

Review

생물막 분산기작을 이용한 만성창상의 치료전략

김재수^{1*} · 김민호²

¹경기대학교 바이오융합학부 생명과학전공, ²켄트주립대학교 생물학과

Therapeutic strategies to manage chronic wounds by using biofilm dispersal mechanisms

Jaisoo Kim^{1*} and Min-Ho Kim²

¹Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea

²Department of Biological Sciences, Kent State University, Kent, OH 44240, USA

(Received April 4, 2019; Revised May 5, 2019; Accepted May 9, 2019)

Most chronic wounds persist in the inflammatory phase during wound healing due to the biofilm. Biofilms are resistant to antibiotics, weakening penetration, resistance to biocides and weakening local immune responses. The biofilm is firmly attached to the surrounding tissues and is very difficult to remove. Therefore, strategies to remove hard biofilms without damaging surrounding tissue are very important. One of possible strategies is dispersal. So many studies have been done to develop new strategies using dispersal mechanisms. In this review paper, especially chemotaxis, phage therapy, polysaccharides, various enzymes (glycosidases, proteases, and deoxyribonucleases), surfactants, dispersion signals, autoinducers, inhibitors were introduced. Combination therapies with other therapies such as antibiotic therapy were also introduced. It is expected that the possibility of treatment of chronic wound infection using the knowledge of the biofilm dispersal mechanisms presented in this paper will be higher.

Keywords: antibiotics, biofilm, chronic wound, dispersal, therapeutic strategy

생물막

생물막은 하나 또는 여러 유형의 표면부착 미생물과 그들이

생성한 세포 외 고분자 물질(extracellular polymeric substances, EPS)로 구성된 점액질의 집합체를 일컫는 말이다. 세포 외 고분자물질로는 다당류, 단백질, 지질 및 DNA 등이 있고 생물막을 생성하는 미생물의 종류로는 세균(bacteria), 곰팡이(fungi), 원생생물(protoists)이 있다. 생물막은 생물 또는 무생물의 표면 등 여러 종류의 표면에서 자랄 수 있는데 자연, 환경, 산업, 의료 등의 분야에서 발견된다. 가장 대표적인 예로는 치아의 표면에 형성되는 치석(dental plaque)을 들 수 있다. 생물막은 3차원 구조를 가지며 공동체를 이루고 살기 때문에 미생물 도시라고도 표현한다. 생물막에 존재하는 미생물의 이점은 영양분을 서로 공유하고 건조, 항생제, 인체의 면역방어 등의 다양한 유해 환경요인으로부터 보호를 받는 것이다.

생물막의 생성기작

생물막의 생성기작은 (i) 초기부착(가역적), (ii) 생물막 구조의 초기발생(비가역적), (iii) 발생된 생물막의 성장, (iv) 생물막의 분산 이렇게 4단계로 진행된다(Fig. 1). 생물막의 생성은 자유유형 미생물의 표면부착으로부터 시작한다. 아직까지 완전히 이해되지는 못했지만, 생물막의 첫 표면부착을 통한 군집형성은 처음에는 약하고 가역적인 반데르발스 힘과 소수성 효과를 통해 일어나는 것으로 추정된다(Briandet *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2010). 편모 또한 운동성을 이용하여

*For correspondence. E-mail: jkintamu@kgu.ac.kr;
Tel.: +82-31-249-9648; Fax: +82-31-249-9604

표면에 접근하고 표면 반발력(repulsive force)을 극복하며 편모의 물리적 구조를 이용하여 표면에 부착하여 세포가 표면을 따라 이동하게 함으로 초기 군집을 이루게 한다(Pratt and Kolter, 1998).

만약 군집이 표면에서 즉시 분리되지 않는다면, 그들은 선모(pili)와 같은 세포 부착 구조를 사용하여 보다 영구적으로 고정할 수 있다. 또한 소수성(hydrophobicity)을 증가시키면 표면(substratum)과 선모(fimbriae)에 의해 세포 표면에 소수성을 갖는 박테리아 사이의 반발이 줄어들어 소수성은 생물막을 형성하는데 중요한 역할을 한다(Donlan, 2002). 어떤 미생물 종들은 자기 스스로 표면에 부착할 수 없지만 대신 기질(matrix)에 고정시키거나 초기 정착 군집에 부착할 수 있다. 미생물 세포들이 정착하는 동안에 N-acyl homoserine lactone (AHL)과 같은 물질을 이용한 정족수감지(quorum sensing, QS)를 통해 서로 의사소통을 한다. 운동성이 없는 일부 박테리아는 성공적으로 생물막을 만들 수 없다. 왜냐하면 비운동성 박테리아는 표면을 인식하지 못하거나 운동성 박테리아처럼 쉽게 응집할 수 없기 때문이다(Donlan, 2002). 일단 군집이 형성되기 시작하면, 생물막이 자라는데는 내부적으로 세포분열

과 외부적으로 세포유입의 두 가지 요소가 주요 원인이 된다. 다당류(polysaccharide)와 같은 기질이 일반적으로 박테리아 생물막을 둘러싸며, 다당류 외의 미네랄, 토양입자(점토, 미사, 모래 등) 및 적혈구나 피브린과 같은 혈액 성분(Donlan, 2002)을 포함하여 이에 국한되지 않는 주변 환경의 물질이 포함될 수 있다. 생물막 형성의 최종단계는 분산(dispersal)으로 알려져 있으며, 생물막이 형성되고 모양과 크기가 변할 수 있는 단계이다.

