

# Acylase의 처리 시기 및 기간이 다종 생물막 형성에 미치는 영향

이지원, 정소연\*, 김태관\*  
부산대학교 미생물학과

Received: August 31, 2022 / Revised: October 24, 2022 / Accepted: October 28, 2022

## Effects of Acylase Treatment Episodes on Multispecies Biofilm Development

Ji Won Lee, So-Yeon Jeong\*, and Tae Gwan Kim\*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 46241, Republic of Korea

Acylases can have a significant effect on biofilm formation owing to their quorum quenching activity. In this study, we investigated the effects of acylase treatment episodes on multispecies biofilm development. A consortium composed of 9 species belonging to different genera was allowed to form biofilms for 5 days under various treatment episodes (different treatment periods, 1, 2, 3, or 4 days; and two application timings, beginning or later) at 1, 5, 10, 20 and 50 mg·l<sup>-1</sup> acylase concentrations. The acylase treatment for 5 days showed that acylase concentration was negative with biofilm development (linear regression,  $Y = -0.05 \cdot x + 2.37$ ,  $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.88$ ). Acylase was more effective in reducing biofilm formation when it was applied in the beginning (vs. in later development stage) at all acylase concentrations ( $p < 0.05$ ). ANOVA indicated that treatment period was significant on biofilm formation in both application timings at  $\geq 10$  mg·l<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ). Linearity test results showed that all slope values between period and biofilm were negative in both timings at  $\geq 10$  mg·l<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ , except for the later application at 20 mg·l<sup>-1</sup>). When temporal biofilm dynamics were monitored at 20 mg·l<sup>-1</sup>, biofilms gradually increased with time at all treatment episodes ( $p < 0.05$ ), and slope values in linear regression between biofilm and time were lower when acylase was applied in the beginning ( $p < 0.05$ ). Our findings suggest the importance of the acylase treatment period and application timing on biofilm control.

**Keywords:** Acylase, multispecies biofilm, quorum quenching activity

## 서론

생물막은 미생물이 세포 밖으로 스스로 분비하는 고분자 물질(extracellular polymeric substances, EPS) 속에 형성된 미생물군집의 3차원적 구조물이다[1]. 생물막은 미생물의 생존과 증식의 기본 형태로써 미생물이 접근할 수 있는 모든 종류의 표면과 생물 조직 등에서 형성될 수 있다[2-4]. 다양한 환경에서 발견되는 생물막은 감염성 질환의 주요 원인

이 되며 산업 분야에서 많은 문제를 발생시켜 경제적 손실을 야기하기 때문에 생물막을 조절하기 위한 전략이 큰 관심을 받고 있다[5, 6].

생물막 형성은 특정 신호전달 물질을 매개로 한 세균의 신호전달 체계인 quorum sensing (QS)에 의한 것으로 QS는 미생물의 표면 부착, EPS 생성 등 생물막 형성에 중요한 영향을 미친다[7, 8]. 세균이 세포 외로 분비하는 autoinducer라는 신호전달 물질은 세포 밀도와 비례하여 축적되며 물질이 특정 농도에 도달하면 그에 대한 반응으로 유전자 발현이 조절된다[9, 10]. 다양한 유전자들의 발현으로 특정 세포 밀도에서 세균의 집단적 행태가 변화하는데 생물막 형성이 대표적인 현상 중의 하나이다[7]. QS 과정은 그람 음성균과 그람 양성균 모두에서 발견되며 다양한 신호전달 물질 중에 주로 N-acyl homoserine lactones (AHL)은 그람 음성균에서 작용하고, autoinducing peptide (AIP)는 그람 양성균에

### \*Corresponding authors

S.-Y. Jeong

Phone: +82-51-510-3164, Fax: +82-51-514-1778

E-mail: jeongsy@pusan.ac.kr

T. G. Kim

Phone: +82-51-510-2268, Fax: +82-51-514-1778

E-mail: tkim@pusan.ac.kr

서 작용하는 것으로 잘 알려져 있다[10, 11].

신호전달 물질의 분해를 기반으로 생물막 형성을 억제하는 연구가 활발하게 진행되고 있다[5, 6, 12]. 생물막 형성을 조절하기 위한 다양한 anti-QS 전략 중에서 quorum quenching (QQ)은 QS 과정에서 신호전달 물질을 분해하여 생물막 형성을 억제하는 메커니즘으로써 QQ 효소는 QS를 조절하고 효과적인 생물막 형성 억제를 가능하게 한다[13, 14]. QQ 효소 중 AHL의 분해와 관련되어 있는 대표적인 효소는 AHL의 lactone ring의 ester 결합을 분해하는 lactonase와 lactone ring과 acyl side chain 사이의 amide 결합을 분해하는 acylase가 있다[15]. 특히 acylase는 생물막을 억제하기 위한 QQ 전략으로써 다양한 연구에서 이용되고 있다[12, 16]. 예를 들어, 수처리 기술에 널리 사용되고 있는 막생물반응기(membrane bioreactor)에서 생물막에 의해 발생하는 biofouling 현상을 조절하기 위해 acylase를 적용한 연구가 다양하게 진행되고 있다[13, 14]. QQ 효소를 널리 이용하기 위해서는 비용 및 안정화 등의 문제가 해결되어야 하며 QQ의 효율적인 적용 전략을 수립하기 위해서는 이에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다. Acylase의 농도와 처리량뿐만 아니라 생물막 형성 과정에서 단계에 따른 acylase의 처리 시기도 생물막 형성에 중요한 영향을 미칠 수 있다.

