacter* 및 *Serratia* 등의 장내세균은 병원 감염의 주요 원인균으로서 주로 면역력이 저하된 환자들에서 기회 감염을 초래하며, 특히 이러한 병원환경에서 항균제 내성을 획득하고 의료용 인공 삽입기구와 관련된 감염증을 초래하므로 의료용 삽입기구의 사용이 급증하고 있는 의료 환경에서 그 중요성이 점차 증가하고 있다.

본 연구에서는 임상 검체에서 분리된 총 22주의 *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* 및 *Pantoea* spp. 등의 균주를 대상으로 폴리스티렌에 대한 생물막 형성능을 조사하고, Congo-red 및 calcofluor 염색법을 시행하여 균집락의 형상(morphotype)을 조사하여 생물막의 세포외 바탕질 성분으로 curli 및 셀룰로오스의 생성 유무를 확인하고 균 집락의 morphotype에 따른 생물막 형성능을 비교하였다. 또한 세포외 바탕질의 주요 구성 성분인 curli 생성 오페론인 *csgBA(C)* 유전자의 유무 확인과 새로운 *csgA* 유전자의 염기서열을 규명하였다.

재료 및 방법

균주

대구, 대전 및 천안에 위치한 대학병원에 입원한 환자의 임상 검체에서 유래된 *Citrobacter*, *Enterobacter* 및 *Serratia* 균속 22주를 사용하였다. 생화학적 동정검사인 API20E kit (bio-Merieux, France)를 이용하여 *Citrobacter freundii* 6주, *Enterobacter cloacae* 5주, *Enterobacter aerogenes* 3주,

Serratia marcescens 7주 및 *Pantoea* spp. 1주를 최종 동정하였다. 생물막 형성능 분석 실험의 음성 대조균주로 *E. coli* strain DH5 α 를 사용하였다.

Polystyrene에 대한 생물막 형성능 관찰 및 생물막의 정량 분석

Polystyrene에 대한 생물막 형성능 분석은 Heilmann 등(11)에 의해 기술된 방법을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. 배양된 균액을 600 nm에서 흡광도 값 1.0으로 맞춘 후 brain heart infusion (BHI) 액체 배지로 100배 희석하였다. 희석된 균액 200 μ l를 96 well plate에 첨가하여 37°C에서 24시간 또는 28°C에서 48시간 배양한 후, 200 μ l의 PBS 완충용액으로 두 번 세척하였다. 0.1% crystal violet 염색용액으로 15분간 염색하고 200 μ l의 phosphate buffered saline (PBS) 완충용액으로 두 번 세척한 후 생물막을 관찰하였다. 형성된 생물막의 정량적 측정을 위하여 200 μ l의 95% 에탄올로 5분간 용해시키고 microplate reader (Molecular Devices, USA) 분석기기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

생물막의 세포외 바탕질 조사

Congo-red 염색법: 임상검체 분리균주의 집락성상을 관찰하기 위한 방법으로 1% sucrose 및 0.8% Congo red dye가 포함된 BHI 한천 배지에 균주를 도말하고 37°C에서 24시간 또는 28°C에서 48시간 배양 후 균집락의 색을 관찰하였다.

Calcofluor 염색법: 임상검체 분리균주의 셀룰로오스 생성을 확인하기 위한 방법으로 BHI 한천 배지에 균주를 도말하고 37°C에서 24시간 또는 28°C에서 48시간 배양하였다. 1 mg/ml농도의 calcofluor 염색용액(Calcofluor white M2R, Sigma, USA)으로 5분간 염색하고, PBS로 세 번 세척한 후 UV (350-400 nm) 하에서 균집락의 발광정도를 관찰하였다.

중합효소연쇄반응

Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 균주로부터 genomic DNA를 분리하였다. *csgBA(C)* 오페론 유전자에 대한 특이적인 primer 쌍 (S: 5'-ATGATGT TAACAATACTGGGTGC-3', AS:5'-TTTTTGCAGCAGATC GATAGAA-3')을 이용하여 다음과 같이 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 각 균주로부터 추출한 0.5 μ l의 genomic DNA를 주형으로 사용하여 5 μ l의 10 \times PCR reaction buffer, 1 μ l의 10 mM dNTP mix, 1.5 μ l의 50 mM MgCl₂, 1 μ l의 sense와 antisense primer (10 pmol/ μ l)와 0.5 μ l의 Taq DNA polymerase (5 U/ μ l, TaKaRa, Japan)를 혼합하였다. 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음, 94°C에서 1분, 57°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간 35회 반복하고, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 1% agarose gel 전기영동을 통해 생성된 DNA를 확인하였다.

