



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

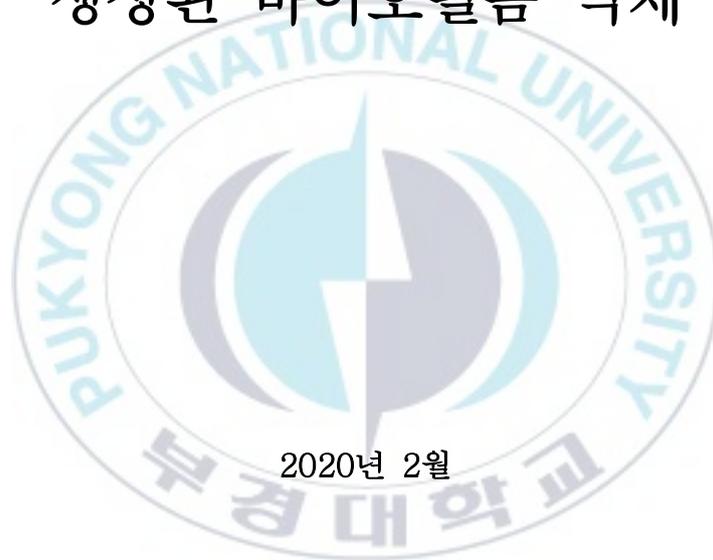
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학 석사 학위 논문

키토산올리고당-금나노입자의 특성 및  
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1에 의해  
생성된 바이오필름 억제



2020년 2월

부경대학교 대학원

식품공학과

이 장 원

공학석사학위논문

키토산올리고당-금나노입자의 특성 및  
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1에 의해  
생성된 바이오필름 억제

지도교수 김 영 목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2020년 2월

부경대학교 대학원

식품공학과

이 장 원

이장원의 공학석사 학위논문을 인준함.

2020년 2월



위원장 공학박사 전병수



위원 농학박사 양지영



위원 약학박사 김영목



# 목 차

목 차.....	
Abstract.....	
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
1. 실험재료.....	4
2. 실험방법.....	5
2.1 COS-AuNPs 합성 및 특성 확인.....	5
2.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) assay.....	6
2.3 생육저해 효과 확인.....	7
2.4 바이오필름 생성 저해 정량.....	7
2.5 Scanning Electronic Microscopy (SEM) and Fluorescence Microscopy assay.....	9
2.6 생성된 바이오필름에 대한 제거 정량.....	11

2.7 용혈 활성 및 독성 인자 저해 확인.....	12
2.8 운동성 분석 시험.....	15
2.9 통계 분석.....	16
III. 결과 및 고찰.....	17
1. 합성된 COS-AuNPs의 특성 분석 결과.....	17
2. COS-AuNPs의 MIC, MBC 및 생육 저해 결과.....	23
3. 바이오필름 저해 효과 및 시각적 분석 결과.....	27
4. <i>P. aeruginosa</i> 에 의해 생성된 바이오필름 제거 결과.....	33
5. COS-AuNPs의 항용혈능 및 항독성 시험 결과.....	37
6. COS-AuNPs에 의한 운동성 조절.....	40
IV. 요약.....	43
V. Acknowledgement & Declaration.....	45
참고문헌.....	46

Characterization of Gold-oligochitosan nanoparticles  
and Antibiofilm Effect against Biofilm-forming  
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Jang-won Lee

Department of Food Science and Technology, Graduate School,  
Pukyong National University



Abstract

Being opportunistic pathogen and development of multiple antimicrobial resistance properties, there is an alternative demand for the combating *Pseudomonas aeruginosa* infection. Chitosan is one of alternative biologically derived product that has been proven to be exhibits diverse biological activities. However, the low water-solubility of chitosan limits its biological activity and the chemical modification, resulting in the study on shortening the polymer size as alternate possibilities to maintain its activity. Furthermore, nanotechnology is one of the emergence approaches

for the enhanced biological activity of any potential drug for treating the pathogenic infection. Several reports showed that gold nanoparticle will be as a potential candidate for the treating bacterial infection. In the present study it synthesized a potential chitooligosaccharides-gold nanoparticle by taking chitooligosaccharides and chloroauric acid materials. The synthesized chitooligosaccharides-gold nanoparticle has been characterized by UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, field emission electron microscopy and dynamic light scattering. It was observed the treatment of chitooligosaccharides-gold nanoparticle to *P. aeruginosa* resulting in a concentration dependent biofilm inhibition and dispersion of virulence factors. Furthermore, it showed the suppression of swimming and twitching motility by the treatment of nanoparticle, whereas it enhanced the swarming motility. Findings from this study provide important insights to the potentials of chitooligosaccharides-gold nanoparticles as a new effective drug for prevention and treatment of *P. aeruginosa* biofilm-related infections.

# I. 서론

환경 중에 부유하던 미생물은 특정 표면에 부착하여 증식된 이후 AI (autoinducer)를 통한 정족수 감지(quorum sensing, QS)과정을 거쳐 세포 외 고분자물질인 extracellular polymeric substance (EPS)를 생성하게 된다. EPS를 통해 생성된 3차원적인 구조물을 바이오필름(biofilm)이라고 하며 미생물이 환경에서 집락을 형성할 때, 바이오필름의 형성으로 인해 광범위한 만성 감염이 발생하게 된다(Vipin et al., 2019; Lee and Yoon, 2017; Awad et al., 2018). 바이오필름이 형성되고 난 이후에는 다양한 방식을 통해 외부의 물리적이거나 화학적인 자극들에 대한 저항성이 높아지게 된다. 바이오필름을 구성하는 EPS는 단백질 및 세포 외 DNA (extracellular-DNA, e-DNA)와 같은 고분자 물질로 구성된 매트릭스로써(Kim and Lee, 2016; Flemming and Wingender, 2010; Flemming et al., 2007), 항균 작용을 하는 물질이 바이오필름 내부에 유입되어 세포에 작용하는 것을 차단함으로써 저항성을 증가시킨다(Harmsen et al., 2010; Skariyachan et al., 2018). 또한, 정전기적인 상호작용, 다양한 분해 효소, 바이오필름 내 세포층에 걸친 대사 저하 및 고유 돌연변이의 생성을 통해서 저항성이 높아지기도 한다(Hoiby et al., 2010; Hall and Mah, 2017; Stewart and Costerton,

2001). 바이오필름을 가장 많이 생성하는 미생물 중 하나로 알려진 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 감염은 지난 수 십 년 간 전세계의 식품 안전 및 건강에 대한 심각한 문제를 일으켰다(Rojas et al., 2019; Lund-Palau et al., 2016; Savoia, 2014, Schroth et al., 2018). *P. aeruginosa*는 바이오필름의 형성과 함께 다양한 독성 인자의 생성을 통해 병원성을 가지는 것으로 알려져 있다(Harmsen et al., 2010; Pang et al., 2019; Chatterjee et al., 2016). *P. aeruginosa*로부터 유래된 독성 인자를 저해하는 것은 감염에 효과적인 치료법으로 알려져 있으며 다양한 방식의 접근 방법이 연구되고 있다(Pang et al., 2019; Chatterjee et al., 2016; Khan et al., 2019a; Khan et al., 2019b).

그 중 하나인 키토산은 새우와 게의 껍데기로부터 유래된 키틴에서 추출한 다당류로써 포도당과 N-아세틸화 포도당으로 구성되어 있으며(Jung and Rark, 2014) 암을 비롯한 다양한 질병의 치료를 목적으로 이용되는 등 생의학 분야에서 키토산의 잠재력을 활용한 여러 연구가 진행되고 있다(Lodhi et al., 2014; Liaqat and Eltem, 2018; Park and Kim, 2010). 그러나 키토산은 중성 pH 및 높은 점도의 조건에서 제한된 수용성을 가지는 특성으로 인해 실질적으로 활용하기에 어려움을 겪고 있다(Lodhi et al., 2014). 키토산의 한계를 극복하기 위해 분자량을 감소시키거나 화학적 처리를 통한 변형 등 여러 방법들이 이용 되어져 왔다. 키토산올리고당(chitosan-oligosaccharide, COS)은 분자량이 작고 키토산에 비해 수용성이 높은 키토산 유래 물질로써, 병원성 감염을 치료하기 위한 항균제 및 항바이오필름제로 연구되고 있다(Fernandes et

al., 2010; Li et al., 2019; Lu et al., 2014; Quintero-Villegas et al., 2013; Lu et al., 2019).

또한, 최근에는 *P. aeruginosa*의 바이오필름 관련 감염을 치료하기 위한 대안 중 하나로써 경제적이며 생체에 적합하고 무독성을 특징으로 하는 천연 물질을 이용한 나노 제제가 관심을 받고 있다(Khan et al., 2019a; Khan et al., 2019b; Buseti et al., 2014; Papa et al., 2015). 이를 이용하여 항균 물질의 효능을 높이고 항생제의 독성 문제를 최소화하기 위해서 나노 물질을 사용한 하이브리드 제제의 사용이 선호되고 있다(Patil and Kim, 2018; Vinci and Rapa, 2019). 금나노입자(gold nanoparticles, AuNPs)는 미생물 감염의 치료를 위해 연구되고 사용된 물질 중 하나로(Khan et al., 2019b; Rajkumari et al., 2017; Rice et al., 2019; Khan et al., 2018), 높은 안정성, 넓은 표면적 및 낮은 독성으로 인해 생물학적 연구에 이용되고 있다(Li et al., 2014; Farokhzad and Langer, 2009; Zhao and Jiang, 2013). 이전의 연구들에 의하면 AuNPs는 단일로 사용되거나 다른 물질과 합성된 이후 사용되었을 때, 다양한 그람 음성균 및 그람 양성 세균의 바이오필름 형성 억제에 효과적인 것으로 보고되었다(Khan et al., 2019b; Mu et al., 2016; Ramasamy et al., 2017). 이에 본 연구에서는 키토산올리고당-금나노입자(COS-AuNPs)의 합성 및 특성을 확인하고 COS-AuNPs가 *P. aeruginosa*의 바이오필름 제어, 독성 인자 생성 저해 및 운동성에 미치는 영향에 대해 규명하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 연구에는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Daejeon, Korea)로부터 분양 받은 표준 균주인 KCTC 1637 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1을 사용하였다. *P. aeruginosa*의 배양에는 tryptic soy broth (TSB; Difco, Detroit, MI) 와 tryptic soy agar (TSA; Difco)를 사용하였다. 배양 온도는 35℃로 설정하여 일정하게 유지되도록 하였다. >10 kDa의 분자량을 가지는 COS (80% deacetylation 된 키토산 유래)는 Kitto Life Co., Ltd. (Seoul, Korea)로부터, hydrogen tetrachloroaurate (III) (HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 COS-AuNPs 합성 및 특성 확인

COS-AuNPs의 합성은 이전에 연구되었던 방법을 토대로 진행하였다 (Manivasagan et al, 2016). >10 kDa COS 50 mg를 교반 상태 하에 있는 80°C의 10 mL  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $10^{-4}$  M) 수용액에 혼합함으로써 COS-AuNPs를 합성하였다. 합성은 루비 레드 색상의 외관을 통해 일차적으로 확인되었으며 이후 UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter; Fullerton, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 다음으로  $12,000 \times g$ 의 조건 하에서 30분 동안 원심분리기를 통해 가용성 COS-AuNPs를 pellet 상태로 만들었으며 증류수로 여러 차례 세척하였고 12 kDa 이상의 분자량을 제한할 수 있는 투석 튜브를 사용하여 Pellet 이외의 불순물들을 제거하였다. 수득된 COS-AuNPs은 분말 형태가 되도록 동결 건조하였으며 이 분말을 항생 물질 분석 및 특성 분석에 사용하였다. 먼저, 푸리에 변환 적외선 분광기(Spectrum Two; PerkinElmer Inc., Waltham, MA)로  $400 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 의 파장 범위를 스펙트럼 스캐닝에 사용하여 COS-AuNPs에 존재하는 각기 다른 작용기의 존재 유무를 확인하였다. COS-AuNPs의 입자 크기는 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 분광 광도계(ELS-8000; OTSUKA Electronic Co. Ltd., Osaka, Japan)를 사용하였고 형태의

확인에는 전계 방사 투과 전자 현미경(FE-TEM, JEM-2100F; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다. COS-AuNPs의 결정 특성 확인을 위해 X-선 회절 분석기(XRD, X'Pert-MPD system; Philips, Almelo, Netherlands)을 사용하였으며 원소 조성을 분석에는 에너지 분산형 분광분석기(EDX, S-2400; Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

## 2.2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assay

*P. aeruginosa*에 대한 COS-AuNPs의 MIC 및 MBC를 확인하기 위해, *P. aeruginosa*를 35°C에서 밤새 배양 후 TSB를 이용하여 600 nm optical density (OD<sub>600</sub>)의 조건에서 0.05가 되도록 희석한 뒤, 희석된 배양액 250 µL를 96 well microtiter plate (SPL Life Sciences Co. Ltd., Pocheon, Korea)로 옮긴 후 COS-AuNPs의 농도가 16 ~ 8,192 µg/mL가 되도록 첨가하였다. Microtiter plate reader (Synergy HTX Multi-Mode Reader; BioTek, Winooski, VT)를 이용하여 96 well microtiter plate를 35°C에서 24시간 동안 교반 상태(567 cpm) 하에 배양하였다. 배양 후, 600 nm의 파장에서 배양액의 OD를 측정하였고 MIC에 사용하였던 96 well microtiter plate를 사용하여 COS-AuNPs의 MBC 실험을 진행하였다. 모든 well로부터 100 µL 배양액을 TSB로 10<sup>7</sup>배 연속 희석하고 희석액 100 µL를 TSA plate에 분주하여 스프레딩 한 뒤 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양

후, TSA plate에 형성된 집락수를 계수하였다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하였고 평균값을 제시하였다.