본 연구에서는 9종의 박테리아로 구성된 컨소시엄을 사용하여 acylase의 처리 시기(생물막 형성 단계에 따른 acylase의 처리) 및 처리 기간(1-4일)이 다중 생물막(multispecies biofilm) 형성에 미치는 영향을 규명하였다. Acylase의 처리 조건(처리 시기 및 기간)에 따라 10가지 episode를 디자인하고 각 episode에서 다양한 acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>)에 따라 생물막 형성 특성을 분석하였다. 또한, 10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 접종원

본 연구에서는 생물막 형성을 위한 접종원으로써 9종의 박테리아로 구성된 컨소시엄을 사용하였으며, 각 박테리아는 다양한 환경으로부터 분리되었다(Table 1) [17-19]. 각 박테리아는 사용 전까지 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 고체배지(MB cell, KisanBio Co., Ltd., Korea)에서 순수 콜로니 상태로 보관되었다. 박테리아의 순수 배양액을 획득하기 위해서 콜로니를 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 액체배지에 접종한 후 30°C, 200 rpm 조건에서 최대 36시간 동안 배양하였다. 각 순수 배양액을 증량하기 위해서 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 액체배지 60 ml에 배양액 1 ml을 접종한 후 30°C, 200 rpm 조건에서 최대 36시간 동안 배양하여 9종의 순수 배양액을 획득하였다. 멸균된 2 l media bottle에 각 순수 배양액을 섞어 9종의 박테리아로 구성된 컨소시엄을 제조하였다. 모든 실험 조건에서 동일 컨소시엄을 사용하기 위해서 컨소시엄의 건조균체량(dry cell weight)을 측정하고 농도 0.5 g·l<sup>-1</sup>의 컨소시엄을 15 ml conical tube에 분주하여 사용 전까지 -70°C에 보관하였다. 컨소시엄은 모든 조건의 실험 수행 시 5°C에서 4시간 30분 동안 해동하여 사용하였다.

### 사용 균주의 생물막 형성 특성

Acylase가 각 박테리아의 생물막 형성에 미치는 영향을 분석하였다. 각 순수 콜로니를 1 g·l<sup>-1</sup>의 R2A 액체배지에 접종한 후 30°C, 200 rpm 조건에서 최대 36시간 동안 배양하였다. 배양액을 회수하여 원심분리 후 상등액을 제거하고 0.9% NaCl solution을 이용하여 현탁하였다. 각 배양액의 초기 바이오매스를 동일하게 하기 위해 건조균체량을 측정하여 9종 모두 최종 농도 0.5 g·l<sup>-1</sup>로 맞추어 주었다. 생물막 형성을 위해 멸균된 96 well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd.,

**Table 1. Bacterial isolates used in this study.**

No.	Isolate	Source	Culture collection	Reference
1	<i>Acinetobacter</i> sp. YS01	Wetland soil	KCTC 82588	Noh <i>et al.</i> 2021
2	<i>Bacillus</i> sp. AS03	Activated sludge	KCTC 43305	In this study
3	<i>Escherichia coli</i>	KCTC <sup>a</sup>	KCTC 2791	Noh <i>et al.</i> 2021
4	<i>Enterobacter</i> sp. YS02	Wetland soil	KCTC 82586	Noh <i>et al.</i> 2021
5	<i>Microbacterium</i> sp. NM2	Soil	KCTC 29496	Jeong <i>et al.</i> 2018
6	<i>Sphingobium xanthum</i>	FBCC <sup>b</sup>	FBCC 500366	In this study
7	<i>Sphingopyxis</i> sp. NM1	Soil	KCTC 32429	Jeong <i>et al.</i> 2014
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	KCTC <sup>a</sup>	KCTC 3340	Noh <i>et al.</i> 2021
9	<i>Xanthomonas translucens</i>	FBCC <sup>b</sup>	FBCC 500042	In this study

<sup>a</sup> Korean Collection for Type Cultures (KCTC).

<sup>b</sup> Freshwater Bioresources Culture Collection (FBCC).

**Table 2. Different acylase treatment episodes.**

Treatment episode	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
C			No acylase		
L1		No acylase			Acylase
L2		No acylase		Acylase	
L3	No acylase			Acylase	
L4	No acylase		Acylase		
B1	Acylase		No acylase		
B2		Acylase		No acylase	
B3		Acylase		No acylase	
B4			Acylase		No acylase
A			Acylase		

Acylase, acylase was added to a final concentration of 1, 5, 10, 20 or 50 mg·l<sup>-1</sup>.  
 No acylase, acylase was not added.

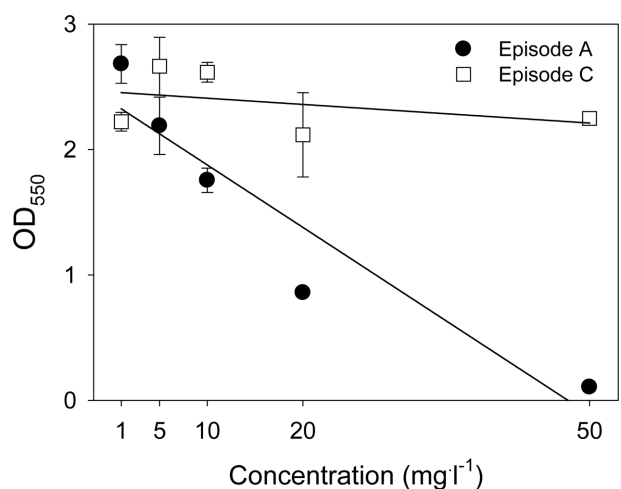
Korea)를 사용하였으며, well의 직경과 높이는 각각 6.9 mm와 10.8 mm였다. 접종원으로써 각 배양액 100 µl에 acylase (porcine kidney acylase I, Sigma-Aldrich, USA)를 50 mg·l<sup>-1</sup> 농도로 혼합하여 plate well에 분주한 후 25°C, 40 rpm 조건에서 배양하였다. Acylase를 혼합하지 않은 배양액 100 µl를 대조군으로써 사용하였다. 24시간 후에 기존 상등액은 제거한 후 새 배지를 교체하기 위해 acylase를 50 mg·l<sup>-1</sup>로 혼합 혹은 혼합하지 않은 1 g·l<sup>-1</sup> R2A 배지 100 µl를 분주하였으며 48시간 경과 시점에 생물막 형성 특성을 분석하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

