

황환원 세균의 quorum-sensing 유사 현상

박지은, 장덕진

명지대학교 환경생물공학과

전화 (0335)330-6690, FAX (0335)336-6336

Abstract

Microbiologically influenced corrosion (MIC) of metal is common in the natural environment and sulfate reducing bacteria are representative microorganisms for MIC. We found that biofilm formation by SRB on the metal surface might be controlled by quorum sensing, which is a cell density dependent regulation of cell metabolism. As cell free culture fluids (spent media) of *Desulfovibrio vulgaris* and *D. desulfuricans* were tested for quorum sensing related test strains, it was found that spent media of two SRB induced increased luminescence of *Vibrio harveyi* BB886 (sensor 1+, sensor 2-) and BB170 (sensor 1-, sensor 2+). Quorum activities of *D. vulgaris* and *D. desulfuricans* appeared to be parallel to growth patterns, i.e., it was low in the lag phase, highly increased in the exponential phase, and reached maximum in the stationary phase. Interestingly, however, luminescence of *V. harveyi* BB886 and BB170 induced by a unit cell mass of the SRB showed a maximal peak in the late lag phase. Hence, it was suspected that quorum sensing of these two SRB play unknown roles in shifting cells from dormant to growth stages.

서론

사회의 각종 제반 금속시설에 발생하는 부식은 경제적 손실이 따르는 등 사회적 문제로 부각되고 있다. 전체 부식 중에서 미생물에 의해 야기되는 금속 부식이 30%나 이른다. 미생물에 의한 부식의 특징은 국부적 부식 (localized corrosion)으로 부식을 가속화시키므로 그 심각성이 더하고 있다. 미생물에 의한 금속부식은 호기적인 조건과 혐기적인 조건에서 모두 일어나며, 혐기적 조건의 금속부식은 sulfate reducing bacteria (SRB)가 주된 원인으로 알려져 있다. SRB는 SO_4^{2-} 가 최종 전자 수용체로서 HS 로 환원되고 금속표면에 biofilm을 형성하면서 금속을 산화시켜 부식을 일으킨다. 특히 SO_4^{2-} 는 지구상의 많이 존재하는 무기물질이며 약간의 영양분만 공급된다면 SRB가 성장할 수 있는 조건이 된다. 본 연구에서는 SRB의 biofilm 형성이 quorum sensing가 관련되어 있는지를 조사하였다. Quorum이란 일종의 미생물간의 대화로서 세포밖으로 신호물질을 배출하여 유전자 발현을 조절하는 것을 일컫는다.

Quorum sensing bacteria는 autoinducer라 불리는 신호물질을 세포 밖으로 방출하는데 cell density가 증가하면서 세포밖에 autoinducer를 축적하게 된다. Autoinducer가 일정농도가 되면 세포 안으로 다시 들어와 유전자가 발현하게 된다. 해양성 미생물인 *Vibrio fischeri*와 *Vibrio harveyi*에서 quorum sensing이 처음 발견되었으며 현재 많은 미생물에서 일반적으로 일어나는 현상이라고 보고 있다.¹⁾ 본 연구에서 사용된 *V. harveyi*는 두 개의 독립적인 quorum system을 가지고 있으며 system 1에서는 N- acyl-homoserine lactone이 signal 물질이며 system 2에서는 acyl-homoserine lactone 계열은 아니나 아직 규명되지 않은 물질이 관여한다.²⁾³⁾ 본 연구에서는 SRB가 *V. harveyi*와 유사한 quorum system을 보유하고 있는 것으로 판단된 바 SRB에 의해 야기되는 금속의 부식과 quorum의 연관성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

Sulfate reducing bacteria는 *Desulfovibrio desulfuricans*와 *Desulfovibrio vulgaris*를 사용하였으며 배지는 Postgate medium No. 3를 사용하였다. SRB는 anaerobic bacteria로서 배지조제시 질소로 purging을 충분히 하여 산소를 제거 한 후 멸균하였고 멸균 후 glove box에서 head space를 다시 질소로 치환하였다. *D. desulfuricans*는 37°C에서 *D. vulgaris* 30°C에서 vial에 실리콘마개를 사용하여 혐기적 조건을 유지하며 무교반 배양하였다.