염기서열 분석

PCR 반응을 통해 증폭된 *csgBA(C)* 오페론 유전자의 염기

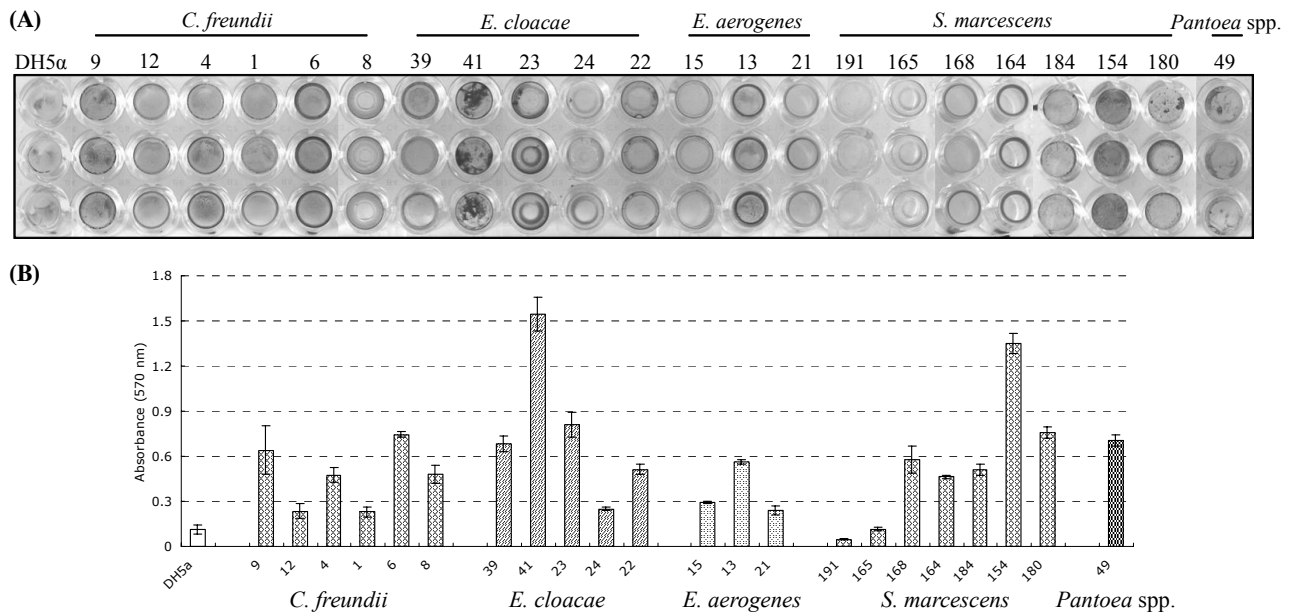


Fig. 1. Biofilm formation of different Enterobacterial species from isolated patients and quantitative analysis of biofilms formed. A 200 μ l of bacteria suspension was inoculated into each well of flat-bottom 96-well polystyrene plate and incubated at 37°C overnight. The wells were washed with 200 μ l of PBS two times, air dried, and stained with 0.1% gentian violet for 15 min (A). The extent of biofilm formed by bacteria was determined quantitatively by staining the biofilm with gentian violet (B). The biofilm was stained with gentian violet, the dye solubilized with 95% ethanol, and the absorbance determined at 570 nm. Data are expressed as the mean \pm SD. *E. coli* strain DH5a was used as negative control in biofilm assay.

서열 분석을 위하여, PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 PCR 산물을 순수 정제한 후 염기서열 분석 전문 회사인 바이오벡스(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하고, GenBank의 BLAST search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)을 이용하여 *csgBA*(C) 오픈론에 삽입되어 있는 *csgA* 유전자 염기서열과 일치하는지를 확인하였다. *csgA* 유전자의 아미노산 염기서열 번역은 ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>)에 있는 아미노산 번역 프로그램을 이용하였고, 장내세균 중에 따른 *csgA* 유전자간의 상동성 조사는 ClustalW alignment 프로그램(<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>)을 이용하였다.