**10가지 episode에서 acylase 농도별 생물막 형성 특성**

Acylase 처리 조건(처리 시기 및 기간)에 따른 10가지 episode에서 acylase 농도별(1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>) 생물막 형성 특성을 분석하였다. 기존 연구 결과를 바탕으로 생물막 형성 억제를 나타내는 농도 범위를 설정하였으며 본 연구에서 사용한 acylase(porcine kidney acylase I, Sigma-Aldrich) 1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>는 제조사 설명서 기준으로 각각 최대 1,500, 7,500, 15,000, 30,000, 75,000 unit·l<sup>-1</sup>의 효소 활성을 나타낸다. 생물막 형성을 위해 접종원으로써 미생물 킨소시엄 100 µl에 acylase를 농도별로 혼합하여 멸균된 96 well plate에 분주한 후 25°C, 40 rpm 조건에서 배양하였다. 24시간 간격으로 새 배지를 교체하기 위해 기존 상등액은 제거한 후 조건에 따라 acylase를 농도별로 혼합 혹은 혼합하지 않은 1 g·l<sup>-1</sup> R2A 배지 100 µl를 분주하였으며 총 5일 동안 반복하였다. Acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>)에 따른 생물막 형성 특성을 분석하기 위해서 본 실험의 episode A와 episode C 결과를 활용해서 추가 분석하였다(Fig. 1). 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

**10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성**

Acylase 농도는 20 mg·l<sup>-1</sup>로 고정하고 acylase 처리 조건(처리 시기 및 기간)에 따른 10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성을 분석하였다. 생물막 형성을 위해 접종원으로써 미생물 킨소시엄 100 µl에 acylase를 20 mg·l<sup>-1</sup> 농도로 혼합하여 멸균된 96 well plate에 분주한 후 25°C, 40 rpm 조건에서 배양하였다. 24시간 간격으로 새 배지를 교체하기 위해 기존 상등액은 제거한 후 조건에 따라 acylase를 20 mg·l<sup>-1</sup> 농도로 혼합 혹은 혼합하지 않은 1 g·l<sup>-1</sup> R2A 배지 100 µl를 분주하였으며 총 5일 동안 반복하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.



**Fig. 1. Biofilm developments under the treatment episodes A and C with different acylase concentrations.** Error bars represent standard deviation of the mean (n = 3).

### 생물막 정량

생물막 형성 특성을 분석하기 위해 crystal violet (CV) 염색법으로 생물막을 정량하였다[20]. 각 실험에서 생물막 형성이 완료되면 멸균수 800 ml을 채운 1 l 비커에 plate를 담가서 생물막을 washing한 후 물기를 제거하였다. Plate의 각 well에 0.1% CV 용액(Sigma Aldrich) 200  $\mu$ l를 분주한 후 25°C에서 15분 동안 생물막을 염색하였다. 멸균수 800 ml을 채운 1 l 비커에 plate를 담가서 남아있는 CV 용액을 washing한 후, plate를 뒤집어서 24시간 동안 건조시켰다. 각 well에 30% acetic acid 용액(Duksan pure chemicals Co., Ltd., Korea) 200  $\mu$ l를 분주하고 25°C에서 15분 동안 CV를 용해시켰다. UV-1800 240 V 분광광도계(Shimadzu Corp., Japan)를 이용하여 550 nm 파장에서 CV 흡광도를 측정하였다.

### 결 과

#### 사용 균주의 생물막 형성 특성

Acylase가 각 박테리아의 생물막 형성에 미치는 영향을 분석하였다(Table 3). Acylase 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 을 처리했을 때 총 9종의 박테리아 중 *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Sphingobium* 3종의 생물막 형성이 억제되었다( $p < 0.05$ ). *Acinetobacter*는 24시간 경과 시점에 acylase에 의해 대조군 대비 25.4% 생물막 형성이 억제되었으며, *Enterobacter*와 *Sphingobium*은 48시간 경과 시점에 대조군 대비 각각 62.7%, 80.8% 생물막 형성이 억제되었다.

#### Acylase 농도에 따른 생물막 형성 특성

Acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )에 따른 생물막 형성 특성을 분석하였다(Fig. 1). 대조군으로써 5일 동안 acylase

를 처리하지 않은 조건(episode C)에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 2.37(2.12–2.66)이었다. 각 농도별로 acylase를 5일 동안 처리한 조건(episode A)에서 형성된 생물막은 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  acylase 농도에서 OD 값 2.68, 5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  농도에서 2.19, 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  농도에서 1.75, 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  농도에서 0.86, 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  농도에서 0.11이었다. Acylase 농도가 증가할수록 생물막 형성은 억제되었다( $Y = -0.05 \cdot x + 2.37$ ,  $R^2 = 0.88$ ,  $p < 0.05$ ).

#### 10가지 episode에서 acylase 농도별 생물막 형성 특성

Acylase 처리 조건에 따른 10가지 episode에서 acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )에 따른 생물막 형성 특성을 분석하였다(Fig. 2, Table 3). Acylase를 5일 동안 처리한 조건(episode A)과 처리하지 않은 조건(episode C)에서 형성된 생물막은 acylase 5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이하 농도에서 양적인 차이를 나타내지 않은 반면에( $p > 0.05$ ) 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상의 acylase 처리 조건에서 생물막 형성은 억제되었다( $p < 0.05$ ). 생물막 형성 시작 단계에서 acylase를 처리한 경우(B1–B4)는 생물막이 형성된 후에 acylase를 처리한 경우(L1–L4)에 비해서 생물막 형성이 더 효과적으로 억제되었다(L1–L4 vs. B1–B4,  $p < 0.05$ ). Acylase 농도 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 로 처리한 L1–L4와 B1–B4 조건에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 각각 2.87, 2.05였다. Acylase를 5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  처리한 L1–L4와 B1–B4 조건에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 각각 2.90, 1.89였으며 acylase를 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 로 처리한 L1–L4와 B1–B4 조건에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 각각 2.59, 1.71이었다. Acylase 농도가 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  일 때 L1–L4와 B1–B4 조건에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 각각 2.40, 1.19였으며 acylase 농도가 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  일 때 L1–L4와 B1–B4 조건에서 형성된 생물막의 OD 평균값은 각각 1.60, 0.44였다.