생물막 분산기작

일반적으로 생물막의 분산기작은 능동형(active)과 수동형(passive)으로 크게 두 가지 범주로 나뉜다. 능동적 분산은 박테리아 자체에 의해 시작되는 기작을 말하는 반면, 수동적 분산은 유체전단(fluid shear), 마모(생물막과 고체 입자의 충돌), 포식자 및 인간의 개입과 같은 외부 힘에 의해 매개되는 생물막 세포의 분리를 의미한다(Lawrence *et al.*, 2002; Choi and Morgenroth, 2003; Ymele-Leki and Ross, 2007). 생물막의 분

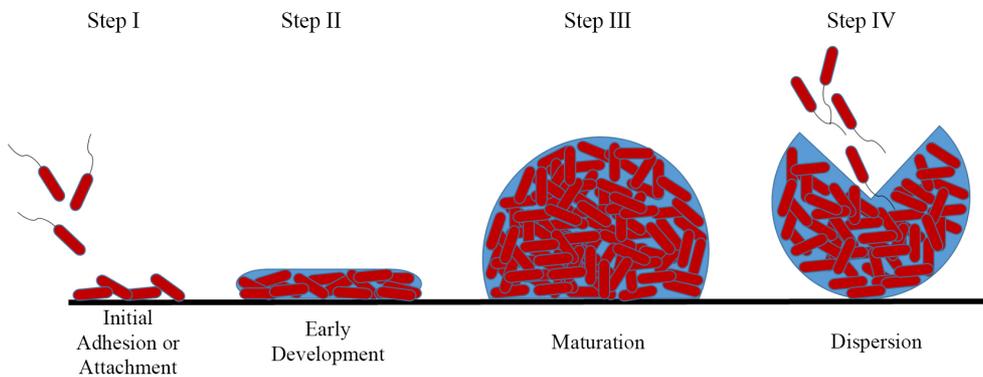


Fig. 1. The life cycle of biofilm.

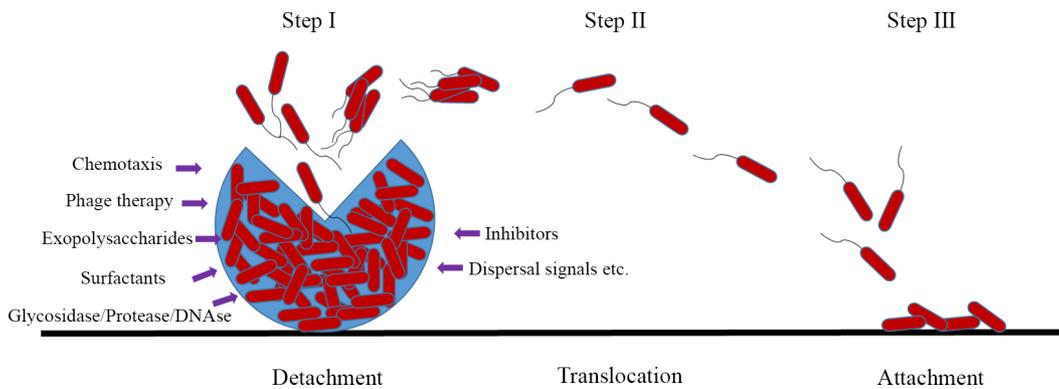


Fig. 2. The steps of biofilm dispersal.

산은 3단계로 나눌 수 있는데 첫번째 단계는 생물막 군집으로부터 세포들의 탈착(detachment)이고 두번째 단계는 새로운 장소로 세포들의 이동(translocation)이며 마지막 단계는 새로운 장소의 매체에 세포들의 부착이다(Kaplan, 2010; Fig. 2). 한편 생물막 분산의 3가지 유형은 침식(erosion), 탈피(sloughing) 그리고 파종(seeding)이다. 침식은 생물막을 형성하는 동안 낮은 수준에서 세포나 작은 세포덩어리들이 연속적으로 방출되는 것을 의미하고 탈피는 생물막 형성의 후기 단계에서 커다란 덩어리가 순식간에 탈착되는 것을 의미하며 파종은 생물막 군집의 안쪽에 존재하는 우묵한 공동(hollow cavity)으로부터 무수한 세포나 작은 세포덩어리가 빠르게 방출되는 것을 의미한다.

일반적인 치료에서 생물막의 문제점

일반적으로 생물막에 존재하는 박테리아는 다음과 같은 원인 때문에 항생제치료를 어려움을 겪는다: (1) 생물막 공동체 내에서 저항 인자(resistance factors)의 전파 증가, (2) 세포 외 기질에 의한 확산 제한, (3) 높은 금속 이온 농도 및 낮은 pH에 의한 항생제 불활성화, (4) 대사적으로 비활성인 저항세포의 존재(Mack *et al.*, 2004; Lewis 2005, 2008; Costerton *et al.*, 2007). 이러한 특성을 종합하여, 생물막의 박테리아는 부유 상태의 세포보다 항생제에 1,000배 이상 내성 또는 저항성을 갖는다(Hoiby *et al.*, 2010). 예를 들어, 예방적 항생제 투여는 임플란트 또는 보철물을 포함하는 외과 수술에서 잘 작용하지 않는다(Secinti *et al.*, 2011).