Quorum sensing signal assay

Quorum의 autoinducer를 테스트 할 수 있는 균주는 *V. fischeri*, *V. harveyi*, *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pDCI41E33, *Chromobacterium violaceum* CV026으로 모두 LB배지에 30°C, 200rpm에서 배양하였다. *V. harveyi*의 경우 각각의 autoinducer를 detection 할 수 있는데 BB120은 wild type이고 BB886은 autoinducer-1을 detection 할 수 있는 균주이고 BB170은 autoinducer-2를 detection 하는 균주이다. Autoinducer를 assay 하기 위해서 *D. desulfuricans*와 *D. vulgaris*, BB120 배양액을 5000rpm, 10분 동안 centrifuge 하고 0.22µm filter로 여과하여 cell을 제거한 상등액을 준비하였다. BB886과 BB170은 LB배지에 30°C, 200rpm에서 1% 계대한 후 2~3 시간 배양한 다음 *D. desulfuricans*와 *D. vulgaris*의 상등액을 10%를 넣고 다시 3시간 배양 후 luminometer를 이용하여 빛을 측정하여 이를 비교하였다 (Tunner, TD20/20).

결과 및 고찰

SRB의 quorum 여부를 조사하기 위하여 *V. fisheri*, *V. harveyi*, *A. tumefaciens* NT1/pDCI41E33, *C. violaceum* CV026 등을 사용하였다. Quorum의 모델은 크게 *V. fisheri*와 *V. harveyi* 두가지로 나뉜다. *V. fisheri*는 LuxI가 N-acyl homoserine lactone 이라는 autoinducer를 만들면 LuxR이 인식하여 특정유전자를 발현시킨다. 그리고 *V. harveyi*는 독립적인 2개의 quorum system을 보유하고 있는데 system 1에서는 LuxLM이 acyl-homoserine lactone을 합성하여 LuxN이 인식하고 system 2에서는 LuxS가 acyl-homoserine lactone 계열은 아니나 아직 규명되지 않은 물질을 합성하고 LuxQ가 인식한다. *A. tumefaciens* NT1/pDCI41E33, *C. violaceum* CV026은 모두 *Vibrio fisheri*와 같은 LuxI-LuxR system이다. 이들 균주의 quorum phenotype은 autoinducer 존재시 *V. fisheri*와 *V. harveyi*는 빛을 발산하고 *A. tumefaciens* NT1/pDCI41E33는 X-gal plate에서 푸른색으로 변하고 *C. violaceum* CV026은 보라색 색소를 방출한다. 본 연구에서는 SRB의 배양액을 위의 균주로 test한 결과 *V. harveyi*에서만 반응하였다. SRB의 배양액은 autoinducer-1, autoinducer-2를 detection 할 수 있는 균주인 *V. harveyi* BB886, BB170에서 모두 반응하였다. 이를 미루어 *D. desulfuricans*와 *D. vulgaris*는 *V. harveyi*와 유사한 quorum system을 보유한 것으로 판단된다.