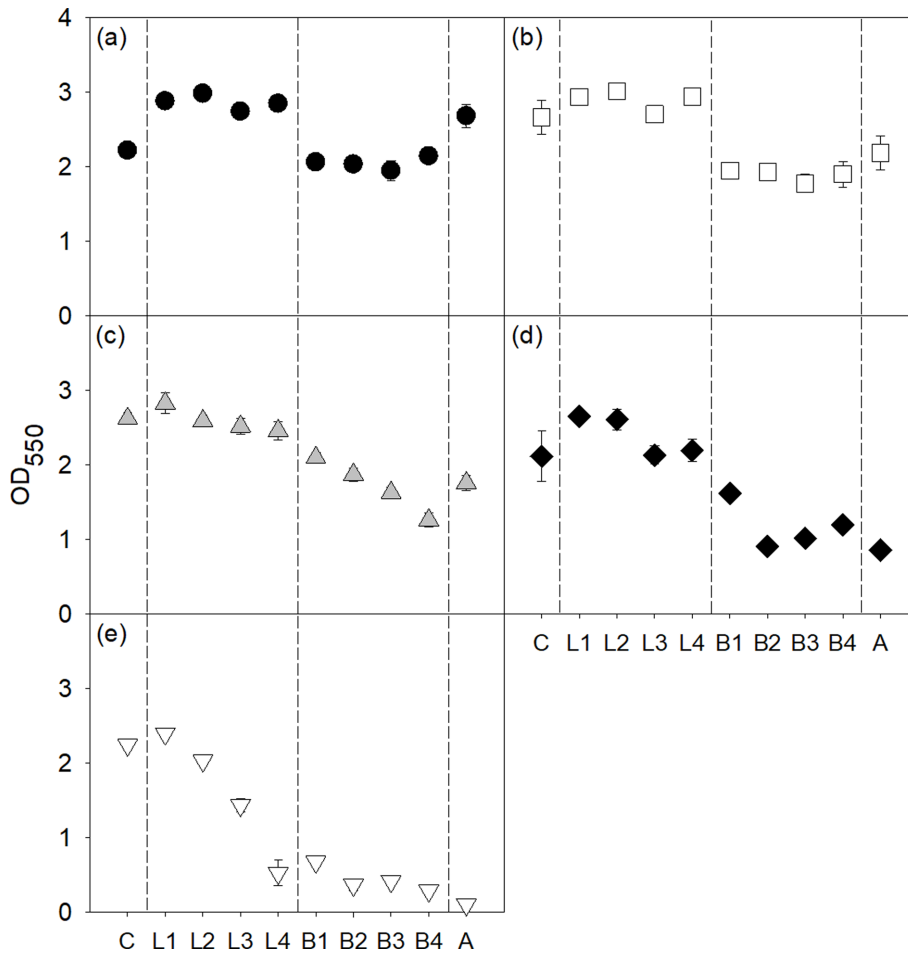
각 acylase 농도별로 생물막 형성 시작 단계에 acylase를

**Table 3. Characteristics of bacterial isolates used in this study.**

No.	Genus	Phylum	Colony growth on R2A agar		AHL signal <sup>a</sup>	Acylase effect <sup>b</sup>
			Color	Shape		
1	<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria	Cream	Irregular	Yes [23]	Yes
2	<i>Bacillus</i>	Firmicutes	Greyish white	Irregular	No	No
3	<i>Escherichia</i>	Proteobacteria	Cream	Circular	Yes [24]	No
4	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria	Cream	Irregular	Yes [24]	Yes
5	<i>Microbacterium</i>	Actinobacteria	Light yellow	Irregular	No	No
6	<i>Sphingobium</i>	Proteobacteria	Yellow	Circular	Yes [26]	Yes
7	<i>Sphingopyxis</i>	Proteobacteria	Yellow	Circular	Yes [26]	No
8	<i>Staphylococcus</i>	Firmicutes	Cream	Circular	No	No
9	<i>Xanthomonas</i>	Proteobacteria	Light yellow	Irregular	Yes [25]	No

<sup>a</sup> It has been known to sense the N-acyl homoserine lactones (AHL) molecules.

<sup>b</sup> Effect of 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  acylase on biofilm development in this study. Yes, biofilm inhibition ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2. Biofilm developments under different acylase treatment episodes.** (a) 1 mg·l<sup>-1</sup> acylase; (b) 5 mg·l<sup>-1</sup> acylase; (c) 10 mg·l<sup>-1</sup> acylase; (d) 20 mg·l<sup>-1</sup> acylase; and (e) 50 mg·l<sup>-1</sup> acylase. Error bars represent standard deviation of the mean (n = 3). Treatment episodes were described in Table 2.