만성창상에서 생물막의 문제점

생물막은 만성창상의 치료를 무력화하는데 중요한 역할을 한다. 생물막은 급성창상(acute wounds)에는 단지 6%만이 존재하지만 만성창상에는 90% 이상 존재한다(Attinger and Wolcott, 2012). 정맥성 다리궤양(venous leg ulcers)과 같은 생물막이 존재하는 만성창상감염은 감염부위의 제거 없이는 기한 없이 감염이 지속된다(Sun *et al.*, 2008). 이러한 종류의 감염은 숙주 반응(host response)을 통해 감염된 생물막을 제거할 수 없기 때문에 수년간 방치할 수밖에 없다. 심지어는 생물막이 혈관(blood vessels)과 밀접하게 작용하여 숙주의 염증반응(host's inflammatory response)을 조절할 수도 있다(Rumbaugh, 2007; Schaber *et al.*, 2007). 또한 감염부위로 혈액이 충분히 공급되지

않으면 숙주반응이 감소하고 생물막의 독성(biofilm virulence)과 조직의 괴사(tissue necrosis)가 증가한다(Shiner *et al.*, 2006). 또한 생물막 자체가 화학구조의 변형(Hong *et al.*, 2007)이나 숙주의 세포 간 신호전달 활성화(host's cell-to-cell signaling activity)의 변화(Swords *et al.*, 2001)를 통해 염증 반응을 조절한다. 게다가 생물막은 섬유아세포(fibroblast)의 노화, 각질형성세포(keratinocyte)의 손상, 내피세포에 의한 혈관생성 초기화의 실패에 영향을 미친다(Wolcott and Rhoads, 2008).

분산에 의한 생물막 관리의 가능한 전략

분산은 생물막 발달의 마지막 단계이며 수많은 환경신호, 신호전달 경로 및 작용기(effectors)가 관여하는 정족수감지 기작의 일부로 복잡한 과정이다(Karatan and Watnick, 2009). 지금까지 분산기작이 완전히 이해되지는 않았지만 분산기작에 관련된 많은 연구가 임상적으로 유용한 약제의 개발이나 특별히 만성질환을 위한 방법개발을 선도해 나갈 것으로 기대된다. 생물막 관리를 위한 전략을 개발하기 위해 임상적으로 유용한 세 가지 가능한 분산기작은 (1) 생물막 기질의 파괴, (2) 정족수감지 기작을 통한 생물막 형성 저해, (3) 생물막에서 세포탈출 유도가 있다.

생물막 기질은 기질분해효소, 다당류, 계면활성제, 분산신호 및 심지어 파지(phages)와 같은 다양한 약제(agents)에 의해 파괴될 수 있다. 대표적인 약제로써 활성분산을 일으키는 기질분해효소는 당분해효소(glycosidases), 단백질분해효소(proteases)와 DNA 분해효소(deoxyribonucleases)가 있다. 정족수감지 기작을 통한 생물막 형성은 다양한 억제제 또는 생물막 형성을 돕는 정족수감지 기작 관련 효소 및 신호에 대항하는 환경변화에 의해 억제될 수 있다. 마지막 기작은 탄소기질의 갑작스러운 증가와 같은 환경변화로 인해 불활성세포가 편모를 생성하여 운동성을 띄는 활성세포로 전환하므로 생물막에서 탈출하게 된다. 하지만 일부 박테리아의 경우 반대현상이 일어나기도 한다(Park *et al.*, 2016).

만성창상과 같은 만성질환에서 생물막의 분산은 항생제 요법과 같은 약물치료뿐만 아니라 감염된 박테리아세포가 숙주 방어에 노출됨으로 인해 제거가 쉬워진다. 따라서 분산에 의한 생물막 관리는 향후 치료기술, 특히 만성창상과 같은 만성 감염질환에서 유용한 전략이 될 수 있다. 창상치료에 활용 가능할 것으로 추정되는 지금까지 밝혀진 분산기작을 총망라하여 Table 1에 정리하였다.

Table 1. List of active dispersal mechanisms that may be useful for wound infection treatments

Mechanism	Agents
Nutrient-induced biofilm dispersal (chemotaxis)	Various carbon substrates (succinate, glutamate, citrate, and glucose), nitrogen substrates (ammonium chloride) and metal ions (Hg^+ , Ag^+ , Fe^{2+} , and As^{3+})
Environmental signals by various changes	Nutrient starvation, oxygen tension, temperature, osmolarity, and pH
Phage therapy	Many phages encoding EPS-degrading enzymes; T4 and T7 engineered to express recombinant dispersin B; T7 engineered to express lactonase; phage carrying colanic acid-degrading enzyme
Polysaccharides	Exopolysaccharides, capsular polysaccharide and chitosan
Enzymes	Glycosidases (dispersin B, alginate lyase, polysaccharide lyases, disaggregatase), proteases/peptidases (serine proteases, cysteine proteases, metalloprotease, autolysin, Spl, proteinase K, trypsin, and lysostaphin), and nucleases (DNase I, DNase 1L2, Staphylococcal nuclease Nuc, thermonuclease, and micrococcal nuclease)
Surfactants	Phenol-soluble modulins (PSMs), Rhamnolipids (mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid), and SDS
Dispersal signals, Autoinducers or regulators	Amino acids (D-amino acids), polyamine (norspermidine), peptide signals (autoinducing peptide (AIP), AIP-1, RNA III-inhibiting peptide (RIP)), acyl homoserine lactones (7,8- <i>cis-N</i> -(tetradecenyl)homoserine lactone, <i>N</i> -3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone, and <i>N</i> -butanoyl-L-homoserine lactone), quinolone (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), glycopeptidolipids (monoglycosylated fatty acylated peptides), phenazines (tricyclic pyrazines), fatty acids (<i>cis</i> -11-methyl-2-dodecenoic acid and <i>cis</i> -2-decanoic acid), nitric oxide (NO), proteins (CsrA and BdlA)
Inhibitors	Enzyme inhibitors (<i>N</i> -ethyl maleimide (NEM), and the NEM analogs <i>N</i> -phenyl maleimide, <i>N,N'</i> -(1,2-phenylene)dimalimide (oPDM), and <i>N</i> -(1-pyrenyl)maleimide (PyrM), signal inhibitors (BdcA and siamycin I), QS inhibitors (5-imino-4,6-dihydro-3H-1,2,3-triazolo [5,4-d]pyrimidin-7-one (G1), halogenated furanone, and Meta-bromo-thiolactone), and peptides (human cathelicidin peptide LL-37 and peptide 1037)
Combined therapies	Antibiotic & enzyme, antibiotic & chelating agent, antibiotic & antiadhesion agent, antibiotic & polysaccharide, antibiotic & dispersal signal, antibiotic & phage, antibiotic & photochemical, phage & enzyme, enzyme & enzyme, phage & phage, chelating agent & antiseptic