## 2.3 생육저해 효과 확인

생육 저해 효과 확인 시험은 MIC 수준 이하인 16 ~ 1,024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 진행되었다. *P. aeruginosa*을 35°C에서 밤새 배양 후 TSB를 이용하여 OD<sub>600</sub>에서 0.05가 되도록 희석하고 COS-AuNPs의 각 농도에 맞게 96 well microtiter plate에 300  $\mu\text{L}$  분주하여 진행하였다. 배양은 microtiter plate reader 내에서 교반 상태(567 cpm)로 35°C, 24시간의 조건으로 진행되었으며 OD<sub>600</sub>에서 2시간 간격으로 배양액을 측정하였다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하였고 평균값을 제시하였다.

## 2.4 바이오필름 생성 저해 정량

Crystal violet 염색 및 생균수 실험의 두 가지 방법을 통하여 sub-MIC에서의 COS-AuNPs의 항바이오필름 효과를 정량화 하였다. 바이오필름의 crystal violet 염색은 이전 연구된 방법을 토대로 약간의 수정을 거쳐 진행되었다(Khan et al., 2019a). 먼저 96 well microtiter plate를 *P.*

*aeruginosa*의 바이오필름 생성 표면으로 이용하였다. 밤새 배양한 *P. aeruginosa* 배양액의 OD<sub>600</sub>를 TSB를 이용하여 0.05가 되도록 희석하고 96 well microtiter plate에 COS-AuNPs의 농도가 16 ~ 512 µg/mL가 되도록 하여 300 µL의 배양액을 분주하였다. 35°C에서 24시간 동안 배양한 뒤, 부유 세균을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음, 20분 간 300 µL의 0.1% crystal violet으로 염색을 진행하였다. 다시 물로 3회 세척하고 300 µL의 95% ethanol에 재현탁 한 뒤 microtiter plate reader를 이용하여 OD<sub>570</sub>에서 측정하였다.

다음으로, 부유 세균 및 바이오필름 내 세포의 생존력에 대한 sub-MIC에서의 COS-AuNPs의 효과를 평가하기 위해 생균수 실험이 진행되었다 (Artini et al., 2018). 밤새 배양한 *P. aeruginosa* 배양액의 OD<sub>600</sub>를 TSB를 이용하여 0.05가 되도록 희석하고 96 well microtiter plate에 COS-AuNPs의 농도가 16 ~ 512 µg/mL가 되도록 하여 300 µL의 배양액을 분주하였다. 35°C에서 24시간 동안 배양한 뒤, 각 well의 배양액을 TSB로 10<sup>7</sup>배 연속 희석하고 희석액 100 µL를 TSA plate에 분주하여 스프레딩하였다. 이후, 부착되어 있는 바이오필름 내부에 존재하는 균을 정량하기 위해서 각 well을 TSB로 2회 세척하였다. 다시 TSB를 분주하고 멸균 팁을 이용하여 바이오필름을 긁어낸 후 TSB를 이용하여 10<sup>7</sup>배 연속 희석하고 희석액 100 µL를 TSA plate에 분주하여 스프레딩 하였다. 35°C에서 24시간 동안 배양하고 TSA plate에 형성된 집락수를 계수하였다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하였고 평균값을 제시하였다.

## 2.5 Scanning electronic microscopy (SEM) and fluorescence microscopy assay

*P. aeruginosa*에 대한 COS-AuNPs의 영향을 시각적으로 확인하기 위해 형광현미경(fluorescence microscopy)과 주사전자현미경(scanning electronic microscopy, SEM)을 이용하였다(Khan et al., 2019a). 두 경우 모두, 밤새 배양한 *P. aeruginosa* 배양액을 TSB를 이용하여 OD<sub>600</sub> 값이 0.05가 되도록 희석한 뒤, 512 µg/mL COS-AuNPs로 처리하여 바이오필름을 형성되도록 하였다. SEM 분석에서는 나일론 막(0.5 × 0.5 cm)을 24 well microtiter plate에 넣은 후, 35°C에서 24시간 동안 배양하고 2% formaldehyde와 2.5% glutaraldehyde를 사용하여 세포를 4°C에서 12시간 동안 고정시켰다. 이 후, 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)를 이용하여 나일론 막을 세척하고 50% 및 100%의 에틸 알코올로 순차적으로 탈수하였다. 탈수 후 세포가 부착된 막을 동결 건조기(FD8518; IIShinBiobase Co. Ltd., DONGDUCHEON, Korea)를 사용하여 동결 건조한 후 이온 스퍼터(E-1010; Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용해서 120초 동안 금으로 코팅하였다. 이후, SEM (JSM-6490LV; JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하여 × 5000 배율 및 15 kV의 전압에서 촬영하였다.

형광 현미경 분석에서는 *P. aeruginosa*을 1 × 1 cm의 유리 표면을 배양액에 넣어 표면에 바이오필름이 생성되도록 하였다(Khan et al., 2019a). 이 후, acridine orange의 농도가 10 µg/mL가 되도록 하여 염색한 뒤, 0.1 M

PBS로 세척하였다. 이후, 형광 현미경(Leica DMI300B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여  $\times 40$  배율에서 촬영하였다.



## 2.6 생성된 바이오필름에 대한 제거 정량

*P. aeruginosa*에 의해 생성된 바이오 필름에 대한 COS-AuNPs의 제거 특성 정량은 crystal violet 염색 및 생균수 실험을 통해 확인 하였다(Khan et al., 2019a). 먼저, crystal violet 염색은 35°C에서 밤새 배양한 *P. aeruginosa*의 배양액 OD600을 0.05가 되도록 TSB로 희석하여 96 well microtiter plate에 300  $\mu$ L를 분주한 뒤, 96시간 동안 35°C에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 TSB 배지를 이용하여 3회 세척하였다. 각 well에 대해 COS-AuNP의 농도가 sub-MIC (16~1,024  $\mu$ g/mL)가 되도록 300  $\mu$ L의 TSB와 함께 분주한 뒤 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 증류수를 이용하여 모든 well을 3회 세척한 후 300  $\mu$ L의 0.1% crystal violet으로 20분 간 염색하였다. crystal violet을 제거하고 다시 증류수로 3회 세척한 후 300  $\mu$ L ethanol로 재현탁 한 뒤, Microtiter plate reader에서 OD<sub>570</sub>에서 측정하였다.

생균수 실험은 35°C에서 밤새 배양한 *P. aeruginosa*의 배양액을 OD<sub>600</sub>에서 0.05가 되도록 TSB로 희석하여 96 well microtiter plate에 분주한 뒤, 96시간 동안 바이오 필름을 생성하고 TSB 배지를 이용하여 3회 세척하였다. 다음으로, 각 well에 COS-AuNP의 농도가 sub-MIC (16 ~ 1,024  $\mu$ g/mL)가 되도록 300  $\mu$ L의 TSB와 함께 분주한 뒤 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 TSB 배지로 2회 세척한 뒤, TSB 배지 300  $\mu$ L을 분주하고 microtiter plate의 표면에 존재하는 바이오필름을 멸

균된 팁을 사용하여 긁어내었다. 이후, TSB 배지로  $10^{-7}$ 배 연속 희석하고, 희석된 현탁액 100  $\mu$ L을 TSA plate에 스프레딩하여 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, TSA plate에 생성된 집락을 계수하여 CFU를 계산하였다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하였고 평균값을 제시하였다.

## 2.7 용혈 활성 및 독성 인자 저해 확인

용혈 활성 및 독성 인자 생성 저해 실험은 이전에 연구된 방법에 따라 수행되었다(Khan et al., 2019a; Lee et al., 2012). 모든 실험에서 *P. aeruginosa*를 밤새 배양하여 배양액의 OD<sub>600</sub> 값이 0.05가 되도록 TSB를 이용하여 희석한 뒤 취하였다. 용혈 활성 실험에서 배양액을 상이한 COS-AuNPs 농도로 처리하고 진탕 배양기에서 250 rpm의 조건으로 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 50  $\mu$ L를 500  $\mu$ L의 적혈구(red blood cell, RBC)와 혼합하고 35°C에서 250 rpm의 교반 조건 하에 60초 동안 배양하였다. 이후, 상등액을 취하여 543 nm에서 측정하였다.

COS-AuNPs의 농도에 따른 *P. aeruginosa*의 pyocyanin 생성 저해 효과는 이전의 연구에 따라 진행되었다(Essar et al., 1990). 각각의 COS-AuNPs 농도와 함께 TSB에서 *P. aeruginosa*를 250 rpm의 교반 조건 하에 12시간 동안 35°C에서 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 상등액 5mL와 chloroform 3 mL을 첨가하여 pyocyanin을 추출하고

상등액을 제거한 후, pyocyanin을 0.2 N HCl로 산성화시켰다. 분홍색의 산성추출물에 대해 OD<sub>520</sub>에서 값을 측정하였다.

Rhamnolipid의 정량화는 이전의 연구에서 진행되었던 orcinol을 이용한 비색법에 따라 수행되었다(Wilhelm et al., 2007). 각각의 COS-AuNPs 농도와 함께 300  $\mu$ L의 TSB에서 *P. aeruginosa*를 250 rpm의 교반 조건 하에 12시간 동안 35°C에서 배양한 후, 배양액의 2배 양만큼 diethyl ether를 첨가하고 원심분리하여 상등액을 건조하였다. 증류수 100  $\mu$ L, 1.6% orcinol 100  $\mu$ L 및 60% 황산 800  $\mu$ L를 순서대로 첨가하고 80°C에서 250 rpm의 교반 조건 하에 30분간 가열하였다. 이후, OD<sub>421</sub>에서의 값을 측정하였다.

Pyoverdinin의 정량화는 이전의 연구에 따라 수행되었다(Stintzi et al., 1998). Pyoverdinin의 정량화를 위해 *P. aeruginosa* 배양액을 1:100으로 희석한 후 2% sodium succinate를 추가한 minimal salt 배지(minimal salt medium, MSM)에서 각 농도에 따라 COS-AuNPs를 첨가한 뒤 250 rpm의 교반 조건 하에 12시간 동안 35°C에서 배양하였다. 사용된 MSM 배지의 조성은 다음과 같다: 증류수 1 L 당 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.8 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8 g 및 trace element solution (TES) 1.0 mL. TES의 조성은 증류수 1 L 당 Al(OH)<sub>3</sub> 0.1 g, SnCl<sub>2</sub> 0.05 g, KI 0.05 g, LiCl, 0.05 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.08 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 g, BaCl<sub>2</sub> 0.05 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05 g이었다. 배양 후, microtiter plate reader을 이

용하여 OD<sub>405</sub>에서의 값을 측정하였다. 모든 평가는 3회의 시험을 진행하였고 평균값을 제시하였다.