결과 및 고찰

생물막 형성능 관찰 및 정량분석

장내세균과에 속하는 *C. freundii* 6주, *E. cloacae* 5주, *E. aerogenes* 3주, *S. marcescens* 7주 및 *Pantoea* spp. 1주를 포함한 22주의 임상감체 분리균주들을 대상으로 catheter의 주요 성분인 폴리스티렌(polystyrene)에 대한 생물막 형성능을 분석하였다(Fig. 1과 Table 1). 37°C에서 24시간 배양 후 생물막 형성능을 분석한 결과는 음성 대조균주로 사용한 *E. coli* DH5a 균주와 비교하였을 때 *S. marcescens* 191번과 165번은 생물막 형성능이 아주 낮거나 없는 것으로, 그리고 나머지 20주는 모두 생물막 형성능이 있는 것으로 확인되었다. OD₅₇₀ nm에서 생물막의 양을 측정된 결과, 흡광도 값이 0.6이상으로 나

타난 *C. freundii* 6, 9번, *E. cloacae* 23, 39와 41번, *E. aerogenes* 13번, *S. marcescens* 156, 168과 180번, *Pantoea* spp. 49번은 생물막 형성능이 높은 것으로 판단되며, 이 중 *E. cloacae* 41번과 *S. marcescens* 154번은 흡광도 값이 각각 1.6과 1.4로 가장 높은 생물막 형성능을 나타내었다. 28°C에서 48시간 배양 후 생물막 형성능을 분석한 결과, *E. coli* DH5a 균주와 비교하였을 때 22주 모두 생물막 형성능이 있는 것으로 확인되었다(Table 1). 37°C에서 24시간 배양 후 생물막 형성능을 분석한 결과와 마찬가지로 *E. cloacae* 41번과 *S. marcescens* 154번은 흡광도 값이 각각 1.76과 1.37로 가장 높은 생물막 형성능을 나타내었다.

Congo-red 및 calcofluor 염색법을 이용한 표면형태 분석

22주의 *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* 및 *Pantoea* spp. 등의 임상감체 분리균주를 대상으로 배양된 균의 표면형태를 관찰하고 생물막 형성을 이루는 세포외 바탕질의 주요 구성성분인 curli와 셀룰로오스의 생성 유무를 확인하기 위해서 Congo-red 및 calcofluor 염색법을 실시하였다(Fig. 2). Congo-red 염색결과에 따라, 적색의 rough 표면을 갖는 집락(rdar: red, dry, and rough), 갈색 또는 핑크색의 smooth 표면을 갖는 집락(bas/pas: brown and smooth/pink and smooth), 갈색의 rough 표면을 갖는 집락(bdar: brown, dry, and rough), 갈색의 smooth 표면을 갖는 집락(bas: brown and smooth), 핑크색의 smooth 표면을 갖는 집락(pas: pink and smooth) 및 smooth 표면을 갖는 흰색 집락(saw: smoo-

thand white) 등으로 분류하였다(Table 1). 28°C에서 48시간 배양 조건하에서는 rdar형은 *C. freundii* 2주, bas/pas형은 *C. freundii* 1주와 *E. cloacae* 3주, pas형은 *E. cloacae* 1주, *E. aerogenes* 2주, *S. marcescens* 5주 및 *Pantoea* spp. 1주, 그리고 saw형은 *C. freundii* 3주, *E. cloacae* 1주, *E. aerogenes* 1주 및 *S. marcescens* 2주에서 확인되었다. 37°C에서 24시간 배양 조건하에서는 rdar형은 *C. freundii* 1주, bas/pas형은 *E. cloacae* 1주 및 *S. marcescens* 1주, pas형은 *E. cloacae* 1주, *E. aerogenes* 1주, *S. marcescens* 4주 및 *Pantoea* spp. 1주, 그리고 saw형은 *C. freundii* 1주 및 *S. marcescens* 2주가 확인되었다. 또한 calcofluor 염색법을 실시한 결과 28°C에서 48시간 또는 37°C에서 24시간 배양한 균주의 셀룰로오스 생성으로 인해 형광을 띠는 양성의 균주를 확인할 수 있었다(Table 1). 28°C에서 48시간 배양 조건하에서는 *C. freundii* 2주, *E. cloacae* 5주, *E. aerogenes* 1주 및 *S. marcescens* 3주

에서 calcofluor 양성을 보였으며, 37°C에서 24시간 배양 조건하에서는 *E. cloacae* 1주, *E. aerogenes* 2주, *S. marcescens* 5주 및 *Pantoea* spp. 1주에서 calcofluor 양성을 나타내었다.