환경변화와 같은 화학주성(chemotaxis)

다양한 탄소기질 및 Hg^+ , Ag^+ , Fe^{2+} 및 As_3^+ 와 같은 금속이온은 다양한 박테리아에서 화학주성 효과를 유도하여 생물막을 분산시킨다. 한 연구 결과에 따르면 숙신산염(succinate), 글루탐산염(glutamate) 및 포도당(glucose)과 같은 탄소기질의 갑작스러운 가용성 증가로 인해 *Pseudomonas aeruginosa*의 경우 표면부착성 생물막 생체량이 약 80% 감소했다고 보고했다(Sauer *et al.*, 2004). 이와 같이 양분유도성 생물막 분산(nutrient-induced biofilm dispersion)은 편모유전자(*fliC*)의 발현 증가와 이에 상응하여 분산된 세포에서 선모유전자(*pilA*)의 발현 감소와 밀접한 관련이 있다(Sauer *et al.*, 2004). *P. aeruginosa*의 탄소의존성 분산을 위한 감지기조절기(sensor regulator)는 BdlA2이고 c-di-GMP 수치에 영향을 받는다(Morgan *et al.*, 2006). 다른 연구에 따르면 2 mM의 질산은($AgNO_3$), 수은염화물($HgCl_2$) 또는 비산나트륨($NaAsO_2$)의 첨가 또는 성장 배지에 20 mM 숙신산의 첨가에 기인한 BdlA 활성화를 통한 생물막 분산이 유도되었다(Morgan *et al.*, 2006). 생물막 형성의 감소는 높은 철 수치에서는 pqs 시스템(pqs system)을 통해(Musk *et al.*, 2005), 낮은 철 수치에서는 람노지질(rhamnolipid)의 생산유도를 통해 발생했다(Glick *et al.*, 2010).

*Escherichia coli*와 *Salmonella enterica* 둘 다에서 curli fimbriae와 셀룰로오스(cellulose) 생합성을 조절하는 핵심조절자(master regulator)인 *csqD* 자체의 발현은 영양결핍, 산소분압(oxygen tension), 온도, 삼투압, pH 등의 다양한 환경신호에 의해(Hammar *et al.*, 1995; Römling *et al.*, 1998, 2000; Zogaj *et al.*, 2001), 그리고 통합 숙주 인자(integration host factor)인 H-NS, 두 가지 성분 반응 조절자인 OmpR 및 CpxR, 그리고 정지기 시그마 인자 RpoS에 의해(Gerstel *et al.*, 2003, 2006; Jubelin *et al.*, 2005) 밀접하게 조절된다.

영양분의 부족 또는 고갈은 생물막의 분산을 유도하며(Marshall, 1988; Delaquis *et al.*, 1989; Sawyer and Hermanowicz, 1998; Gjermansen *et al.*, 2005), 영양결핍 기간 동안, RelA/SpoT 동족체(homologs)에 의해 생성된 신호전달물질(alarmone)인 ppGpp가 세포를 대사적으로 유도하여 비활성 상태로 전환한다. 영양분 결핍은 *P. aeruginosa* (Schleheck *et al.*, 2009), *P. fluorescens* (Delaquis *et al.*, 1989; Delille *et al.*, 2007), *P. putida* (Gjermansen *et al.*, 2005, 2010), 그리고 *Pseudomonas* sp. S9 (Wrangstadh *et al.*, 1989)에 의해 생성된 생물막에서 분리 또는 분산을 유도하였다. *P. fluorescens*는 영양결핍으로 인하여 세포 외 다당류 분해효소(exopolysaccharide lyase) 생성과 생물막 분산이 증

가하도록 유도하였지만(Allison *et al.*, 1998), *P. aeruginosa*는 빠르게 성장하는 세포에서 알긴산분해효소(alginate lyase) 활성이 최대로 유도되었다(Ott *et al.*, 2001). 이외의 많은 연구들이 여러 종류의 박테리아에서 독성과 생물막 형성에 대한 반응기작을 소개하고 있다(Lemos *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2011; Chavez de Paz *et al.*, 2012; He *et al.*, 2012; Wexselblatt *et al.*, 2012; Sugisaki *et al.*, 2013).