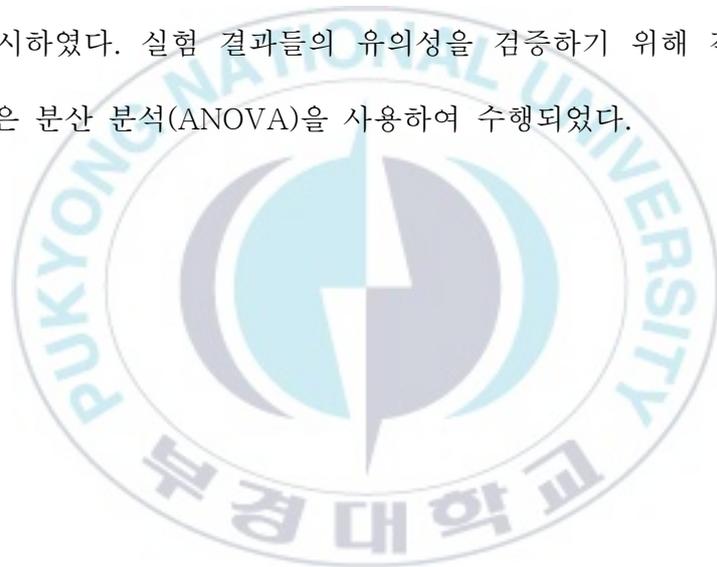
## 2.8 운동성 분석 시험

COS-AuNPs가 *P. aeruginosa*의 swimming, swarming 및 twitching의 3가지 운동성에 미치는 영향을 확인하기 위해 이전에 진행되었던 다른 연구들의 방법을 일부 수정하여 분석하였다(Khan et al., 2019a; Wu et al., 2011). 각각의 운동성 분석은 특정 성분으로부터 제조된 한천 배지를 사용하여 수행하였다. Swarming 실험에 사용된 고체 배지는 luria britani broth (LB; Difco)에 0.5% casamino acids, 0.5% glucose 및 0.4% bacto agar (Difco)을 첨가하여 제조하였다. Swimming 실험에 사용된 고체 배지는 증류수에 0.2% casamino acids, 30 mM glucose 및 0.3% bacto agar을 첨가하여 제조하였다. Twitching 실험에서는 0.2% casamino acids, 1.5% bacto agar 및 30 mM glucose를 증류수에 첨가하여 제조한 배지를 사용하였다. Swimming 배지와 swarming 배지는 121°C에서 15분 간 멸균한 뒤, COS-AuNPs를 상이한 농도로 첨가하여 plate에 부은 후 굳혔다. 이후, 밤새 배양한 *P. aeruginosa*의 배양액 5 µL을 plate 중앙에 분주하였다. Twitching 실험은 멸균한 이쑤시개를 이용하여 plate의 중앙에 *P. aeruginosa*의 배양액을 묻힌 후, 멸균한 twitching 배지를 부어서 굳혔다. 모든 plate는 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. Swimming 플레이트와 swarming 플레이트는 배양 이후 표면에서 확인되는 *P. aeruginosa*의 영역에 해당하는 직경을 측정하였다. Twitching의 경우, 직경을 측정하기 위해 배지를 조심스럽게 제거하고 0.1% crystal violet으로 20분 간 염색한 뒤,

증류수를 이용하여 세척하고 건조한 후 염색된 직경을 측정하였다.

## 2.9 통계 분석

본 연구의 결과에 제시된 그림들은 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)을 통해 나타내었으며 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 제시하였다. 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위해 각 데이터의 통계 분석은 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 수행되었다.



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 합성된 COS-AuNPs의 특성 분석 결과

*P. aeruginosa*에 의해 생성된 바이오필름으로 인한 감염은 식품뿐만 아니라 건강을 비롯한 다양한 분야에서 심각한 문제가 되었다(Rybtke et al., 2015). 또한, 다양한 메커니즘을 가진 항생제에 대한 *P. aeruginosa*의 내성 증가로 인해 다른 대안들이 필요하게 되었다(Chatterjee et al., 2016). 최근 천연 화합물의 잠재력에 대한 관심이 증가함에 따라, 효과적인 항균 및 항바이오필름 활성을 가진 수많은 화합물이 발견되었다(Mohammadi et al., 2019; Saeidi et al., 2015; sadeghian et al., 2012; Mulat et al., 2019; Khan et al., 2019c). 키토산 및 키토산 유도체는 이러한 천연 화합물 중 하나로써, 다양한 방법에 의해 여러 형태로 합성될 수 있다(Chopra et al., 2006; Arguelles-Monal et al., 2018). COS는 키토산의 수용성을 향상시키기 위해 화학적인 방법이나 효소적인 방법을 통해 합성된 저분자량의 키토산 유도체다(Liang et al., 2018). COS와 AuNPs의 살균력 및 바이오필름 억제 활성은 이전에 연구되었으며(Sahariah and Masson, 2017), 본 연구에서는 COS와 AuNPs를 합성하여 만든 COS-AuNPs를 이용한 항바이오필름 활성을 확인하는 연구를 진행하였다.

우선적으로, 합성된 COS-AuNP의 특성을 확인하는 단계가 수행되었다.

UV-visible spectrophotometer를 이용한 흡광도의 확인과 외관의 색상 들 통한 확인이 먼저 진행되었다. COS-AuNPs의 스펙트럼은 532 nm 파장에서 최대 흡광도 피크를 나타내었으며(Fig. 1A), 외관에서 루비 레드 색상을 확인할 수 있었다. 532 nm에서 최대 흡광 피크를 가지는 스펙트럼의 결과와 외관의 색상은 이전의 연구들에서 보고되었던 COS-AuNPs의 특성과 일치했다.

COS-AuNPs의 상이한 작용기의 존재는 FTIR 분광법에 의해 확인되었다(Fig. 1B). FTIR의 결과, 스펙트럼은 1088  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C-O, 1154 $\text{cm}^{-1}$ 에서 에테르기(-COC-), 1641  $\text{cm}^{-1}$ 에서 카르보닐기(C=O), 1,526  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -NH의 다양한 작용기들의 존재를 확인할 수 있었다.

COS-AuNPs의 크기 및 형태는 DLS 및 FE-TEM을 사용하여 확인되었다. COS-AuNPs의 입자 크기는 평균적으로  $56.01 \pm 3.48$  nm 인 것으로 확인되었으며, 균일하게 분포되어 있었다(Fig. 1C). FE-TEM 분석에서는 COS-AuNPs의 형태가 구형인 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 1D).

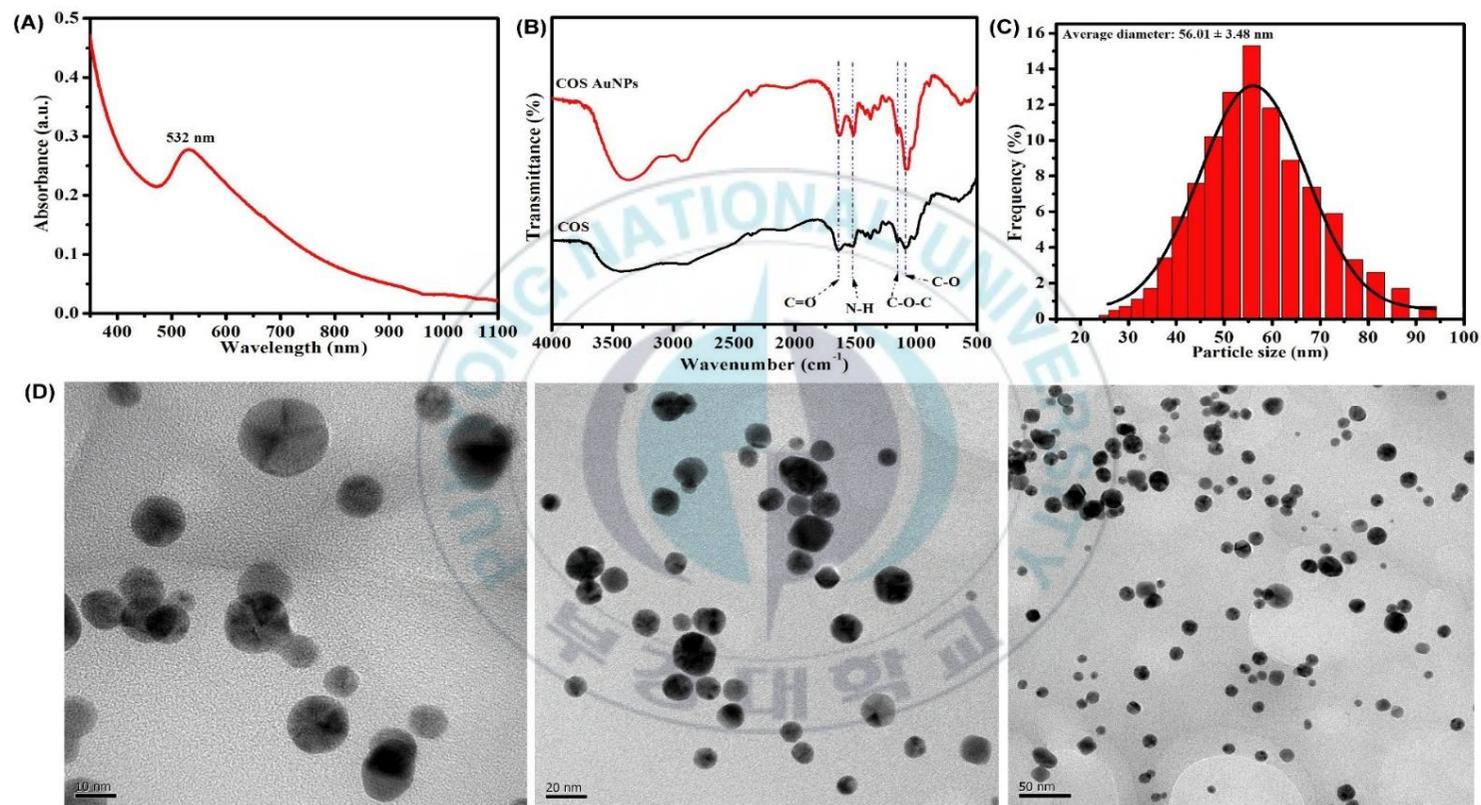


Fig. 1. Structural analysis of chitosan-oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs). (A) UV-visible absorption spectrum, (B) FTIR spectroscopy of COS-AuNPs, (C) DLS histogram, and (D) FE-TEM images.

COS-AuNPs의 나노입자 특성은 XRD 분석에 의해 확인되었다. XRD 결과, 2 theta에서 (111), (200), (220), (311)과 같은 상이한 피크를 확인할 수 있었고, 각각의 피크는 38.23 °, 44.58 °, 64.89 ° 및 77.81의 값으로 관찰되었다(Fig. 2A). 따라서, COS-AuNPs는 입방정계(cubic crystalline)의 외관을 가지고 있었으며 이 결과는 이전 연구에서 보고된 것과 일치하였다(Manivasagan et al., 2015).

COS-AuNPs의 특성은 Fig. 2B에서 확인할 수 있는 바와 같이 EDX 스펙트럼을 분석함으로써 확인되었다. COS-AuNPs에서 Au의 존재는 스펙트럼의 다양한 피크에서 반영되었으며, 2.2 keV에서 가장 높은 피크가 관찰되었다. 또한, 다른 피크들로부터 COS-AuNPs에 탄소(C; 0.3 keV), 산소(O; 0.5 keV) 및 구리(Cu; 8.2 keV)가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 이전 연구에서 이용된 조류 화합물인 fucoidan으로 덮인 AuNPs에서의 결과와 일치하였다(Khan et al., 2019b).

나노입자의 안정성은 항균제로서의 적용을 직접적으로 결정하므로, 합성된 COS-AuNPs는 6개월 동안 냉장고에서 4°C의 온도 하에 저장한 뒤, 새로 제조한 COS-AuNPs와 비교하여 안정성에 대한 평가를 진행하였다(Singh et al., 2018). Fig. 2C에서 확인되는 바와 같이, 새로 제조한 COS-AuNPs와 6개월 동안 보관된 COS-AuNPs는 유사하게 532nm에서 최대 흡광 스펙트럼을 나타냈다. 사전의 연구들에 의하면 이러한 결과는 COS를 이용한 capping을 통해 얻어지는 안정성으로 6개월간의 저장 기간 동안 COS-AuNPs의 안정성을 확인할 수 있는 결과이다(Franconetti et al.,

2019; Mu et al., 2016).