Congo-red 염색법은 장내세균이 형성하는 생물막의 세포외 바탕질의 주요 구성성분인 curli 및 셀룰로오스의 생성을 간편하게 대략적으로 확인할 수 있는 방법이다. Congo-red 한천배지에 배양할 경우 균주의 세포외 바탕질의 생성량이 높으면 주요 구성성분에 따라 균 집락이 짙은 적색(red), 갈색(brown), 분홍색(pink)을 띠게 되면서 dry 및 rough 표면 형태를 나타내고, 세포외 바탕질의 생성이 아주 낮으면 균 집락이 투명한 색이나 흰색을 띠면서 smooth 표면 형태를 나타낸다. 대장균과 살모넬라의 경우 Congo-red 염색시 나타나는 균집락의 표현형상을 크게 4가지로 분류한 바 있다(27). 즉 rdar (red, dry, and rough)형, pdar (pink, dry, and rough)형, bdar (brown, dry, and rough)형 및 saw (smooth and white)형 등이다. 이

Table 1. Morphotype on Congo-red agar plate and biofilm forming ability in clinical isolates of *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, and *Pantoea* spp.

Species and strain	28°C (48 h)			37°C (24 h)		
	Congo-red morphotype	Calcofluor staining	Biofilm CV staining	Congo-red morphotype	Calcofluor staining	Biofilm CV staining
<i>C. freundii</i>						
9	saw ^a	- ^b	1.25 ^c	bdar	-	0.64
12	saw	-	0.43	bdar	-	0.24
4	saw	-	0.92	bdar	-	0.48
1	bas/pas	-	0.53	saw	-	0.23
6	rdar	+	0.94	bdar	-	0.74
8	rdar	+	0.78	rdar	-	0.48
<i>E. cloacae</i>						
39	bas/pas	+	0.76	bas	-	0.68
41	bas/pas	+	1.76	bas/pas	+	1.55
23	pas	+	0.68	bas	-	0.81
24	saw	+	0.26	pas	-	0.25
22	bas/pas	+	0.53	bas	-	0.51
<i>E. aerogenes</i>						
15	saw	-	0.55	bas	-	0.3
13	pas	-	0.66	bas	+	0.56
21	pas	+	0.24	pas	+	0.24
<i>S. marcescens</i>						
191	pas	-	0.29	saw	-	0.05
165	saw	-	0.25	pas	+	0.11
168	pas	+	0.64	pas	+	0.58
164	saw	-	0.23	saw	-	0.46
184	pas	-	0.64	pas	+	0.51
154	pas	+	1.37	bas/pas	+	1.35
180	pas	+	0.67	pas	+	0.76
<i>Pantoea</i> spp.						
49	pas	-	0.93	pas	+	0.7

^a Classification of morphotypes according to Congo-red staining: rdar (red, dry and rough; curli and cellulose), bdar (brown, dry and rough; curli only), bas (brown and smooth; curli only), pas (pink and smooth; cellulose only), saw (smooth and white; curli nor cellulose)

^b +, production of cellulose or polysaccharides, -, no cellulose or polysaccharides

^c Absorbance value (570 nm)