처리 하지 않은 조건(L1-L4)과 acylase를 처리한 조건(B1-B4)에서 acylase 처리 기간과 생물막 형성 사이의 선형 회귀 분석을 수행하였다(Table 4). Acylase 농도 5 mg·l<sup>-1</sup> 이하 L1-L4과 B1-B4 모든 조건에서 acylase의 처리 기간이 증가함에도 불구하고 생물막 형성은 억제되지 않았다( $p > 0.05$ ). Acylase 농도 10 mg·l<sup>-1</sup> 이상의 L1-L4와 B1-B4 모든 조건에서 acylase의 처리 기간이 증가함에 따라 생물막 형성은 억제되었다(acylase 20 mg·l<sup>-1</sup>의 B1-B4 조건 제외). 특히, acylase 농도가 10 mg·l<sup>-1</sup>에서 50 mg·l<sup>-1</sup>로 증가할수록 L1-L4 조건에서 acylase의 처리 기간이 증가하면 생물막 형성은 급격하게 억제되었다(slope value, -0.12에서 -0.62로 감소). ANOVA 결과에 따르면 acylase의 처리 시기(생물막 형성 단계에 따른 acylase의 처리)에 상관없이 acylase 10 mg·l<sup>-1</sup> 이상 농도에서 acylase의 처리 기간은 생물막 형성에 유의한 영향을 미쳤다( $p < 0.05$ ).

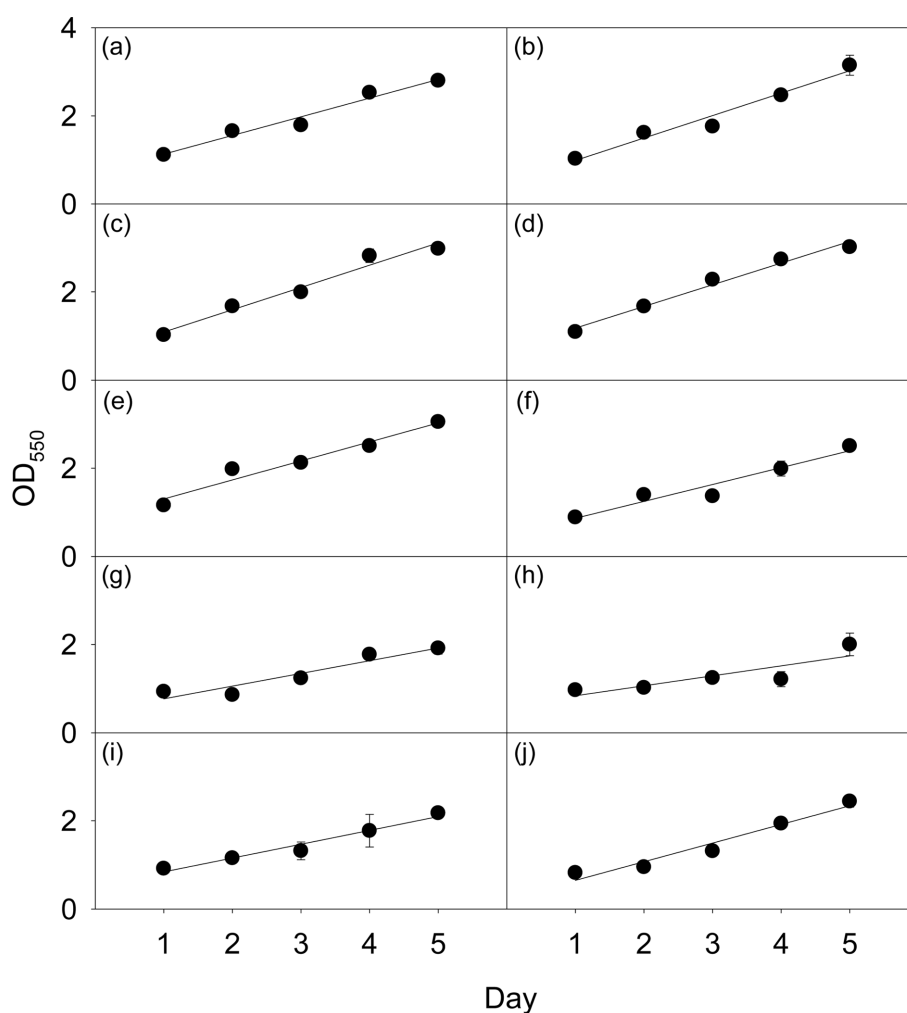
**10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성**

Acylase 20 mg·l<sup>-1</sup>를 이용하여 10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성을 분석하였다(Fig. 3). 10가지 모든 조건에서 생물막은 시간에 따라 증가하였다( $p < 0.05$ ). 시간이 경과함에 따라 episode C와 episode A에서 생물막 OD 값은 각각 1.12에서 2.80, 0.82에서 2.45까지 증가했다. L1에서의 OD 값은 1.03에서 3.15, L2의 OD 값은 1.03에서 2.98, L3의 OD 값은 1.10에서 3.02, L4의 OD 값은 1.16에서 3.05까지 증가했다. B1에서의 시간에 따른 생물막 OD 값은 0.89에서 2.50, B2의 OD 값은 0.93에서 1.91, B3의 OD 값은 0.97에서 2.01, B4의 OD 값은 0.92에서 2.17까지 증가했다.

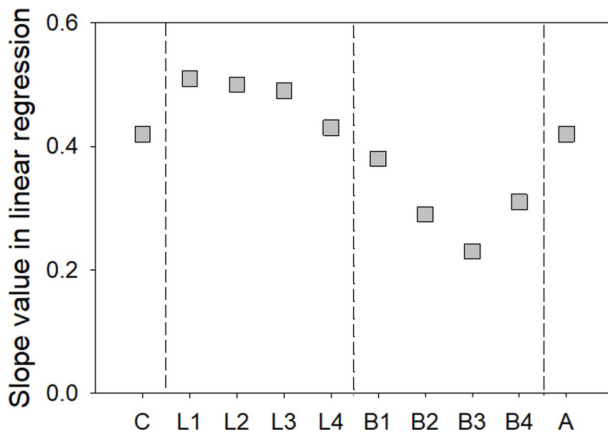
각 episode에서 배양 시간과 생물막 형성 사이의 선형 회귀 분석을 수행한 후, 각각의 slope value를 분석하였다(Fig. 4). Episode C와 A의 slope value는 모두 0.42였다. L1-L4과 B1-B4 조건에서의 평균 slope value는 각각 0.48

**Table 4. Linearity test results between biofilm development and acylase treatment period (Fig. 2).** The symbol \* indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ). Treatment episodes were described in Table 2.