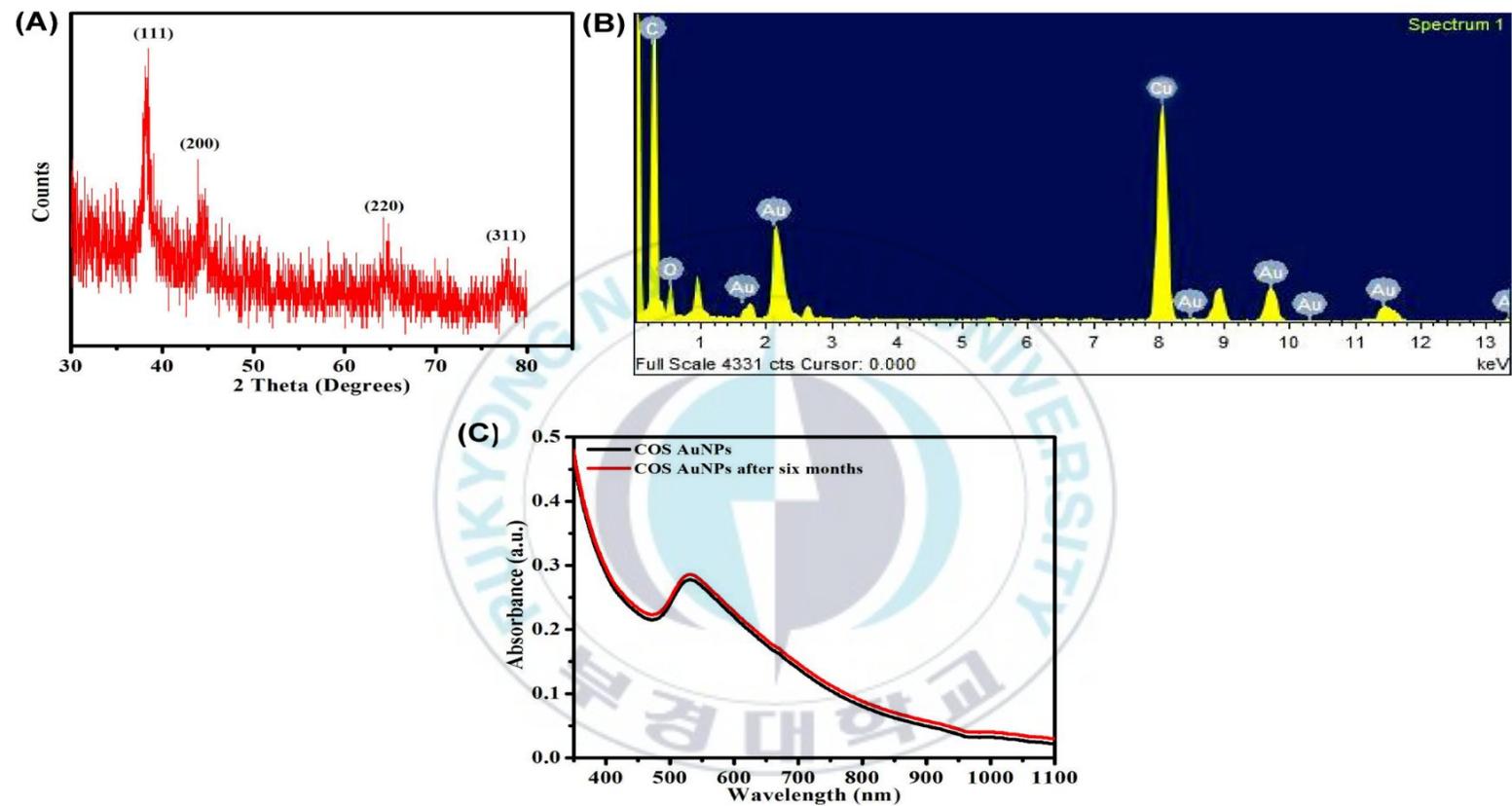


Fig. 2. Characterization of chitosanligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs). (A) XRD spectrum, (B) EDX spectrum and (C) Stability analysis of six-month old COS-AuNPs by UV-visible spectrophotometer.

## 2. COS-AuNPs의 MIC, MBC 및 생육 저해 결과

*P. aeruginosa* 성장에 대한 COS-AuNPs의 MIC 및 MBC의 측정은 바이오필름의 형성 및 독성 인자 생성에 대한 억제 활성의 연구에 앞서 필수적으로 수행하여야 하는 실험이다. 이 단계에서 *P. aeruginosa*가 바이오필름을 형성할 수 있는 적합한 COS-AuNPs 농도 범위를 확인하여 이 후 실험에 사용될 농도를 결정할 수 있다. *P. aeruginosa*에 대한 COS-AuNPs의 MIC 및 MBC 값은 각각 4,096  $\mu\text{g/mL}$ , 8,192  $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이 결과는 Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 생균수 실험에서도 같은 결과를 보였다. COS-AuNPs의 sub-MIC를 결정하기 위해, *P. aeruginosa*의 생육곡선에 대한 실험을 교반 조건 하에서 MIC이하의 농도인 16~1,024  $\mu\text{g/mL}$ 에서 진행하였다. Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 *P. aeruginosa*의 성장은 COS-AuNPs 농도에 따라 변화였고 정지기는 약 12시간에서 16시간 내에 도달하는 것으로 확인되었다. 1,024  $\mu\text{g/mL}$  및 512  $\mu\text{g/mL}$ 의 COS-AuNPs 농도에서 *P. aeruginosa* 성장은 대조군과 비교하여 24시간 배양 후 약간 감소하였다. 결과를 바탕으로 *P. aeruginosa*에서 바이오필름 억제 및 독성 인자 저해 실험을 위한 sub-MIC를 16~512  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 결정하였다.

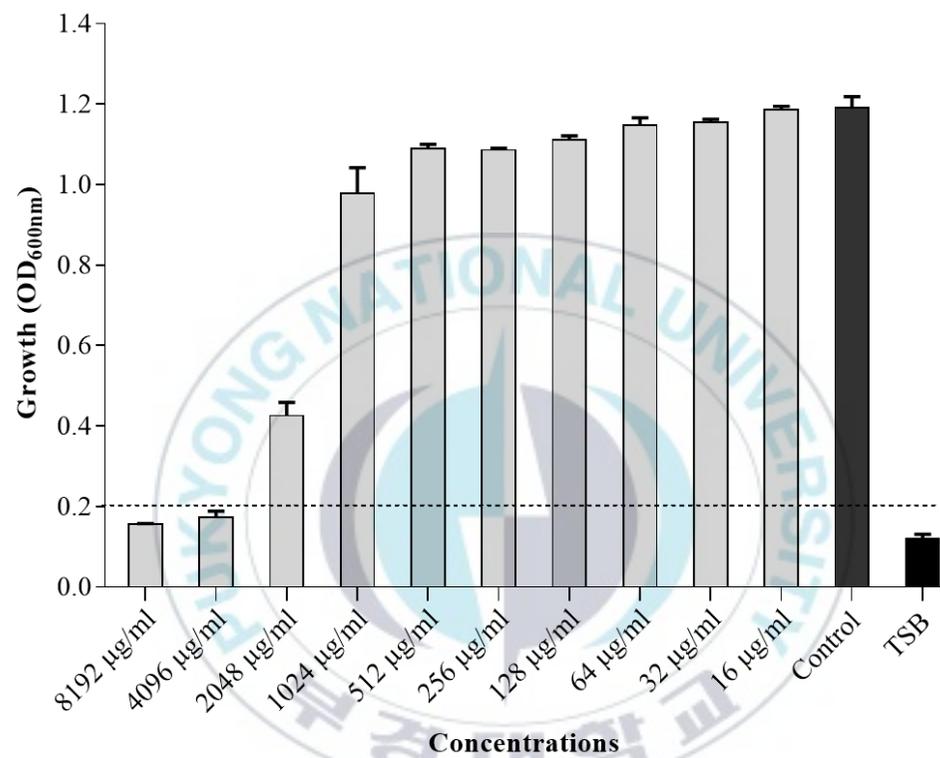


Fig. 3. Minimum inhibitory concentration of chitosan oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) against *Pseudomonas aeruginosa*.

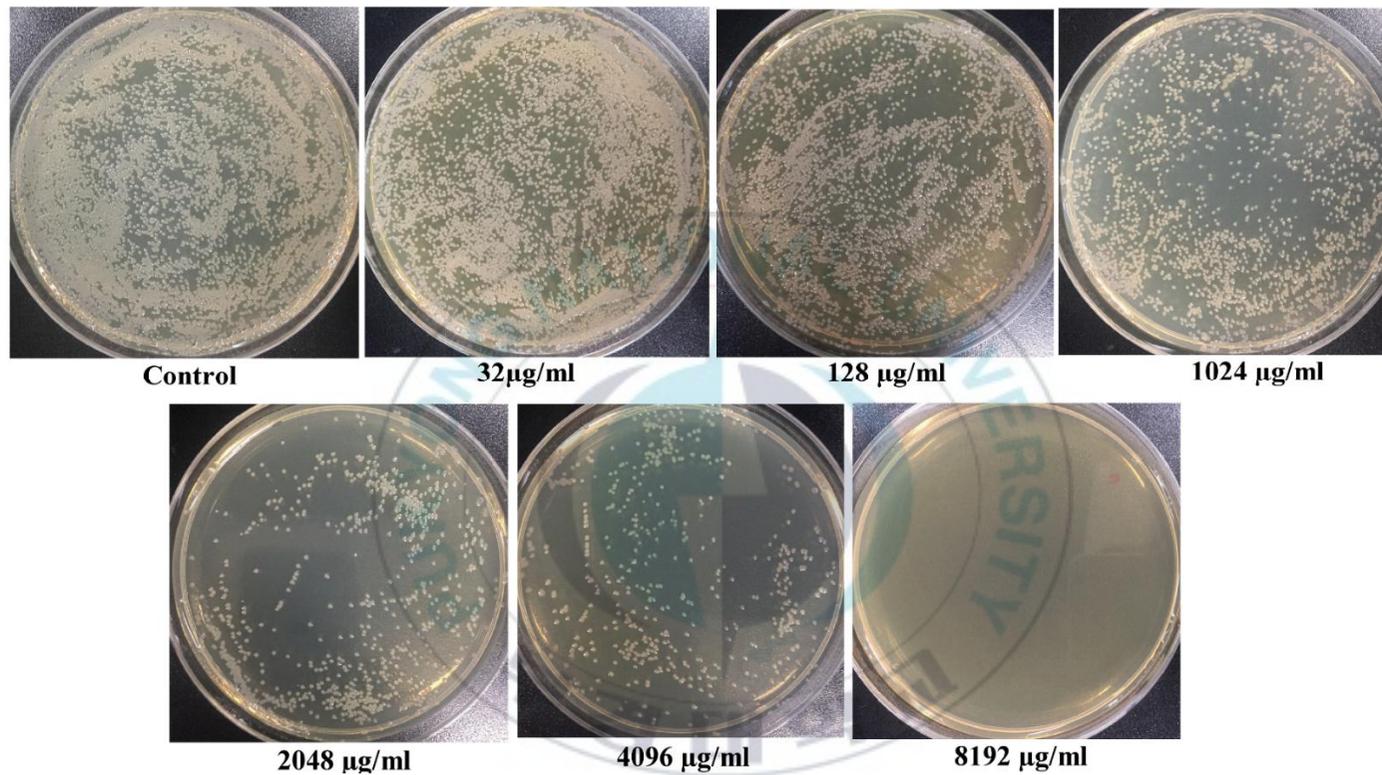


Fig. 4. Representative colony images of *Pseudomonas aeruginosa* treated with different concentrations of chitosan-oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs).