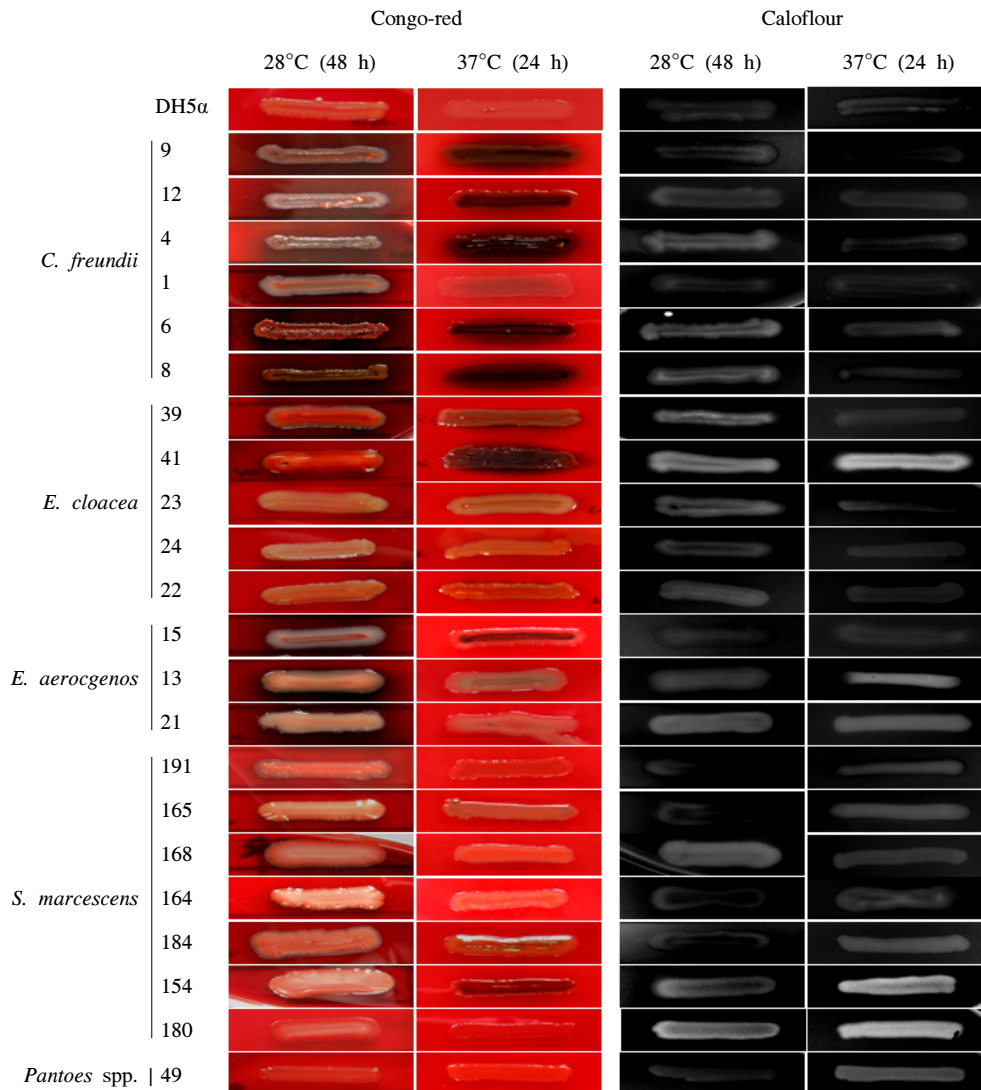


Fig. 2. Congo-red and calcofluor staining of different enterobacterial species. *E. coli* strain DH5α was used as a negative control.

분류에 따르면, rdar형의 균주는 curli와 셀룰로오스 모두 생성, pdar형의 균주는 셀룰로오스만 생성, bdar형의 균주는 curli만 생성 그리고 saw 형의 균주는 curli와 셀룰로오스 모두 생성하지 않는 것으로 해석하였다. 본 연구에서 22주의 *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* 및 *Pantoea* spp. 등의 Congo-red 한천 배지에서의 균집락 형태를 조사한 결과 rdar, pdar, bdar 및 saw 이외에도 pas (pink and smooth) 및 bas (brown and smooth) 등의 다양한 형태로 나타났으며, 균속에 따라서 균 집락의 표현형상이 다르게 나타났으며, 동일 균속내에서도 균 집락의 표현형상과 색 농도의 차이가 관찰되어 세포외 바탕질의 주요 성분 및 생성량의 차이가 있음을 시사하였다. 또한 일부 균주의 경우 배양 온도에 따라 균집락의 표현형상이 다르게 나타났는데, 이는 curli 및 셀룰로오스의 생성량이 온도 변화에 의해 조절될 수 있음을 시사한다.