P. aeruginosa 실험을 통해 유세포(flow cells)와 최소배지(minimal medium)로 배양된 생물막이 탄소기질 가용성의 급격한 감소 및 급격한 증가에 반응하여 분산되었다(Hunt *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2004). 최소배지에서 글루탐산염(glutamate), 숙신산염(succinate), 구연산염(citrate), 포도당 및 염화암모늄(ammonium chloride)과 같은 다양한 탄소 및 질소원의 농도 증가로 *P. aeruginosa* 생물막 용해가 일어난다(Sauer *et al.*, 2004). 흥미롭게도, 비슷한 반응이 *P. putida*에서 관찰되었으며, 이는 생물막 형성이 일정한 영양분의 농도범위에서만 유리하다는 것을 대략적으로 의미한다(Karatan and Watnick, 2009). 또한 영양염 농도의 증가는 *Acinetobacter* sp. GJ12의 생물막 분산을 유도하였고(James *et al.*, 1995), 최소배지에서 복합배지로의 단계적 변화와 같은 영양소 구성의 변화는 생물막 분산을 유도한다(James *et al.*, 1995).

*P. putida*는 산소고갈로 생물막 분산을 유발했고(Applegate and Bryers, 1991), 심해퇴적물에서 발견되는 혐기성 철환원 세균인 *Shewanella oneidensis*는 산소분자의 급격한 감소에 의해 신속하고 효과적으로 생성된 생물막의 분산을 유도했다(Thormann *et al.*, 2005). 또한, 산소 제한은 c-di-GMP의 감소를 통해 *P. aeruginosa* 생물막의 분산을 유도했다(An *et al.*, 2010).

한편 *Vibrio vulnificus*는 열충격을 주었을 때 정족수감지 핵심 조절자(master regulator)인 SmcR가 열충격에 의해 유도된 두개의 단백질분해효소인 ClpPA와 Lon에 의해 분해되어 결국 캡슐형 다당류(capsular polysaccharide)의 생성을 억제함으로써 생물막 분산을 유도할 수 있다(Lee *et al.*, 2018).

파지 요법(phage therapy)

파지는 단일 또는 혼합 박테리아 종의 생물막을 제거하는데 효과적인데 예로 의료기구나 여과막(filtration membranes)에서 성장한 생물막을 분해시킬 수 있었다(Sharma *et al.*, 2016). 많은 파지는 EPS 분해효소(EPS-degrading enzymes)를 암호화할 수 있고(Hughes *et al.*, 1998a, 1998b; Sutherland *et al.*, 2004), 저항성이 높은 고정상 박테리아에 증식할 수 있으며(Burrowes *et al.*, 2011) 주로 재조합 분산체 B (DsbB)를 발현

하도록 조작된 T4 및 T7과 같은 자연 발생 파지를 사용한다(Chibeu *et al.*, 2012). 또한 락톤 가수분해효소(lactonase)를 발현하도록 설계된 T7 파지는 많은 박테리아에서 AHL을 분해할 수 있다고 보고되었으며 *P. aeruginosa*와 *E. coli*로 혼합된 생물막에서 효과적인 것으로 나타났다(Pei and Lamas-Samanamud, 2014). 더욱이, 콜라닌산 분해효소(colanic acid-degrading enzyme)를 가진 파지에 의한 2차 감염은 콜라닌산을 과잉 생산하는 파지 내성 박테리아의 발달을 억제할 수 있다(Kim *et al.*, 2015).

다당류(polysaccharides)

세포 외 다당류(exopolysaccharides)는 생물막 형성에 중요한 세포와 세포 간(cell-to-cell) 또는 세포와 표면 간(cell-to-surface)의 상호 작용을 증대한다. 그러나 최근의 증거에 의하면 일부 세균성 세포 외 다당류는 다른 종에 의해 생물막 형성이 억제되거나 불안정화 된다고 한다. 예를 들어, *P. aeruginosa*의 세포 외 다당류는 박테리아 성장을 억제하지 않으면서 이미 형성된 *Staphylococcus epidermidis*와 *S. aureus* 생물막을 파괴한다(Qin *et al.*, 2009). 또한 *E. coli* 균주에서 유래한 수용성 캡슐형 다당류는 광범위한 그람양성균과 그람음성균의 생물막 형성을 막는다(Valle *et al.*, 2006). 한편, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. enterica* 및 *P. fluorescens*에 의해 발생한 성숙한 생물막이 키토산(다당류의 일종)에 의한 항생물막(antibiofilm) 효과가 있음이 입증되었다(Orgaz *et al.*, 2011). 또한 항생물막 다당류 생산 박테리아를 병원성균과 경쟁시키기 위한 프로바이오틱스(probiotics)로써 유용하게 사용될 수 있다(Rendueles *et al.*, 2013).

효소: 당분해효소, 단백질분해효소, DNA 분해효소

생물막의 분산은 주로 다당류, 단백질 및 세포 외 DNA (eDNA)를 주로 포함하는 생물막 기질의 효소분해 결과를 통해 발생할 수 있고 이러한 기질 분해효소는 일종의 당분해효소, 단백질분해효소 또는 핵산분해효소 일 가능성이 높다. 그래서 창상에서 발생하는 생물막 기질의 조성이 다당류, 단백질 또는 eDNA인지 알아야 알맞은 효소를 사용할 수 있다.