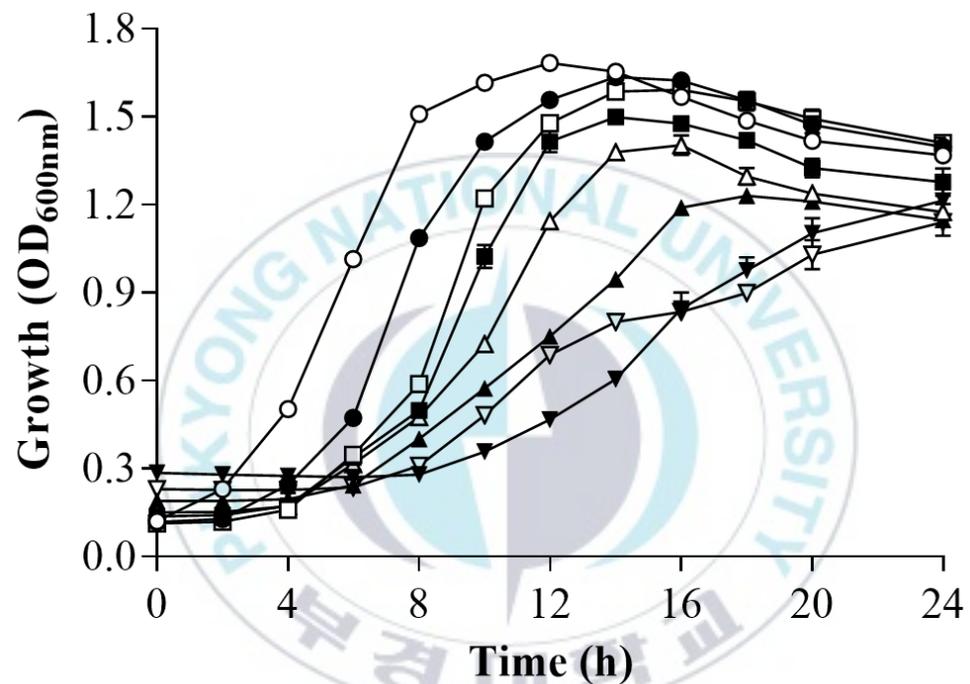


Fig. 5. Effect of chitosan oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on the growth properties of *Pseudomonas aeruginosa*. ○: control, ●: COS-AuNPs (16 µg/mL), □: COS-AuNPs (32 µg/mL), ■: COS-AuNPs (64 µg/mL), △: COS-AuNPs (128 µg/mL), ▲: COS-AuNPs (256 µg/mL), ▽: COS-AuNPs (512 µg/mL), ▼: COS-AuNPs (1,024 µg/mL)

### 3. 바이오필름 저해 효과 및 시각적 분석 결과

Fig. 6A에서 확인할 수 있듯이, COS-AuNPs에 의한 *P. aeruginosa*의 바이오필름 생성 저해는 실험을 진행하였던 sub-MIC (16~512  $\mu\text{g/mL}$ ) 범위에서 농도의존적인 경향을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 실험에 이용된 COS-AuNPs 농도에서는 *P. aeruginosa*의 생육에 대한 저해 효과는 관찰되지 않았다(Fig. 6B). 이전 연구들에서 COS와 AuNPs에 대한 바이오필름 억제 활성은 보고되었으며 특히, 키토산 및 키토산 유도체의 항바이오필름 특성은 아미노기의 존재에 의해 나타나는 양이온 전하와 exopolysaccharide, e-DNA 및 균체의 세포막으로 인한 바이오필름 외부의 음이온 전하가 정전기적인 상호작용을 통해 나타나는 것으로 보고되었다(Costa et al., 2017; Liu et al., 2004; Shi et al., 2016; Zhang et al., 2013). AuNPs의 항바이오필름 특성은 정전기적 상호작용 및 세포의 면역 반응에 의해 나타나며(Yu et al., 2016), 이전의 연구들에 의하면 AuNPs만을 이용하거나 항생제(Mu et al., 2016), 천연추출물(Khan et al., 2019b; Ramasamy et al., 2017; Rajkumari et al., 2017) 및 기타 작은 분자량을 가진 물질(Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2013)과의 혼합 시에 나타나는 것으로 보고되어져 왔다. COS와 AuNPs의 항바이오필름 특성은 이들이 합성한 이후에도 유지될 것으로 사료된다. *P. aeruginosa*의 부유 세균 및 바이오필름 형성 세포의 생존력을 평가하기 위한 생균수 실험 결과 또한 앞서 진행한 crystal violet 염색 실험의 결과와 동일하였다. sub-MIC에서

COS-AuNPs는 농도 의존적으로 바이오필름 내 *P. aeruginosa*를 유의적으로 억제하였다. 특히, 대조군과 비교하여 약 2.7 ~ 2.8 log CFU의 감소와 함께 256 및 512  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 현저하게 억제되었다(Fig. 7A). 반면, sub-MIC에서 COS-AuNPs를 첨가하였을 경우 대조군과 비교하여 부유 세균에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 7B). Crystal violet 염색 실험 결과와 생균수 실험 결과를 종합하였을 때, sub-MIC 이하에서 COS-AuNPs는 96 well microtiter plate의 표면에서 부착 세균에 대해 억제 활성을 나타냈다.



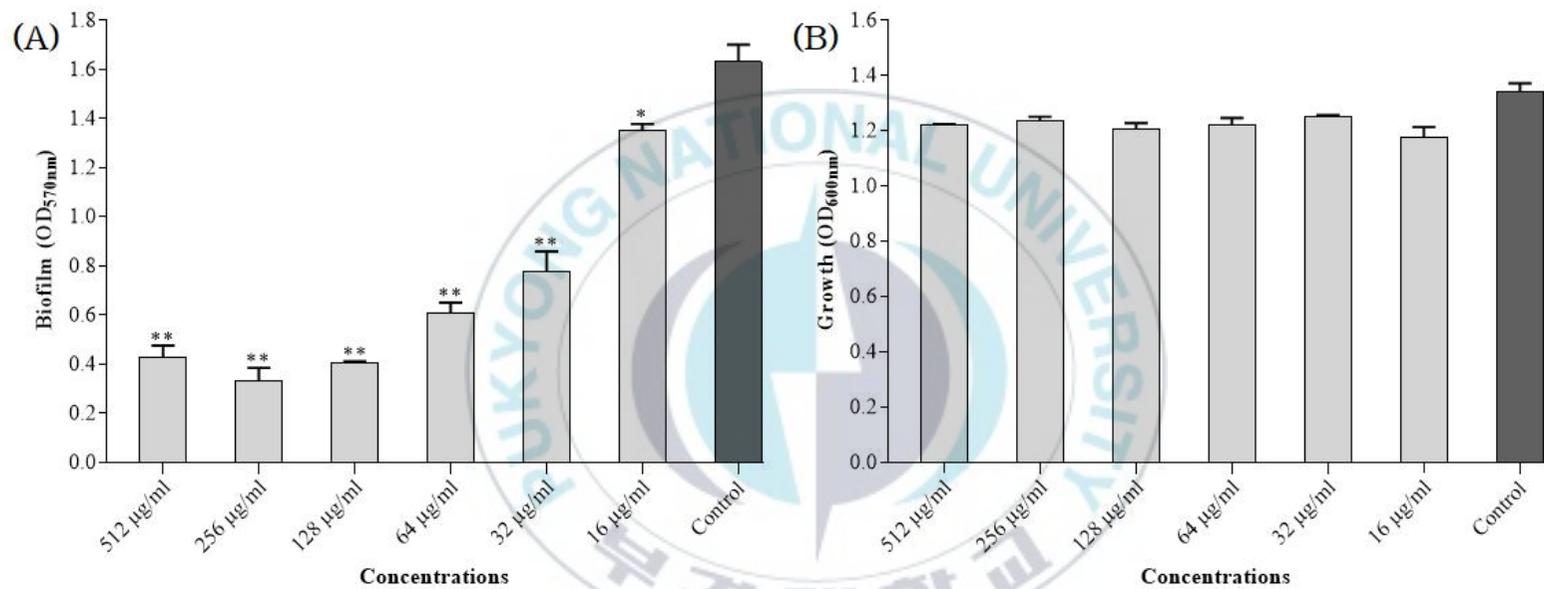


Fig. 6. Inhibitory effect of sub-minimum inhibitory concentrations of chitosan-oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. (A) biofilm assay (B) cell growth. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 indicated statistical significance while ns indicated no statistical significance as compared to the control.

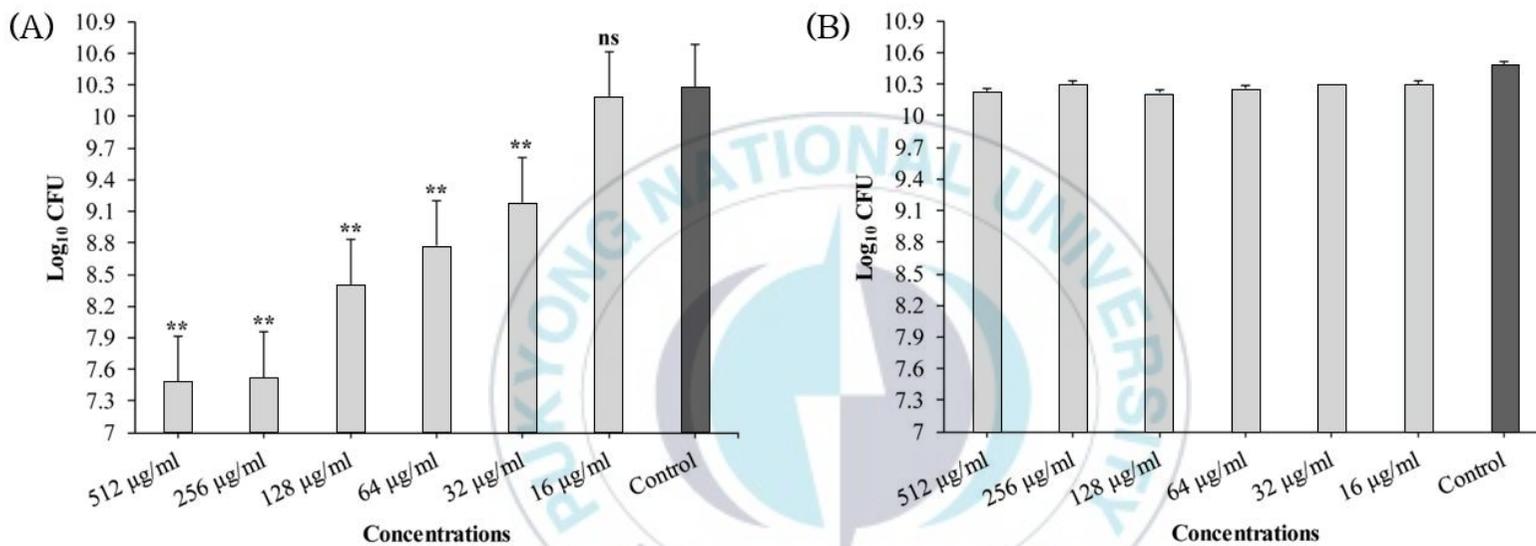


Fig. 7. Inhibitory effect of sub-minimum inhibitory concentrations of chitosan oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on *P. aeruginosa* biofilm formation performed by cell viability assay. (A) CFU of biofilm cells (B) CFU of planktonic cells. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 indicated statistical significance while ns indicated no statistical significance as compared to the control.

COS-AuNPs의 바이오필름 생성 억제 활성은 SEM과 형광 현미경을 이용하여 시각적으로도 의해 확인하였다. COS-AuNPs를 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 나일론 막의 표면에 *P. aeruginosa*의 부착이 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8A). 처리되지 않은 대조군의 경우, 나일론 막의 표면에 치밀한 바이오필름의 형성을 보였다. 또한, 형광 현미경 분석은 SEM 결과와 유사한 결과를 나타내었다. COS-AuNPs로 처리한 경우, 대조군과 비교하여 현저히 적은 녹색 형광을 확인할 수 있었다(Fig. 8B and C).



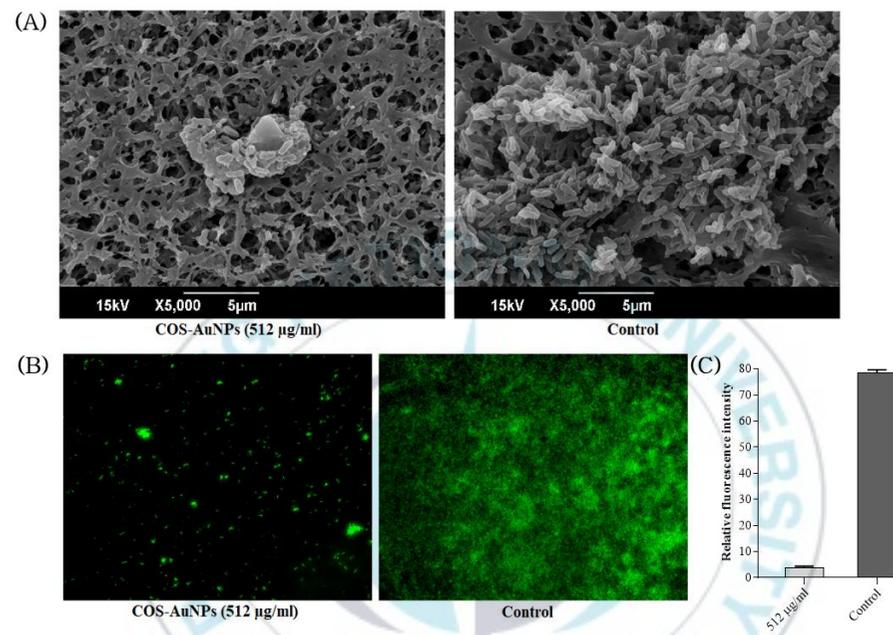


Fig. 8. Morphological analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by the treatment of 512 µg/mL chitosanligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs). (A) SEM (Scanning electronic microscopy) images of biofilm cells, (B) fluorescence microscopy images of biofilm cells, (C) Relative fluorescence intensity of the COS-AuNPs treated biofilm cells.