Congo-red 염색법과 동시에 셀룰로오스 또는 다당류에 결합하는 것으로 알려진 calcofluor를 이용한 염색법을 시행한 결과, 배양 온도 28°C에서 Congo-red 염색에서는 셀룰로오스의 생성을 시사하는 pdar, rdar 및 pas 형이 15주에서 나타났으나, 이 중 calcofluor 염색에서 양성을 나타낸 균주는 11주였다. 배양 온도 37°C에서는 10주에서 Congo-red 염색시 rdar 및 pas 형의 집락을 나타내었고, 이 중 8주에서 calcofluor 염색 양성을 나타내었다. 따라서 Congo-red 염색법과 calcofluor 염색의 결과가 일치하지 않는 균주는 28°C 배양시 22주 중 4주, 그리고 37°C 배양시 22주 중 3주인 것으로 나타났다. 또한 Congo-red 염색법과 calcofluor 염색 모두에서 셀룰로오스를 생성하는 것으로 추정된 균주는 37°C 배양에서는 8주였으나 28°C 배양에서는 11주로 나타났다. 한편, 배양온도 28°C에서는 curli 생성을 시사하는 Congo-red 균집락 bdar, rdar 및 bas형이 22주 중 4주에 불과하였으나, 배양 온도 37°C에서

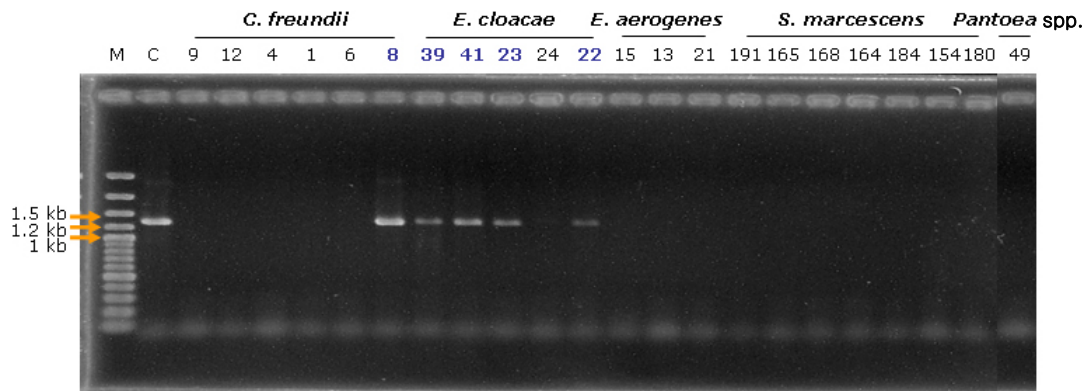


Fig. 3. PCR detection of *csgA* gene in clinical isolates of *Enterobacterial* spp. PCR analysis was performed to amplify *csgA* gene using genomic DNA of *Enterobacterial* species isolated from patients as template. Agarose gel electrophoresis showed PCR results of amplified gene containing *csgA*. PCR products of 1,301 bp were detected for *csgA*. *csgA* was detected in *C. freundii* isolate 8, *E. cloacae* isolate 39, 41, 23 and 22. M: DNA size marker; C: *csgA*-positive *E. cloacae* strain (positive control); *C. freundii* isolates: 9, 12, 4, 1, 6, 8; *E. cloacae* isolates: 39, 41, 23, 24, 22; *E. aerogenes* isolates: 15, 13, 21; *S. marcescens* isolates: 191, 165, 168, 164, 184, 154, 180; *Pantoea* sp. isolate: 49.

는 22주 중 12주에서 bdar, rdar 또는 bas형이 확인되었다. 따라서 셀룰로오스의 생성은 28°C에서 48시간 배양시 더욱 증가하는 것으로, 그리고 curli 생성은 37°C에서 24시간 배양시 더욱 증가하는 것으로 추정되었으나, 추후 좀 더 다양한 방법으로 확인이 필요한 것으로 사료된다. 이전의 보고에서 임상 검체 대장균과 살모넬라 분리균주는 curli와 셀룰로오스 생성량이 37°C보다 28°C에서 훨씬 더 증가되어 rdar 표현형을 보였으며, 이는 전사조절 인자인 *csgD* 발현의 증가로 인한 것으로 확인된 바 있다(8, 17, 22).