당분해효소: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 의해 생성되는 당 가수분해 효소로 β -hexosaminidase라 불리는 dispersin B (DspB)는 박테리아의 펩티도글리칸 층에서 poly- β (1,6)-N-acetyl-D-glucosamines (PNAG)를 절단하였고(Fey, 2010), *S. aureus*와 *S. epidermidis* 생물막과 기타 PNAG 함유 박테리아에서도 효과적이었다(Izano *et al.*, 2008; Kaplan, 2010).

*P. aeruginosa*의 EPS 분해 효소인 알긴산분해효소(alginate lyase)는 알긴산염의 분해에 의해 박테리아를 생물막 기질로부터 분리시키는데 기여하였는데(Boyd and Chakrabarty, 1994), 그 이유는 항생제 활성과 숙주면역반응을 막는 알긴산염(alginate)이 mannuronic acids와 guluronic acids로 구성된 다당류로서 생물막의 중요한 구성요소 중 하나이기 때문이다. 세포 외 다당류의 절단 및 분해를 통해 생물막 해체를 촉진시키는 다당류분해효소는 *P. fluorescens* 및 *P. syringae*에서도 생성되었다(Allison et al., 1998; Preston et al., 2000). 그 외에 disaggregatase는 고세균인 *Methanosarcina mazei*에 의해 생성되었고(Xun et al., 1990), α -아밀라아제는 *S. aureus*에 의해 형성된 생물막을 효과적으로 축소시켰으며 생물막 형성을 저하시켰다. 하지만 *S. epidermidis* 생물막에 대한 항생물막 효과는 나타내지 않았다. 한편 지금까지 가장 효과적인 항생물막 제제는 *B. subtilis*에서 분리한 α -아밀라아제로 보고되었다(Craigen et al., 2011).

단백질분해효소(proteases/peptidases): 7개의 세린(serine) 단백질분해효소(Ssp A와 Spl A-F), 2개의 시스테인(cysteine) 단백질 분해효소(Ssp B와 Scp A), 1개의 금속단백질 분해효소 [metalloprotease (Aur)]를 포함한 총 10개의 분비성 단백질 분해효소가 *S. aureus*에 의해 생성되었고(Shaw et al., 2004), 이들 단백질분해효소의 높은 활성은 중요한 기질 단백질의 분해와 생물막의 불안정화를 가져왔다(Zielinska et al., 2012). 또한 *S. epidermidis*에 의해 생산된 세린 단백질분해효소 Esp (extracellular serine protease)는 *S. aureus* 생물막을 분산시키고(Sugimoto et al., 2013), 세포간 부착에 중요한 기질 단백질을 분해하고, 뮤린(murein) 가수분해효소를 분해함으로써 eDNA의 방출을 방지한다고 보고하였다(Lister and Horswill, 2014). *P. putida*는 동정 되지 않은 생물막 기질의 다당류를 세포에 고정시키는 주변세포질 단백질(periplasmic protein, LapA)을 절단하여 microplate wells이나 유세포에서 배양된 생물막으로부터 세포를 방출시킨다(Gjermansen et al., 2010). *S. aureus*에서 세포 외 단백질분해효소인 aureolysin과 Spl을 암호화하는 유전자를 제거하면 유세포의 생물막 형성이 현저히 증가하고 유출액(fluid effluent)에 존재하는 부유세포가 동시에 감소하여(Boles and Horswill, 2008) *S. aureus* 생물막 분산을 위한 단백질 분해효소의 활성을 필요로 하였다. 하지만 이들 단백질 분해효소의 표적물질은 아직 알려져 있지 않다(Kaplan, 2010). 그 외에 proteinase K와 trypsin은 *S. aureus* 생물막을 효과적으로 파괴시켰고(Chaignon et al., 2007), 세균성 생물막에 침투할 수 있는 천연 포도상구균 내 endopeptidase인 lysostaphin은

(Belyansky et al., 2011a, 2011b) 많은 *S. aureus*와 소수의 *S. epidermidis* 임상균주의 생물막 형성을 감소시켰다(Walencka et al., 2005).

핵산분해효소(nucleases): DNase I는 생물막 구조내에 존재하는 eDNA를 분해시킨다(Qin et al., 2007; Zhu et al., 2007; Guiton et al., 2009). DNase 처리로 *Staphylococcus*와 *Enterococcus*의 생물막 형성을 막았고(Guiton et al., 2009; Mann et al., 2009), 실험상에서(*in vitro*) 이미 형성된 생물막을 분산시켰다(Izano et al., 2008; Guiton et al., 2009). DNase I의 재조합 형태인, pulmozyme은 낭포성섬유증(cystic fibrosis, CF) 환자를 치료하는 특수한 경우에 사용되었다(Shak et al., 1990; Fey, 2010). DNase I가 *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 *Streptococcus pyogenes*에 의해 형성된 생물막의 구조를 강력하게 해체시켰고(Tetz et al., 2009), 또한 *Streptococcus pneumoniae*의 6개의 임상 분리 균주에 대한 생물막 분해를 유도했다(Hall-Stoodley et al., 2008). *S. aureus*와 *P. aeruginosa* 생물막에 대한 DNase I과 DNase 1L2 (20 $\mu\text{g/ml}$)는 각각 강한 항생물막 활성을 나타냈다(Eckhart et al., 2007). 포도상 구균의 핵산분해효소인 Nuc의 발현이 실험상에서 생물막 형성을 감소시킨 반면 nuc 돌연변이는 생물막 형성을 강화시켰다(Mann et al., 2009; Kiedrowski et al., 2011). Thermonuclease 또는 micrococcal nuclease로 알려진 deoxyribonuclease는 *S. aureus* 생물막에서 세포 분리와 관련된 것으로 알려져 왔다(Mann et al., 2009). *S. aureus* 생물막은 thermonuclease를 포함하여 외부에서 추가한 DNA 분해효소(deoxyribonucleases)에 의해 microplate wells에서 쉽게 분리되므로, eDNA가 이 종에서 주요 생물막 기질 부착인자(adhesin)임을 나타냈다(Izano et al., 2008).