Concentration ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Treatment	a	b	R <sup>2</sup>	p value
1	L1-L4	-0.0336	2.9493*	0.1337	$p < 0.05$
	B1-B4	0.0155	2.0093*	0.0324	
5	L1-L4	-0.0293	2.9747*	0.0663	$p < 0.05$
	B1-B4	-0.0288	1.9613*	0.0742	
10	L1-L4	-0.1179*	2.8880*	0.6205	$p < 0.05$
	B1-B4	-0.2749*	2.3987*	0.9411	
20	L1-L4	-0.1835*	2.8573*	0.6465	$p < 0.05$
	B1-B4	-0.1155	1.4747*	0.2189	
50	L1-L4	-0.6205*	3.1507*	0.9482	$p < 0.05$
	B1-B4	-0.1109*	0.7160*	0.6646	



**Fig. 3. Temporal biofilm variation at each acylase treatment episode.** (a) C episode; (b) L1; (c) L2; (d) L3; (e) L4; (f) B1; (g) B2; (h) B3; (i) B4; and (j) A. Temporal biofilm dynamics were monitored at an acylase concentration of  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Error bars represent standard deviation of the mean ( $n = 3$ ).



**Fig. 4. A slope value in linear relationship between biofilm development and time under the acylase treatment episodes (Fig. 3).**

과 0.30으로 생물막 형성 시작 단계에서 acylase의 처리는 시간에 따른 생물막 증가를 더디게 하였다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

본 연구에서는 다양한 환경에 광범위하게 분포하며 유기물을 이용하여 성장하는 중속영양세균(heterotrophic bacteria)으로써 6종의 그람 음성균과 3종의 그람 양성균을 선택하여 연구를 수행하였다(Table 3). 이들은 종종 토양, 활성슬러지 등 다양한 환경에서 공존하고 있음을 알 수 있다. 예를 들어, 식물 뿌리 토양의 미생물군집에서 *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*가 공존하고 있었으며, 활성슬러지 미생물군집에서 *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Sphingopyxis*가 공존하는 결과가 보고되었다[21, 22].

본 연구에서 사용한 그람음성균에 해당하는 6종의 속(genus)은 신호전달 물질인 N-acyl homoserine lactones (AHL)을 감지할 수 있다고 보고된 바 있다[23–26]. 본 연구 결과에 따르면 6종의 그람음성균 중 acylase에 의해 *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Sphingobium* 3종의 생물막 형성이 억제되었다( $p < 0.05$ ). 이를 통해 3종의 생물막 형성은 AHL에 의한 quorum sensing (QS)을 통해 조절되었을 것이라고 추측된다. Acylase 50 mg·l<sup>-1</sup>에 의한 생물막 형성 억제 효과는 실험 시작 후 48시간 이내에 가장 크게 나타났으며 이후 72, 96시간 경과 시점에 acylase에 의한 생물막 형성 억제 효과는 감소하였다. 단일종 생물막 형성에 미치는 acylase의 영향은 다양한 환경 조건에 따라 달라질 수 있으며 이들이 다른 종과 혼합된 상태에서 형성되는 생물막에서의 acylase 영향은 또 다른 특성을 나타낼 수 있다.

Acylase의 처리 시기 및 기간에 따른 10가지 episode에서

다양한 acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>)에 따라 다중 생물막 형성 특성을 분석하였다. 각 농도별로 acylase를 5일 동안 처리한 조건(episode A)에서 acylase의 농도가 1 mg·l<sup>-1</sup>에서 50 mg·l<sup>-1</sup>까지 증가함에 따라 생물막 형성은 억제되었으며( $Y = -0.05 \cdot x + 2.37$ ,  $R^2 = 0.88$ , slope value,  $p < 0.05$ ), acylase를 처리하지 않은 조건(episode C)에서 생물막 형성은 양적으로 거의 변하지 않았다( $Y = -0.01 \cdot x + 2.46$ ,  $R^2 = 0.10$ ,  $p > 0.05$ ). Acylase 5 mg·l<sup>-1</sup> 이하 농도에서 생물막은 양적으로 감소하지 않은 반면에(episode A vs. episode C,  $p > 0.05$ ) acylase 10 mg·l<sup>-1</sup> 이상 농도에서 생물막 형성은 억제되었다( $p < 0.05$ ). Acylase 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>의 농도에서 생물막 형성은 대조군 대비 각각 33%, 59%, 95% 억제되었다(Fig. 1). 다른 연구 결과에 따르면 5 mg·l<sup>-1</sup> acylase는 *Aeromonas*와 *Pseudomonas*에 의해 생성되는 생물막을 대조군(0 mg·l<sup>-1</sup>)에 비해 각각 60%와 73% 감소시켰다[12]. 또 다른 연구에서는 수족관에서 채취한 물 샘플에 acylase를 15 mg·l<sup>-1</sup> 또는 150 mg·l<sup>-1</sup> 혼합한 후 1시간 또는 22시간 동안 생물막을 형성시킨 경우 대조군 대비 최대 생물막 형성이 각각 10%와 40% 억제되었다[27]. 다양한 미생물 종에 의한 생물막 형성은 영양분 농도, 배양 조건 등 여러 환경요인에 따라 변화하겠지만 acylase는 단일종에 의한 생물막 형성뿐만 아니라 다중 생물막 형성을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내었다.