SRB의 성장곡선 중 어느 곳에서 autoinducer가 가장 많이 배출되는지 조사하기 위하여 *D. desulfuricans*와 *D. vulgaris*를 배양하면서 성장곡선별로 sampling 취한 후 centrifuge 하여 cell을 제거한 상등액을 준비하였다. 이 상등액을 BB886과 BB170 배양액에 10%를 넣고 다시 3시간 배양 후 빛을 측정하였다. 그 결과, *D. vulgaris*는 성장곡선과 유사하게 지연기에서 빛의 양이 작다가 대수성장기에서는 급격히 증가하다가 정지기 초기에서 가장 많은 발광량을 나타내었다. 그리고 이를 OD로 나누어서 균체량당 발광량을 비교하였을 때 지연기 후반부에서 가장 높게 조사되었다 (Fig. 1). 또한 *D. desulfuricans*의 경우 BB886, BB170 모두 OD로 나누지 않아도 지연기 후반 부분에서 발광량이 급격히 증가하다가 감소한 후 성장곡선과 같이 대수성장기에서 지속적으로 증가하다가 정지기 초기에서 가장 높게 조사되었다. 이를 OD로 나누어 균체량당 발광량을 비교하였을 때 *D. desulfuricans*도 *D. vulgaris*와 마찬가지로 지연기 후반 부분에서 가장 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 위의 결과로 미루어 *D. desulfuricans*와 *D. vulgaris*의 quorum phenotype은 지연기에서 벗어나는 것을 촉진하는 것으로 사료된다. 이 현상을 부식과 연관성을 찾는다면 quorum signal이 SRB의 성장을 촉진하고 SRB의 성장이 촉진된다면 biofilm을 형성이 촉진되어 부식이 더 빠르게 진행될 것이라고 추측하였다. 만약 이 가정이 사실로 증명된다면 quorum 현상을 억제하면 SRB의 성장을 저해하여 SRB에 의한 부식을 부분적으로 억제할 수 있을 것이라고 사료된다.

참고문헌

1. Neelson, Kenneth H., 1977, Autoinduction of bacterial luciferase, 112:73-99, Arch. Microbiol.
2. Bassler, Bonnie L., Miriam Wright, Richard E. Showalter and Michael R. Silverman, 1993, Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulation expression of luminescence, 9: 773-786, Mol. Microbio.
3. Bassler, Bonnie L., Miriam Wright and Michael R. Silverman, 1994, Multiple signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway, 13:273-286, Mol. Microbio.

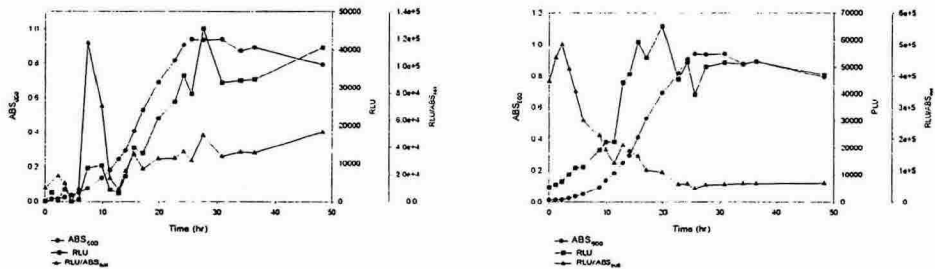


Fig. 1 Growth and production of quorum signaling substances of *D. vulgaris*. Quorum sensing (luminescence) was measured using *V. harveyi* BB886 (left) and BB170 (right).

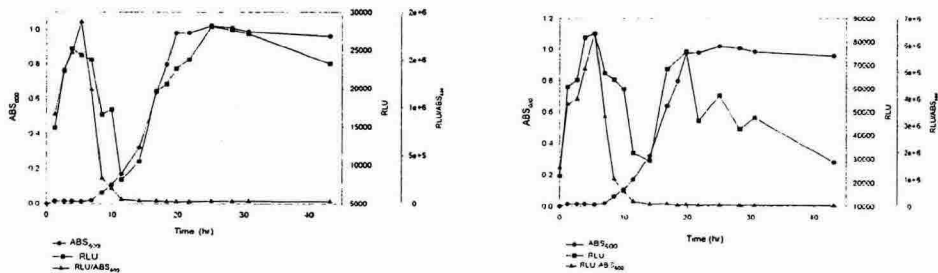


Fig. 2 Growth and production of quorum signaling substances of *D. desulfuricans*. Quorum sensing (luminescence) was measured using *V. harveyi* BB886 (left) and BB170 (right).