계면활성제(surfactants)

생물막 분산은 다양한 유형의 계면활성제에 의해 유발될 수 있고, 분산의 유도는 세포표면 특성의 변화 및 생물막 내 접착성 감소와 관련될 수 있다. Phenol-soluble modulins (PSMs)는 대부분의 *S. aureus* 생물막에 효과가 있는 계면활성제 활성과 같은 비특이적(non-specific) 기작을 나타냈다(Peschel and Otto, 2013). L-Rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (monorhamnolipid)와 L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl (di-rhamnolipid)을 포함한 람노지질은 *P. aeruginosa*에 의해 생산된 세포 외 계면활성제이다(Soberón-Chávez et al., 2005). 양쪽성 특성 때문에 람노지질은 세포-세포, 세포-기질 및 세포-표면 상호 작용의 접착성을 감소시키는 표면작용 성질을 띠

며 결국 중앙중공(central hollowing) 및 생물막 분리를 유도한다(Neu, 1996). 또 다른 계면 활성제인 SDS는 중앙중공을 통해 분산을 일으켰다(Boles *et al.*, 2005).

분산신호(dispersal signals) / 자가유도인자(autoinducers) / 조절인자(regulators)

분산을 유도하는 여러 가지 박테리아에 의해 유도된 신호, 자가유도인자 또는 조절인자는 Acyl-hormone lactones, 세포와 세포간 자가유도펩타이드, 확산성 지방산, D-아미노산 등을 포함한다. 분산이 다양한 신호, 자가유도인자 및 조절인자에 의해 유도된다는 사실은 잠재적으로 환경조건의 변화에 반응하여 부착 또는 부유와 같은 표현형으로 정확하게 조절을 가능케 한다. 정족수감지에서 이들 분자들 중 하나에 의해 제어된 생물막 특이 유전자들의 발현을 통해 분산의 조절이 일어난다.

아미노산: 분산중인 *B. subtilis*가 생성한 D-아미노산은 이미 형성된 생물막을 파괴시켰고 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 의한 생물막 형성을 차단하는데도 효과적이었다(Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Hochbaum *et al.*, 2011). D-아미노산은 접착성 섬유 상호 작용을 방해하거나(Cava *et al.*, 2010), 세포표면에 단백질의 국소화(localization)를 방지함으로써 생물막 분해를 촉진할 가능성이 있다(Hochbaum *et al.*, 2011). 많은 박테리아 종에 의해 생성된 D-아미노산은 아밀로이드 섬유의 방출을 통해 생물막 분해의 일반적인 전략을 제공할 수 있으며(Kolodkin-Gal *et al.*, 2010), 따라서 의료 및 산업의 항생물막 용도에 유용할 수 있다(Kostakioti *et al.*, 2013).

폴리아민(polyamine): Norspermidine은 세포 외 다당류를 표적으로 하여 D-아미노산에 상보적인 방식으로 작용하며, 이러한 norspermidine의 생물막 억제 특성은 *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *E. coli* 펠리클 생물막(pellicle biofilm)에서 관찰되었다. 따라서 특정 세포 외 다당류에 결합하기 위해 합성된 norspermidine 및 기타 폴리아민은 새로운 항생물막 접근법(antibiofilm approach)으로서 D-아미노산과 함께 이용될 수 있다(Kolodkin-Gal *et al.*, 2012).

펩타이드 신호(peptide signals): 자가유도펩타이드(AIP)는 agr (accessory gene regulator) 활성화를 통해 기존 생물막의 완전한 분산을 유도했다(Yarwood *et al.*, 2004; Boles and Horswill, 2008; Lauderdale *et al.*, 2010). 이러한 agr 시스템은 생물막을 분산시키기 위한 계면 활성제의 역할을 하는 단백질

분해효소와 phenol-soluble modulins (PSMs)의 발현을 유도하여 생물막 상태에서 부유 상태로 전환시킨다(Peschel and Otto, 2013). *S. aureus*가 생산하는 자가유도펩타이드 I (AIP-I)는 유세포에서 배양된 *S. aureus* 생물막의 탈리(sloughing)를 유도한다(Boles and Horswill, 2008; Lauderdale *et al.*, 2009). AIP-I는 기질분해 단백질분해효소인 aureolysin과 Spl의 발현을 상향 조절함(up-regulating)으로써 생물막 분산을 매개할 수 있다(Boles and Horswill, 2008). agr 시스템에 의해 제어되는 10개의 세포 외 단백질분해효소는 금속단백질분해효소 aureolysin (aur), 2개의 시스테인 단백질분해효소(scxA와 sspB), 7개의 세린 단백질분해효소[sspA (V8)와 splA-F]가 있다(Dubin, 2002). 정족수감지 반응을 음성적으로 조절하는 RNA III 억제 펩타이드(RIP)는 생체 내에서(*in vivo*) *S. aureus* 생물막을 감소시킬 수 있었다(Giacometti *et al.*, 2003).