생물막 형성능이 가장 높았던 *E. cloacae* 41 균주와 *S. marcescens* 154 균주는 bas/pas의 표면형태와 calcofluor양성으로 나타나 curli 및 셀룰로오스를 모두 생성하는 것으로 추정되었고, 28°C에서 48시간 배양시 saw의 표면형태를 나타낸 7주의 균주 중 2주(*C. freundii* 9와 *C. freundii* 4)를 제외한 5주 모두 낮은 정도의 생물막 형성능을 나타내었다. 이러한 결과들은 장내세균에서 curli와 셀룰로오스의 생성이 생물막 형성능과 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

Curli 생성 유전자(*csgA*) 검색 및 염기서열 분석

상기의 균주들을 대상으로 curli 생성에 중요한 구조 단백질인 *csgA* 유전자의 보유 유무를 확인하기 위해서 *csgA* 유전자의 보유 유무를 조사하였다. 22주 가운데 5주(*C. freundii* 1주, *E. cloacae* 4주)에서 *csgBA(C)* operon 유전자가 확인되었으며, *E. aerogenes*과 *S. marcescens* 균주는 *csgA* 유전자 음성으로 나타났다(Fig. 3). *C. freundii*와 *E. cloacae*에서 확인된 *csgA* 유전자의 염기서열과 아미노산서열을 분석한 결과, 각 각 150개와 152개의 아미노산으로 이루어져 있는 것으로 확인되었다. BLAST 분석에서 *C. freundii* 8균주의 *csgA* 유전자 염기서열은 *C. freundii* *Fec4 csgA* (accession number AJ515701) 유전자의 염기서열과 일치하였다. *E. cloacae*의 *csgA* (EF490314) 유전자는 *E. coli csgA*와 80.9%, *E. sakazakii*

*csgA*와 75.7%, 그리고 *C. freundii csgA*와 67.8%의 상동성이 있는 새로운 염기서열의 *csgA* 유전자임이 확인되어 EMBL에 등록(accession number EF490314)하였다.

37°C에서 배양한 Congo-red 염색에서 curli의 생성이 추정(rdar, bdar, bas형)되는 12주 중 curli 생성 유전자(*csgA*)가 확인된 균주는 5주(*C. freundii* 1주, *E. cloacae* 4주)였다. *E. cloacae*의 경우, *csgA* 유전자를 보유한 4주 모두 bas 또는 bas/pas로, *csgA* 유전자를 보유하지 않은 1주는 pas 형으로 나타나 Congo-red 균집락 표현형상이 curli 생성을 잘 반영하는 것으로 나타났다. 그러나 *C. freundii*의 경우 6주 중 5주가 bdar (4주) 또는 rdar (1주)로 확인되었음에도 불구하고 *csgA*가 rdar형 1주에서만 확인되었고, *E. aerogenes*와 *S. marcescens*는 *csgA* 유전자가 확인되지 않았으나 각각 2주와 1주에서 bas형으로 나타나 이들 균종에서는 congo-red 염색법에 의한 curli 생성 판단과 curli 생성 유전자 검출의 결과가 일치하지 않았다. 이러한 결과는 장내세균에 속하는 모든 균종들이 *csgA* 유전자를 보유하지는 않을 뿐만 아니라 같은 균종이라도 *csgA* 유전자 보유 유무가 다르다는 사실을 보여준다. 이들 균주의 경우 본 연구에서 *csgA* 유전자를 검출하기 위해 사용된 PCR primer로는 검출되지 않는 다른 종류의 curli 유전자를 보유하여 curli를 생성할 가능성도 있으므로 추후 확인이 필요하다. 결론적으로 현재까지 curli 생성 유전자(*csgA*)가 확인된 대장균과 살모넬라 및 본 연구에서 확인된 *E. cloacae*의 경우 Congo-red 한천배지상의 균집락 표현형상이 curli의 존재 및 생성 정도를 대략적으로 나타낼 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다. 뿐만 아니라, *E. cloacae*의 경우 *csgA* 유전자를 보유하지 않은 균주(*E. cloacae* 24)의 생물막 형성능이 *csgA* 유전자를 보유한 4주에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타나, curli가 *E. cloacae*의 생물막 세포외 바탕질 구성성분의 주요 요소일 것으로 추정된다.