모든 acylase 농도(1, 5, 10, 20, 50 mg·l<sup>-1</sup>)에서 생물막 형성 시작 단계에 acylase를 처리한 경우(B1–B4)는 생물막이 형성된 후에 acylase를 처리하는 경우(L1–L4)보다 생물막 형성이 더 크게 억제되었다(L1–L4 vs. B1–B4,  $p < 0.05$ ). 다른 연구 결과에 따르면 치아 표면에 생물막을 형성하는 *Streptococcus mutans*에 chitosan을 처리했을 때 생물막 형성 단계에 따라 생물막 억제 효과가 다르게 나타났다[28]. 생물막 형성 초기 단계에서 chitosan을 처리한 경우 생물막이 완전히 제거된 반면에 생물막 형성이 진행된 후에는 더 높은 농도와 긴 처리 시간이 요구되었다[28]. 일반적으로 생물막이 표면에 부착되고 성장을 하면 단단한 구조체를 형성하면서 외부 물질에 대한 저항성이 높아지기 때문에 생물막 형성을 억제하기 위해서는 생물막 형성 시작 단계에서 생물막을 조절하는 것이 더욱 효과적일 것이다. 다중 생물막 형성 시작 단계에서 acylase의 처리는 active colonizer 또는 stimulator의 역할을 하는 특정 종의 생물막 형성을 억제할 수 있다고 추측된다. Acylase가 다중(multispecies)의 신호전달 물질이나 그들의 상호작용 등에 미치는 영향을 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 각 농도별 acylase의 처리 시기(L1–L4 또는 B1–B4)에서 acylase의 처리 기간이 생물막 형성에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 2 and Table 4). Acylase 5 mg·l<sup>-1</sup> 이하 농도에서 acylase의 처

리 시기에 상관없이 처리 기간이 증가함에도 불구하고 생물막 형성은 억제되지 않았다( $p > 0.05$ ). 다중 생물막 형성을 억제하기 위해서는 어느 정도 이상의 acylase 농도가 요구되며  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이하의 농도는 처리 기간보다 적절한 acylase의 처리 시기가 생물막 형성 억제에 더 효과적임을 알 수 있다. 반면에 acylase  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상 농도는 모든 L1-L4와 B1-B4 조건에서 acylase의 처리 기간이 증가함에 따라 생물막 형성은 억제되었다( $p < 0.05$ , 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  B1-B4 제외). Acylase 농도가 높아질수록( $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 에서  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 으로 증가) L1-L4 조건에서 acylase의 처리 기간에 따라 생물막 형성은 급격하게 억제되었다. Acylase  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상의 농도는 acylase의 처리 시기뿐만 아니라 처리 기간도 생물막 형성 억제에 중요한 요인으로 작용하고 있음을 알 수 있다. 또한, 이미 생물막이 형성된 후에도 acylase의 농도와 처리 기간을 증가시키면 효과적으로 생물막 형성을 억제할 수 있음을 보여주었다. 본 연구에서는  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 의 농도로 대조군에 비해 생물막 형성을 95%까지 억제시킨 결과로 보아 acylase가 적정 농도에 도달하면 생물막 형성 억제 효과가 최대치에 도달할 것으로 판단된다. 다른 연구 결과에 따르면 borosilicate glass 표면에서 형성된 *Aeromonas*의 생물막은  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 의 acylase 농도에서 대조군( $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) 대비 생물막 형성이 15% 감소되었으며  $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 에서 36%가 감소한 반면에 그 이상의 농도에서는 더 이상 생물막 억제 효과가 나타나지 않았다[12]. 동일한 borosilicate glass 표면에서 *Pseudomonas*에 의해 형성된 생물막은  $11 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 의 acylase 농도에서 대조군 대비 생물막 형성이 23% 억제되었으며 그 이상의 농도에서는 더 이상의 억제 효과가 나타나지 않았다[12]. 이와 같이 다양한 조건과 환경에 따라 생물막 형성 억제를 위한 최적의 acylase 농도가 다르게 나타난다. 따라서 적절한 acylase 농도 조건을 규명한다면 생물막 형성 조절을 위한 acylase의 효율적인 사용 전략을 제시할 수 있을 것이다.

Acylase  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 를 이용하여 10가지 episode에서 시간에 따른 생물막 형성 특성을 분석하였다(Fig. 3). 10가지 모든 episode에서 생물막은 saturation없이 5일 동안 시간에 따라 증가하였으며( $p < 0.05$ ), acylase의 처리 시기는 생물막의 증가 속도를 조절할 수 있음을 보여주었다. 배양 시간과 생물막 형성 사이의 선형 회귀 분석 결과에서 slope 값을 비교해보면 생물막 형성 시작 단계에 acylase를 처리한 경우(B1-B4)가 생물막 형성 후 단계에서 acylase를 처리한 경우(L1-L4)에 비해 더 작은 값을 나타냈다(B1-B4 vs. L1-L4,  $p < 0.05$ ). 이는 생물막 형성 시작 단계에서 acylase의 처리는 시간에 따른 생물막의 양적 증가를 더디게 할 수 있음을 의미한다. 유사하게 막생물반응기(membrane bioreactor)에 acylase를 처리한 경우 분리막의 막 오염이 감소했으며 분리

막 사이의 압력 증가가 지연되는 결과가 보고되었다[13]. Acylase에 의한 AHL의 quorum quenching이 분리막의 biofouling을 억제할 수 있다고 보고되었으며 더 나아가 acylase의 처리 시기에 따라 생물막이 증가되는 속도를 조절할 수 있다면 더욱 효율적인 시스템 운영이 가능할 것이다.

본 연구에서 acylase의 처리 시기(생물막 형성 단계에 따른 acylase의 처리)는 acylase 농도에 상관없이 생물막 형성에 영향을 미쳤다(B1-B4 vs. L1-L4,  $p < 0.05$ ). 반면에 acylase의 처리 기간은  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상의 농도에서 생물막 형성에 영향을 미쳤다. 생물막 형성 시작 단계에서 acylase를 처리하면 생물막을 더 효과적으로 억제할 수 있지만 이미 생물막이 형성된 후에도 acylase의 농도와 처리 기간을 증가시키면 생물막 형성이 억제되었다. 하지만 acylase 농도의 무한 증가보다는 생물막 종류와 환경 조건에 따라 생물막 형성 억제를 위한 최적의 농도가 존재할 것이라 추측된다. 본 연구에서는 acylase의 처리 시기 및 기간이 다중 생물막 형성에 중요한 영향을 미치고 있음을 제시하였다.