#### 4. *P. aeruginosa*에 의해 생성된 바이오필름 제거 결과

*P. aeruginosa*에 의해 형성되어 있는 바이오필름을 제거하는 것은 바이오필름 형성을 억제하는 것과 함께 중요한 바이오필름 제어 방법이다. *P. aeruginosa*는 일반적으로 요도 카테터 및 인공 호흡기와 같은 여러 의료 기기의 표면에 형성되어 장기 생존하며 다양한 환경 조건에 대한 내성을 가지기 위해 바이오필름을 형성하고 이후 환자에게 감염되어 폐렴 및 요로 감염 등의 질환을 유발한다(Zhang et al., 2014; Horii et al., 2003). 따라서 형성된 *P. aeruginosa*의 바이오필름을 제거하는데 있어서 COS-AuNPs의 MIC 이하 농도에서의 효과 확인이 필요하다(Kim and Lee, 2016; Skariyachan et al., 2018).

본 실험에서는 crystal violet 염색 및 생균수 실험을 통해 *P. aeruginosa*에 의해 형성된 바이오필름에 대한 COS-AuNPs의 효과를 정량적으로 확인하였다(Fig. 9, 10). COS-AuNPs의 sub-MIC에서의 결과와 대조군을 비교하였을 때, *P. aeruginosa*에 의해 형성된 바이오필름을 상당량 제거할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로, 생균수 결과를 에서 또한, 96 시간 동안 형성된 바이오필름 내 균체에 대해서 COS-AuNPs의 sub-MIC에 의해 상당량 제거되는 결과를 확인할 수 있었다. COS 및 AuNPs의 병원성 세균에 대한 바이오필름 제거 특성은 이전 연구들에 의해 보고된 바 있다(Khan et al., 2019b; Li et al., 2019; He et al., 2014). COS-AuNPs와 COS, AuNPs 각각이 형성된 바이오필름 제거에 미치는 영향에 대한 상세

한 메커니즘은 아직 연구되지 않았으나 AuNPs에 대해 현재 주장되고 있는 바이오필름 제거 메커니즘은 AuNPs의 표면 전하로 인한 영향이다(Giri et al., 2015). COS의 양이온 특성과 함께, 이들의 특성은 합성 후에도 바이오필름 제거 효과에 기여한 것으로 판단된다. 상기 실험들의 결과를 통해 합성된 COS-AuNPs는 *P. aeruginosa*에 의해 형성된 바이오필름에 대한 제거능 및 형성된 바이오필름 내 부착 세균에 대한 저해를 가지는 것으로 판단할 수 있다.



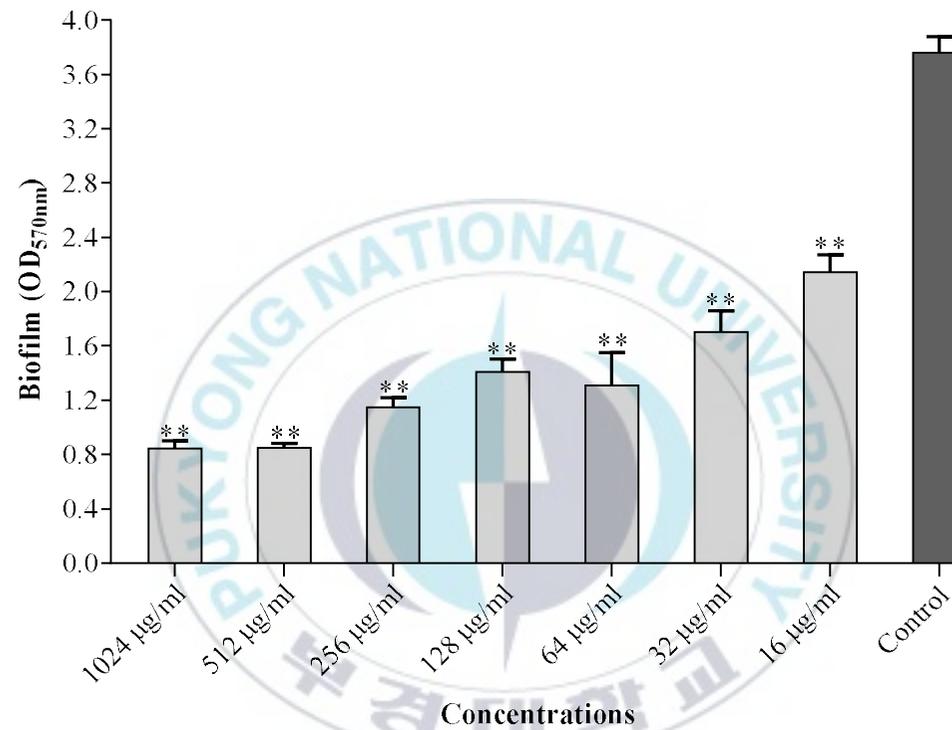


Fig. 9. Eradication effect of different concentrations of chitosan oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on preformed mature biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* as determined by crystal violet staining assay. \*\*p < 0.01 indicated statistical significance as compared to the control.

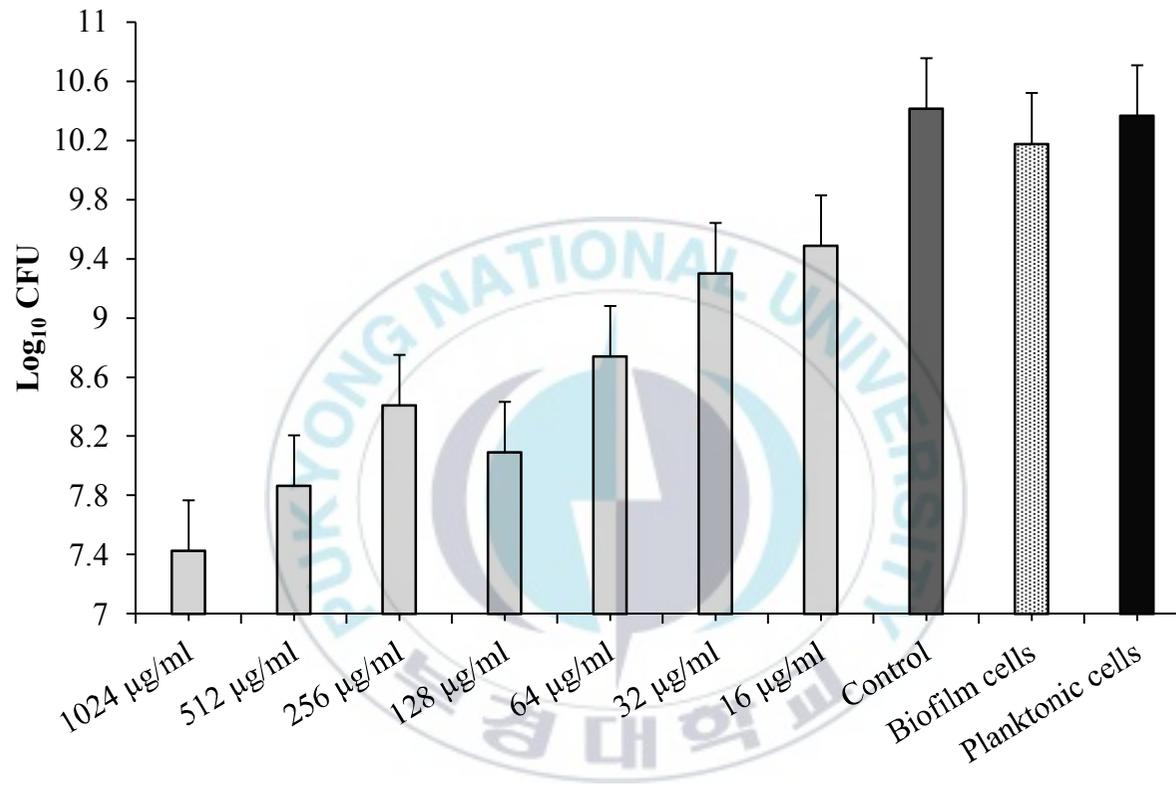


Fig. 10. Eradication effect of different concentrations of chitosan-oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on preformed mature biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* as determined by cell-viability assays. \*\*p < 0.01 indicated statistical significance as compared to the control.

## 5. COS-AuNPs의 항용혈능 및 항독성 시험 결과

*P. aeruginosa*은 동물이나 인간의 체내에서 적혈구를 파괴하는 용혈 활성을 가진다. 따라서, *P. aeruginosa*에 대한 COS-AuNPs의 용혈 활성 저해를 확인하기 위해 sub-MIC (32-512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 실험을 진행하였다. 그 결과, *P. aeruginosa*의 용혈 활성을 농도의존적으로 억제하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 11A). *P. aeruginosa*의 용혈 활성의 저해는 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 COS-AuNPs 농도에서 약 59%로 나타났다. 이러한 결과는 Fucoidan과 금나노입자(F-AuNPs)를 합성하여 이용한 이전의 실험에서도 sub-MIC 수준인 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 동일한 비율의 용혈 활성 감소와 농도 의존적으로 감소하는 경향에 대해 보고되었다(Khan et al., 2019b).

*P. aeruginosa*가 가지는 병독성을 억제하는 방법은 세균 병원성에 대한 대안적 접근법 중 하나이다(Lee et al., 2012; Morkunas et al., 2016; Naik et al., 2013). 균체가 아닌 독성 인자를 타겟으로 항생제를 처리하여 해당 인자가 발현하지 못하도록 하는 이 방법은 균체를 처리하는 것보다 상대적으로 낮은 농도에서 가능하기 때문에 돌연변이로 인한 항생제 내성 균주의 발생 가능성이 낮으며 수많은 기존 항생제 또한 적용이 가능하여 제안되었다(Totsika, 2017). 현재까지 제시된 병독성 억제 방법에는 표면에 대한 세균의 부착 방지, 독소 생성 억제, 3형 분비 시스템 제어 및 QS 제어가 있다(Hassett et al., 1992). *P. aeruginosa*는 pyocyanin, rhamnolipid, pyoverdine 및 protease와 같은 여러 가지 독성 인자를 생성하여 숙주의

감염을 유도하는 과정을 통해 균체가 지속적으로 생존할 수 있도록 한다 (Morkunas et al., 2016; Hassett et al., 1992; Zulianello et al., 2006; Michel et al., 2005; Fernandez et al., 2012).

먼저, pyocyanin의 생성은 COS-AuNPs에 의해 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 11B). 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 COS-AuNPs에 의해 *P. aeruginosa*의 pyocyanin 생성은 64.6 %까지 감소하는 것으로 확인되었다. 또한, 동일한 농도의 COS-AuNPs는 rhamnolipid의 생성을 54%까지 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 11C). 그러나, pyoverdine의 경우, 생성이 향상되는 것으로 확인되었다(Fig. 11D). 종합적으로, 본 실험은 COS-AuNPs가 *P. aeruginosa*의 중요한 독성 인자의 생성을 억제하여 잠재적인 항병독성 제제로 이용될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

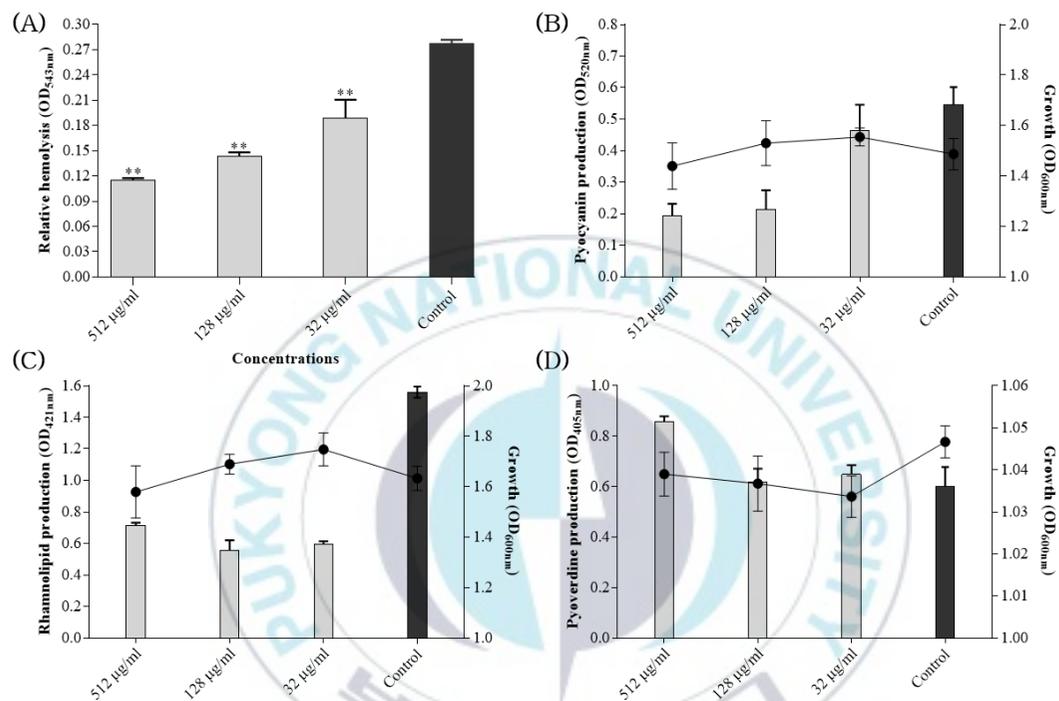


Fig. 11. Attenuation of virulence different properties of *Pseudomonas aeruginosa* by sub-minimum inhibitory concentrations of chitosan-oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs). (A) Antihemolytic activity of COS-AuNPs, (B) Reduction of pyocyanin production, (C) Reduction of rhamnolipid production and (D) Effect on pyoverdine production. \*\*p < 0.01 indicated statistical significance as compared to the control.