적요

본 연구에서는 병원 감염의 주요 원인균으로 생물막 관련 감염증에서 흔히 분리되고 있는 *Citrobacter*, *Enterobacter* 및 *Serratia* 등의 임상분리 장내세균 22주를 대상으로 생물막 형성능을 조사하고, 생물막의 세포외 바탕질의 구성 성분을 알아보기 위하여 Congo-red 한천배지상의 집락 형상과 calcofluor 염색을 시행하였다. 또한 curli 생성 오페론인 *csgBA(C)* 유전자의 유무 확인과 *csgA* 유전자의 염기서열을 규명하였다. 37°C에서 24시간 배양 후 생물막 형성능 분석에서는 2주의 *S. marcescens*를 제외한 나머지 20주는 모두 생물막 형성능이 있는 것으로, 28°C에서 48시간 배양 후 분석에서는 22주 모두 생물막 형성능이 있는 것으로 확인되었다. Congo-red 한천배지에서의 균집락 형상을 조사한 결과 균속에 따라서 균 집락의 표현형상이 다르게 나타났으며, 동일 균속내에서도 균 집락의 표현형상과 색 농도의 차이가 관찰되어 세포외 바탕질의 주요 성분 및 생성량의 차이가 있음을 시사하였다. 1주의 *C. freundii*와 4주의 *E. cloacae*에서 *csgBA(C)* 유전자 양성을 나타내었다. 염기서열 분석결과, *E. cloacae*의 *csgA*는 *E. coli*의 *csgA*와 80.9%, *E. sakazakii*의 *csgA*와 75.7%, 그리고 *C. freundii*의 *csgA*와 67.8%의 상동성이 있는 것으로 나타났다. *E. cloacae*의 경우 Congo-red 염색의 결과와 curli 유전자 검색 결과가 일치하였을 뿐만 아니라, *csgA* 유전자를 보유하지 않은 균주의 생물막 형성능이 *csgA* 유전자를 보유한 균주에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타나, curli가 *E. cloacae*의 생물막 세포외 바탕질 구성성분의 주요 요소일 것으로 추정되었다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(A090427)의 지원에 의하여 수행된 연구결과로 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Chapman, M.R., L.S. Robinson, J.S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, and S.J. Hultgren. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
- Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Crump, J.A. and P.J. Collignon. 2000. Intravascular catheter-associated infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 1-8.
- Donlan, R.M. 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* 46, 47-52.
- Donlan, R.M. and J.W. Costerton 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
- Dunne, W.M. Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166.
- El-Azizi, M., S. Rao, T. Kanchanapoom, and N. Khardori. 2005. *In vitro* activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of *staphylococci*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 4, 2.
- Gerstel, U. and U. Romling. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Microbiol.* 3, 638-648.
- Gerstel, U. and U. Romling. 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 154, 659-667.
- Gilbert, P., J. Das, and I. Foley. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Gotz. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 29, 1013-1024.
- Larsen, T. and N.E. Fiehn. 1996. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS* 104, 280-284.
- Mah, T.F. and G.A. O'Toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34-39.
- Mittelman, M.W. 1999. Recovery and characterization of biofilm bacteria associated with medical devices. *Methods Enzymol.* 310, 534-551.
- Norwood, D.E. and A. Gilmour. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88, 512- 520.
- Raad, I. 1998. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 351, 893-898.
- Romling, U., Z. Bian, M. Hammar, W.D. Sierralta, and S. Normark. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* 180, 722-731.
- Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark, and J. Reinkoster. 2000. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* 36, 10-23.
- Romling, U. 2005. Characterization of the rdarmorphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1234-1246.
- Stoodley, P., K. Sauer, D.G. Davies, and J.W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Trautner, B.W. and R.O. Darouiche. 2004. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am. J. Infect. Control* 32, 177-183.
- Uhlich, G.A., J.E. Keen, and R.O. Elder. 2001. Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2367-2370.
- van Houdt, R. and C.W. Michiels. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626-633.
- Vinh, D.C. and J.M. Embil. 2005. Device-related infections: a review. *J. Long Term Eff. Med. Implants* 15, 467-488.
- Zelver, N., M. Hamilton, B. Pitts, D. Goeres, D. Walker, P. Sturman, and J. Heersink. 1999. Measuring antimicrobial effects on biofilm bacteria: from laboratory to field. *Methods Enzymol.* 310, 608-628.
- Zogaj, X., W. Bokranz, M. Nimtz, and U. Romling. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immunol.* 71, 4151-4158.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Romling. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452-1463.