## 요 약

Quorum quenching 활성을 나타내는 acylase 효소는 생물막 형성에 중요한 영향을 미친다. 본 연구에서는 acylase 처리 조건(acylase 처리 시기 및 기간)이 다중 생물막(multispecies biofilm) 형성에 미치는 영향을 규명하였다. 서로 다른 속(genus)에 속하는 9종의 박테리아로 구성된 컨소시엄을 사용하여 acylase 처리 조건에 따른 10가지 episode에서 다양한 acylase 농도( $1, 5, 10, 20, 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )에 따라 5일 동안 생물막을 형성시켰다. 각 농도별로 5일 동안 acylase를 처리한 조건에서 acylase의 농도가 증가함에 따라 생물막 형성은 억제되었다(linear regression,  $Y = -0.05 \cdot x + 2.37$ ,  $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.88$ ). 모든 acylase 농도 조건에서 acylase를 생물막이 형성된 후에 처리한 경우(L1-L4)에 비해서 생물막 형성 시작 단계에 처리한 경우(B1-B4) 생물막 형성이 더 효과적으로 억제되었다( $p < 0.05$ ). ANOVA 결과에 따르면 acylase  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상 농도에서 acylase 처리 기간(period)은 acylase 처리 시기(application timings, beginning or later)에 상관없이 생물막 형성에 영향을 미쳤다( $p < 0.05$ ). 각 농도별 처리 시기(L1-L4 또는 B1-B4)에서 처리 기간과 생물막 형성 사이의 선형 회귀 분석 결과에 따르면 acylase  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  이상 농도에서 acylase 처리 기간이 증가함에 따라 생물막 형성은 억제되었다( $p < 0.05$ ,  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  농도의 L1-L4 제외). 시간에 따른 생물막 형성 결과에 따르면 모든 10가지 episode에서 생물막은 시간에 따라 점차 증가했으며( $p < 0.05$ ), 배양 시간과 생물막 형성 사이의 선형 회귀 분석 기울기 값은 acylase를 생물막 형성 시작 단계에 처리했을 때 더



낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 본 연구 결과는 생물막 형성 억제에 대한 acylase의 처리 시기 및 기간의 중요성을 시사한다.

## Acknowledgments

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Flemming H-C, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623-633.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95-108.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.
- Watnick P, Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679.
- Choudhary S, Schmidt-Dannert C. 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1267-1279.
- Siddiqui MF, Rzechowicz M, Harvey W, Zularisam AW, Anthony GF. 2015. Quorum sensing based membrane biofouling control for water treatment: A review. *J. Water Process Eng.* **7**: 112-122.
- Kjelleberg S, Molin S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 254-258.
- Elias S, Banin E. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 990-1004.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**: 269-275.
- Reading NC, Sperandio V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 1-11.
- Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 319-346.
- Paul D, Kim YS, Ponnusamy K, Kweon JH. 2009. Application of quorum quenching to inhibit biofilm formation. *Environ. Eng. Sci.* **26**: 1319-1324.
- Yeon K-M, Cheong W-S, Oh H-S, Lee W-N, Hwang B-K, Lee C-H, et al. 2009. Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 380-385.
- Jiang W, Xia S, Liang J, Zhang Z, Hermanowicz SW. 2013. Effect of quorum quenching on the reactor performance, biofouling and biomass characteristics in membrane bioreactors. *Water Res.* **47**: 187-196.
- Fetzner S. 2015. Quorum quenching enzymes. *J. Biotechnol.* **201**: 2-14.
- Kim J-H, Choi D-C, Yeon K-M, Kim S-R, Lee C-H. 2011. Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 1601-1607.
- Noh YJ, Jeong S-Y, Kim TG. 2021. Effects of different heterotrophic bacteria on phototrophic activity of *Chlorella* sp. MF1907. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**: 101-110.
- Jeong S-Y, Cho K-S, Kim TG. 2014. Density-dependent enhancement of methane oxidation activity and growth of *Methylocystis* sp. by a non-methanotrophic bacterium *Sphingopyxis* sp. *Biotechnol. Rep.* **4**: 128-133.
- Jeong S-Y, Cho K-S, Kim TG. 2018. Adverse effect of the methanotroph *Methylocystis* sp. M6 on the non-methylotroph *Microbacterium* sp. NM2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1706-1715.
- O'Toole GA. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE-J Vis. Exp.* e2437.
- Dong C-J, Wang L-L, Li Q, Shang Q-M. 2019. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One* **14**: e0223847.
- Zheng L, Ren M, Xie E, Ding A, Liu Y, Deng S, Zhang D. 2019. Roles of phosphorus sources in microbial community assembly for the removal of organic matters and ammonia in activated sludge. *Front. Microbiol.* **10**: 1023.
- Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **190**: 3386-3392.
- Gray KM. 1997. Intercellular communication and group behavior in bacteria. *Trends Microbiol.* **5**: 184-188.
- Vfseleva M, Kholmeckaya M, Klein S, Voronina E, Lipasova V, Metlitskaya A, et al. 2003. Production of *N*-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol.* **48**: 794-798.
- Gan HM, Gan HY, Ahmad NH, Aziz NA, Hudson AO, Savka MA. 2015. Whole genome sequencing and analysis reveal insights into the genetic structure, diversity and evolutionary relatedness of *luxI* and *luxR* homologs in bacteria belonging to the *Sphingomonadaceae* family. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **4**: 188.
- Xu F, Byun T, Dussen H-J, Duke KR. 2003. Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.* **101**: 89-96.
- Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali L, Petrelli D, et al. 2008. Antibacterial activity and anti-biofilm effect of chitosan against strains of *Streptococcus mutans* isolated in dental plaque. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **21**: 993-997.