## 6. COS-AuNPs에 의한 운동성 조절

*P. aeruginosa*의 운동성 유형들은 바이오필름을 형성하기 위한 유기물 또는 무기물의 표면을 탐색하고 부착하는 역할을 하여 바이오필름의 형성 시 중요한 요소로 판단된다. 균체의 운동성은 편모 매개 운동(*swimming*, *swarming*)과 유형IV 선모 매개 운동(*twitching*)의 두 가지 유형이 있다 (Chang, 2017; Kilmury and Burrows, 2018; Baker et al., 2019). 편모 매개 운동은 화학 감지에 관여하며 유형IV 선모 매개 운동은 물리적 감지에 관여하고 유기물 또는 무기물의 표면에 부착되도록 한다(Chang, 2017; Persat et al., 2015). 특정 표면에 도달하여 부착된 후, 균체는 EPS를 생성하기 시작하고 다양한 생리학적 상태를 갖는 세포들을 둘러싸는 바이오필름 구조를 만든다(Flemming and Wingender, 2010; Chang, 2017; O'Toole and Kolter, 1998). 따라서, 이러한 운동성 유형을 약화시키는 것은 *P. aeruginosa*의 바이오필름 형성에 의해 야기되는 감염을 억제하기 위한 접근법으로 생각 할 수 있다. 본 실험에서, COS-AuNPs가 *swarming*, *swimming* 및 *twitching*의 3가지 운동에 미치는 영향을 조사했다. *Swimming*과 *twitching* 운동은 농도에 비례하여 억제되는 것으로 나타났으나(Fig. 12C, D, E, F), *swarming*은 높은 농도의 COS-AuNPs에서 강화되는 것으로 확인되었다(Fig. 12A, B). *swimming*은 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 69%까지 저해되는 것으로 나타났으며 *twitching*의 억제는 동일한 농도에서 약 38% 저해되었다. 제제들을 처리하였을 때, *P. aeruginosa*의 운동성

이 증가하는 경우는 이전 연구에서도 찾을 수 있다(Lee et al., 2012). 또한, 편모의 기능에 의존적이며 화학주화성을 가지는 swimming과는 다르게, swarming은 철 성분의 제한 또는 rhamnolipid와 cis(3'-5')-cyclic-diguanylate-monophosphate (c-di-GMP)의 생성 및 유형IV 선모 등 추가적인 조건들을 필요로 한다(Baker et al., 2019; Kohler et al., 2000; Lin et al., 2016; Strehmel et al., 2015; Caiazza et al., 2005).



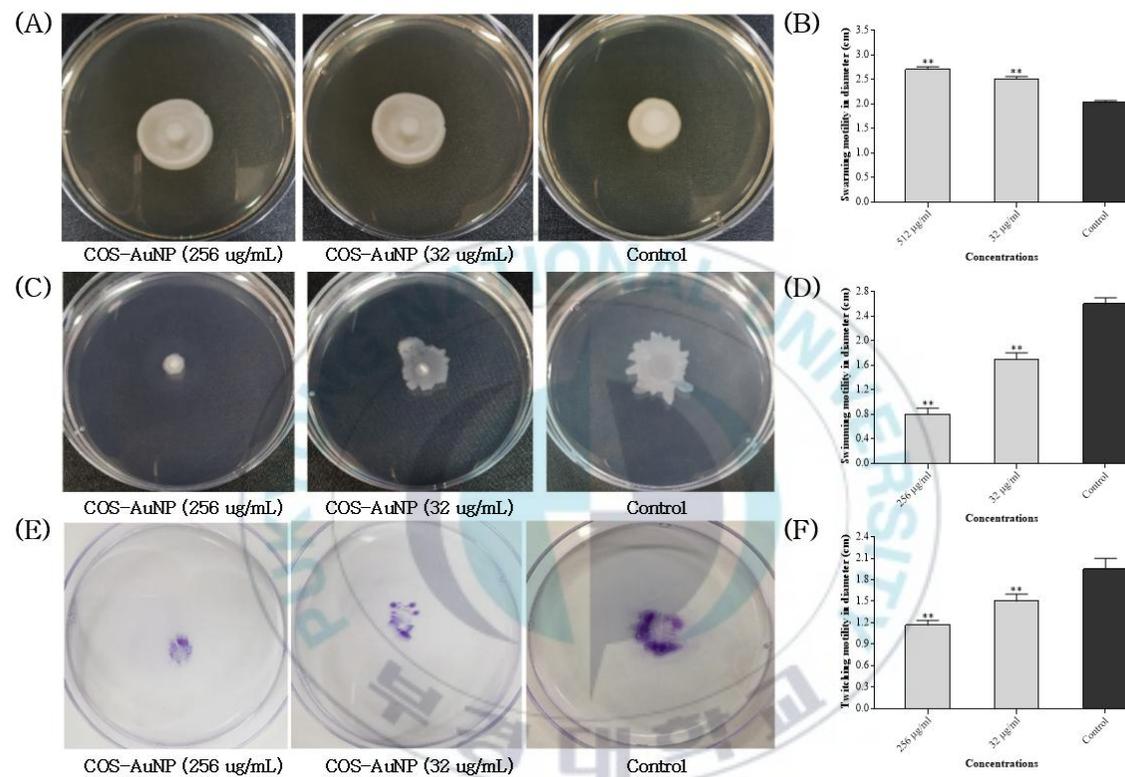


Fig. 12. Antimotility properties of chitosan oligosaccharide-gold nanoparticles (COS-AuNPs) on *Pseudomonas aeruginosa* such as attenuation of swarming (A and B), swimming (C and D) and twitching (E and F). \*\* $p < 0.01$  indicated statistical significance as compared to the control.

## IV. 요약

*P. aeruginosa*는 대표적인 바이오필름 생성 균주로써 다양한 환경에 존재하며 인간의 건강에 심각한 문제를 야기한다. *P. aeruginosa*는 특정 표면에 부착한 뒤, 바이오필름을 생성하고 독성 인자의 합성을 통해 만성적인 감염을 일으키는 것으로 알려져 있으며 바이오필름이 생성되고나면 외부의 자극들에 대해 저항성이 높아지게 된다. 본 연구에서는 *P. aeruginosa* PAO1의 바이오필름 및 독성 인자를 제어하기 위해 키토산으로부터 유래된 키토산올리고당과 높은 안전성 및 넓은 표면적 등을 특징으로 하는 금나노입자(gold nanoparticle)를 이용하여 COS-AuNPs를 합성하였고 항바이오필름 활성 및 독성 인자들에 미치는 효과에 대해 알아보았다. 합성된 COS-AuNPs는 광학적인 분석들을 통해 특성이 확인되었으며, 532 nm에서 최대 흡광도 피크를 가지며 외관상 루비 레드 색상을 가지는 것으로 나타났다. 또한, C-O, C=O, -COC-, -NH 등의 작용기를 가지는 것으로 확인되었으며, 입자의 평균 크기는  $56.01 \pm 3.48$  nm이었고 구형의 형태로 나타났다. 입방정계의 외관을 가지고 있었으며 6개월 간의 안정성을 확인할 수 있었다. *P. aeruginosa*에 대한 MIC 및 MBC는 각각 4,096  $\mu\text{g/mL}$ , 8,192  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 생육저해실험 결과, 생육에 최소한의 영향을 미치는 것으로 판단되는 512  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 최대 sub-MIC로 설정하여 이후 실험을 진행하였다. 바이오필름 생성 전에 sub-MIC의 COS-AuNPs를 첨가하여 배양하였을 때, *P. aeruginosa*의 성장에는 영향을 미치지 않지만 생성

되는 바이오필름은 농도의존적으로 저해되는 결과를 확인할 수 있었으며 이는 생균수 실험에서도 같은 경향을 보이는 것으로 나타났다. 바이오필름 생성 저해는 SEM과 형광현미경을 통해서도 다시 확인할 수 있었으며 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우, 처리하지 않은 대조군에 비해 현저하게 바이오필름 생성이 저해되는 결과를 보였다. 96시간동안 *P. aeruginosa*을 배양하여 바이오필름을 생성한 후 COS-AuNPs를 처리하였을 때, 유의적으로 바이오필름이 제거되었으며 바이오필름 내 부착 세균에 대해서 또한 농도의존적인 경향으로 감소되는 결과를 확인할 수 있었다. 독성 인자에 관한 시험결과에서는 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 COS-AuNPs가 용혈 활성, pyocyanin 및 rhamnolipid에 대해 각각 59%, 64.6% 및 54%까지 감소시키는 것을 확인할 수 있었지만, pyoverdine에 대해서는 생성이 증가하는 결과를 보였다. 운동성 조절 실험 결과에서는 swimming과 twitching을 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 69%, 38%까지 저해하였으며 swarming의 경우에는 향상되는 결과를 나타내었다. 본 물질이 *P. aeruginosa*에 미치는 영향에 관한 메커니즘을 확인하기 위해선 차후 바이오 필름 형성, 독성 인자 생성, 운동성 및 QS에 관여하는 유전자 발현을 연구함으로써 각각의 표현형 돌연변이 균주와 비교하거나 야생 균주에 대해 분자 수준에서 상기 언급된 표현형의 특성을 확인해야한다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 합성된 COS-AuNPs는 *P. aeruginosa* 바이오필름 형성과 관련된 감염을 제어할 수 있는 잠재적 항바이오필름제제로서 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. Acknowledgement & Declaration

본 졸업논문은 과제 수행 중에 얻어진 결과로 ‘Microbial Pathogenesis’ 135권에 출간된 “Synthesis and characterization of chitosan oligosaccharide-capped gold nanoparticles as an effective antibiofilm drug against the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1” 의 일부 내용을 포함하고 있습니다. 본 논문의 작성에 많은 도움을 주신 Fazlurrahman Khan 박사님께 진심으로 감사드립니다.



## 참고문헌

- Arguelles-Monal WM, Lizardi-Mendoza J, Fernandez-Quiroz D, Recillas-Mota MT, Montiel-Herrera M. 2018. Chitosan derivatives: Introducing new functionalities with a controlled molecular architecture for innovative materials. *Polymers (Basel)* 3, E342.
- Artini M, Patsilnakos A, Papa R, Bozovic M, Sabatino M, Garzoli S, Vrenna G, Tilotta M, Pepi F, Ragno R, Selan L. 2018. Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules* 2, E482.
- Awad TS, Asker D, Hatton BD. 2018. Food-safe modification of stainless steel food-processing surfaces to reduce bacterial biofilms. *ACS Appl Mater Interfaces* 10, 22902-22912.
- Baker AE, Webster SS, Diepold A, Kuchma SL, Bordeleau E, Armitage JP, O'Toole GA. 2019. Flagellar stators stimulate c-di-GMP production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 18, e00741-18
- Busetti A, Shaw G, Megaw J, Gorman SP, Maggs CA, Gilmore BF. 2014. Marine-derived quorum-sensing inhibitory activities enhance the antibacterial efficacy of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Mar Drugs* 1, 1-28.
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 21, 7351-61.

- Chang CY. 2017. Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 8, 2671.
- Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. 2016. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 1, 48-58.
- Chopra S, Mahdi S, Kaur J, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ. 2006. Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 8, 1021-32.
- Costa EM, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro PM, Veiga M, Madureira R, Tavaría F, Pintado MM. 2017. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mat Sci Eng C* 79, 221-226.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 2, 884-900.
- Farokhzad OC and Langer R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 1, 16-20.
- Fernandes JC, Tavaría FK, Fonseca SC, Ramos OS, Pintado ME, Malcata FX. 2010. In vitro screening for anti-microbial activity of chitosans and chitooligosaccharides, aiming at potential uses in functional textiles. *J Microbiol Biotechnol* 2, 311-318.
- Fernandez L, Breidenstein EB, Song D, Hancock RE. 2012. Role of intracellular proteases in the antibiotic resistance, motility, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2, 1128-32.

- Flemming HC and Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 22, 7945-7947.
- Franconetti A, Carnerero JM, Prado-Gotor R, Cabrera-Escribano F, Jaime C. 2019. Chitosan as a capping agent: Insights on the stabilization of gold nanoparticles. *Carbohydr Polym* 207, 806-814.
- Giri K, Yepes LR, Duncan B, Parameswaran PK, Yan B, Jiang Y, Bilska M, Moyano DF, Thompson M, Rotello VM, Prakash YS. 2015. Targeting bacterial biofilms via surface engineering of gold nanoparticles. *RSC Adv* 5, 105551-105559.
- Hall CW and Mah TF. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 3, 276-301.
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 3, 253-268.
- Hassett DJ, Charniga L, Bean K, Ohman DE, Cohen MS. 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun* 2, 328-336.
- He X, Hwang HM, Aker WG, Wang P, Lin Y, Jiang X, He X. 2014. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* 9, 759-67.

- Heras B, Scanlon MJ, Martin JL. 2015. Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *Br J Clin Pharmacol* 2, 208-215.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 4, 322-332.
- Horii T, Muramatsu H, Morita M, Maekawa M. 2003. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with urinary tract infections during antibiotic therapy. *Microb Drug Resist* 2. 223-9.
- Jung WJ and Park RD. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Mar Drugs* 11, 5328-5356.
- Khan F, Khan MM, Kim YM. 2018. Recent progress and future perspectives of antibiofilm drugs immobilized on nanomaterials. *Curr Pharm Biotechnol* 8, 631-643.
- Khan F, Manivasagan P, Lee JW, Pham DTN, Oh J, Kim YM. 2019b. Fucoidan-stabilized gold nanoparticle-mediated biofilm inhibition, attenuation of virulence and motility properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mar Drugs* 4.
- Khan F, Manivasagan P, Pham DTN, Oh J, Kim S-K, Kim YM. 2019a. Antibiofilm and antivirulence properties of chitosan-polypyrrole nanocomposites to *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 128, 363-73.
- Khan F, Oloketuyi SF, Kim YM. 2019c. Diversity of bacteria and bacterial products as antibiofilm and quorum sensing drugs against pathogenic bacteria. *Curr Drug Targets* 11, 1156-1179.

- Kilmury SLN and Burrows LL. 2018. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR two-component system regulates both twitching and swimming motilities. MBio 4, e01310-18
- Kim SK and Lee JH. 2016. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol. 2, 71-85.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechere JC. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol 21, 5990-6.
- Lee JH, Kim YG, Cho MH, Kim JA, Lee J. 2012. 7-fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 1, 36-44.
- Lee K and Yoon SS. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a programmed bacterial life for fitness. J Microbiol Biotechnol 6, 1053-1064.
- Li R, Yuan X, Wei J, Zhang X, Cheng G, Wang ZA, Du Y. 2019. Synthesis and evaluation of a chitosan oligosaccharide-streptomycin conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mar Drugs 1, 17.
- Li X, Robinson SM, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano DF, Sahar A, Riley MA, Rotello VM. 2014. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. ACS Nano 10, 10682-6.
- Liang S, Sun Y, Dai X. 2018. A Review of the preparation, analysis and biological functions of chitooligosaccharide. Int J Mol Sci 8, E2197.
- Liaqat F and Eltem R. 2018. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. Carbohydr Polym 184, 243-259.

- Lin CS, Tsai YH, Chang CJ, Tseng SF, Wu TR, Lu CC, Wu TS, Lu JJ, Horng JT, Martel J, David MO, Lai HC, Yong JD. 2016. An iron detection system determines bacterial swarming initiation and biofilm formation. *Sci Rep* 6, 36747.
- Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol* 2, 147-55.
- Lodhi G, Kim YS, Hwang JW, Kim SK, Jeon YJ, Je JY, Ahn CB, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2014. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. *Biomed Res Int* 2014, 654913.
- Lu J, Chen Q, Pan B, Qin Z, Fan L, Xia Q, Zhao L. 2019. Efficient inhibition of *Cronobacter* biofilms by chitooligosaccharides of specific molecular weight. *World J Microbiol Biotechnol* 6, 87.
- Lu Y, Slomberg DL, Schoenfisch MH. 2014. Nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as antibacterial agents. *Biomaterials* 5.1716-1724.
- Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, Bardin E, Cameron L, Soren O, Wierre-Gore N, Alton EW, Bundy JG, Connett G, Faust SN, Filloux A, Freemont P, Jones A, Khoo V, Morales S, Murphy R, Pabary R, Simbo A, Schelenz S, Takats Z, Webb J, Williams HD, Davies JC. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med* 10, 685-97.
- Manivasagan P, Alam MS, Kang KH, Kwak M, Kim SK. 2015. Extracellular synthesis of gold bionanoparticles by *Nocardiopsis* sp. and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. *Bioprocess Biosyst Eng* 6, 1167-77.

- Manivasagan P, Bharathiraja S, Bui NQ, Lim IG, Oh J. 2016. Paclitaxel-loaded chitosan oligosaccharide-stabilized gold nanoparticles as novel agents for drug delivery and photoacoustic imaging of cancer cells. *Int J Pharm* 1, 367-379.
- Michel L, Gonzalez N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T, Reimann C. 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* 2, 495-509.
- Mohammadi M, Masoumipour F, Hassanshahian M, Jafarinasab T. 2019. Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. *Microb Pathog* 129, 99-105.
- Morkunas B, Gal B, Galloway WR, Hodgkinson JT, Ibbeson BM, Tan YS, Welch M, Spring DR. 2016. Discovery of an inhibitor of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells. *Beilstein J Org Chem* 12, 1428-33.
- Mu H, Liu Q, Niu H, Sun Y, Duan J. 2016. Gold nanoparticles make chitosan-streptomycin conjugates effective towards Gram-negative bacterial biofilm. *RSC Advances* 6, 8714-21.
- Mu H, Tang J, Liu Q, Sun C, Wang T, Duan J. 2016. Potent antibacterial nanoparticles against biofilm and intracellular bacteria. *Sci Rep* 5, 18877.
- Mulat M, Pandita A, Khan F. 2019. Medicinal plant compounds for combating the multi-drug resistant pathogenic bacteria: A Review. *Curr Pharm Biotechnol* 3, 183-196.

- Naik DN, Wahidullah S, Meena RM. 2013. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by marine invertebrate-derived *Streptomyces* sp. *Lett Appl Microbiol* 3, 197-207.
- O'Toole GA and Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 2, 295-304.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 1, 177-192.
- Papa R, Selan L, Parrilli E, Tilotta M, Sannino F, Feller G, Tutino ML, Artini M. 2015. Anti-biofilm activities from marine cold adapted bacteria against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 6, 1333.
- Park BK and Kim MM. 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci* 11, 5152-5164.
- Patil MP and Kim GD. 2018. Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 172, 487-495.
- Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA, Gitai Z. 2015. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7563-8.
- Quintero-Villegas MI, Aam BB, Rupnow J, Sorlie M, Eijsink VG, Hutkins RW. 2013. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *J Agric Food Chem* 11, 2748-2754.

- Rajkumari J, Busi S, Vasu AC, Reddy P. 2017. Facile green synthesis of baicalein fabricated gold nanoparticles and their antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb Pathog* 107, 261-269.
- Rajkumari J, Meena H, Gangatharan M, Busi S. 2017. Green synthesis of anisotropic gold nanoparticles using hordenine and their antibiofilm efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *IET Nanobiotechnol* 8, 987-994.
- Ramasamy M, Lee JH, Lee J. 2017. Development of gold nanoparticles coated with silica containing the antibiofilm drug cinnamaldehyde and their effects on pathogenic bacteria. *Int J Nanomedicine* 12, 2813-2828.
- Rice KM, Ginjupalli GK, Manne N, Jones CB, Blough ER. 2019. A review of the antimicrobial potential of precious metal derived nanoparticle constructs. *Nanotechnology* 37, 372001.
- Rojas A, Palacios-Baena ZR, Lopez-Cortes LE, Rodriguez-Bano J. Rates. 2019. Predictors and mortality of community-onset bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Microbiol Infect* 8, 964-970.
- Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J Mol Biol* 23, 3628-45.
- Sadeghian I, Hassanshahian M, Sadeghian S, Jamali S, S. 2012. Antimicrobial effects of *Quercus brantii* Fruits on bacterial pathogens. *Jundishapur J Microbiol* 3. 465-469

- Saeidi S, Amini Boroujeni N, Ahmadi H, Hassanshahian M. 2015. Antibacterial activity of some plant extracts against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates. *Jundishapur J Microbiol* 2, e15434.
- Sahariah P and Masson M. 2017. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship. *Biomacromolecules* 11, 3846-3868.
- Savoia D. 2014. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol* 9, 917-28.
- Schroth MN, Cho JJ, Green SK, Kominos SD, 2018, Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *J Med Microbiol* 8, 1191-1201.
- Shi SF, Jia JF, Guo XK, Zhao YP, Chen DS, Guo YY, Zhang XL. 2016. Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 11, 6499-6506.
- Singh P, Pandit S, Beshay M, Mokkaapati V, Garnaes J, Olsson ME, Sultan A, Mackevica A, Mateiu RV, Lütken H, Daugaard AE, Baun A, Mijakovic I. 2018. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the *Rhodiola rosea rhizome* extracts. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* sup3, S886-S899.
- Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. 2018. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)* 4, 413-432.
- Stewart PS and Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138.

- Stintzi A, Evans K, Meyer JM, Poole K. 1998. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 2, 341-5.
- Strehmel J, Neidig A, Nusser M, Geffers R, Brenner-Weiss G, Overhage J. 2015. Sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Appl Environ Microbiol 4, 1274-85.
- Totsika M. 2017. Disarming pathogens: benefits and challenges of antimicrobials that target bacterial virulence instead of growth and viability. Future Med Chem 3, 267-269.
- Vinci G and Rapa M. 2019. Noble metal nanoparticles applications: Recent trends in food control. Bioengineering (Basel) 1, 10.
- Vipin C, Mujeeburahaman M, Arun AB, Ashwini P, Mangesh SV, Rekha PD. 2019. Adaptation and diversification in virulence factors among urinary catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Appl Microbiol 2, 641-650.
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger K-E. 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. Journal of bacteriology 18, 6695-703.
- Wu H, Lee B, Yang L, Wang H, Givskov M, Molin S, Hoiby N, Song Z. 2011. Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation. FEMS Immunol Med Microbiol 1, 49-56.
- Yu Q, Li J, Zhang Y, Wang Y, Liu L, Li M. 2016. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. Sci Rep 6, 26667.

- Zhang A, Mu H, Zhang W, Cui G, Zhu J, Duan J. 2013. Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. *Sci Rep* 3, 3364.
- Zhang X, Niu S, Zhang L. 2014. Antimicrobial susceptibilities and clinical characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Urol Int* 4, 464-9.
- Zhao Y and Jiang X. 2013. Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics. *Nanoscale* 18. 8340-50.
- Zhao Y, Chen Z, Chen Y, Xu J, Li J, Jiang X. 2013. Synergy of non-antibiotic drugs and pyrimidinethiol on gold nanoparticles against superbugs. *J Am Chem Soc* 35, 12940-3.
- Zhao Y, Tian Y, Cui Y, Liu W, Ma W, Jiang X. 2010. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target Gram-negative bacteria. *J Am Chem Soc* 35, 12349-12356.
- Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 6, 3134-47.