아실호모세린락톤(acyl homoserine lactones): 그람음성 박테리아에 의해 생산되는 N-acylhomoserine lactones (AHLs)은 가장 잘 연구된 자가유도인자 종류 중 하나이다(Fuqua and Greenberg, 2002). 생물막 분산과 관련된 AHLs는 *Rhodobacter sphaeroides*에 의해 생산된 7,8-cis-N-(tetradecenoyl) 호모세린락톤(Puskas *et al.*, 1997), *P. aeruginosa*에 의해 생산된 N-3-oxo-dodecanoyl 호모세린락톤(3-oxo-C12-HSL) (Wilson *et al.*, 2004; Purevdorj-Gage *et al.*, 2005), 그리고 *Serratia marcescens*와 *P. aeruginosa*에 의해 생성된 N-butanoyl-L-호모세린락톤(C4-HSL) (Schooling *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2005) 등이 있다. 야생형(wild-type) 생물막에 외인성(exogenous) C4-HSL을 첨가하면 생물막 분산이 유도되는데(Schooling *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2008), 이는 랍노리피드 생합성 유전자인 *rhaA*의 상향조절에 의해 분산을 유도할 것으로 추정된다(Davey *et al.*, 2003). 또한 C4-HSL 신호는 *Serratia marcescens* 생물막의 탈리에도 역시 작용하였다(Rice *et al.*, 2005). 7,8-cis-N-(tetradecenoyl)호모세린락톤은 아마도 EPS 생성 *R. sphaeroides*의 조절을 통해 부유성 응집체의 분산을 유도했다(Puskas *et al.*, 1997).

퀴놀론(quinolone): 외인성 *Pseudomonas* quinolone 신호 또는 PQS라고도 알려진 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone은 microplate wells에서 배양된 야생형 *P. aeruginosa* 생물막의 분산을 유도한다(Pesci *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2008). 이전 연구는 PQS가 *P. aeruginosa* 생물막에서 중앙중공을 유발하는 세포 사멸과 DNA 방출을 매개한다는 것을 보여주었다(Allesen-Holm *et al.*, 2006).

당단백지질(Glycopeptidolipids): Glycopeptidolipids (GPLs)는 작은 가변성 소당류(oligosaccharides)에 의해 추가로 변형된 단당류화 및 지방산화된 펩티드로 기회성 병원균(opportunistic pathogen)인 *Mycobacterium avium*에서 생물막 분산을 매개한다(Freeman *et al.*, 2006).

페날진(phenalazines): *Pseudomonas* 및 *Streptomyces*속의 균주들을 포함한다(Laursen and Nielsen, 2004) 다양한 박테리아에 의해 생산되는 tricyclic pyrazines는 비록 기작이 잘 알려져 있지 않지만 생물막의 분산을 유도할 수 있다(Kaplan, 2010).

지방산(fatty acids): 또 다른 불포화 지방산인 cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (diffusible signal factor, DSF)는 생물막 기질 분해효소인 endo- β -1,4-mannanase (Dow *et al.*, 2003)의 발현을 상향조절하거나 c-di-GMP의 수준조절(Crossman and Dow, 2004)을 통하여 *Xanthomonas campestris*에서 생물막을 분산시킨다. DSF의 한 종류인 외인성 cis-2-decanoic acid는 *P. aeruginosa* 및 계통학적으로 다양한 그람음성균과 그람양성균 및 심지어 일부 균류(fungi)에서 생물막 기질의 분해 및 생물막 분산을 유도하는 것으로 나타났다(Davies and Marques, 2009).

산화질소(nitric oxide): 산화질소(Nitric oxide, NO)는 혐기성 대사의 내인성 생성물로, BdlA 및 주기성(aerotaxis) 유전자들을 통한 c-di-GMP 수준의 조절에 의해 *P. aeruginosa* 생물막(Barraud *et al.*, 2006), NO의 HNOX 족(family) 결합을 통한 c-di-GMP 수준의 조절에 의한 *Legionella pneumophila* 생물막(Carlson *et al.*, 2010), 그리고 운동성 및/또는 주화성(chemotaxis) 반응의 조절에 의한 *Nitrosomonas euroaepa* 생물막(Schmidt *et al.*, 2004)의 분산을 유도하는 것으로 나타났다. NO 공여체(donor)인 sodium nitroprusside의 외인성 첨가는 준치사(sublethal) 농도(25~500 nM)에서 이미 형성된 *P. aeruginosa* 생물막 군집(colonies)의 분리를 유도하는데 이는 분산 효과를 매개하는 세포의 신호로서 NO가 작용한다는 것을 알 수 있다(Romeo, 2006). 이 외에 NO에 의한 생물막 분산을 일으키는 많은 다른 박테리아 종들도 있다(Barraud *et al.*, 2009).

단백질(proteins): *E. coli* 생물막에서 CsrA의 유도는 생물막 분산을 일으킨다(Jackson *et al.*, 2002). 이 단백질은 편모의 생합성을 위한 핵심 오페론(master operon)인 flhDC의 양성

조절인자이다. 숙신산염, 글루탐산염 및 다양한 중금속과 같은 다양한 환경요인에 의한 *P. aeruginosa*의 생물막 분산은 주화성 조절인자 인 BdlA가 필수적이다(Morgan *et al.*, 2006).

억제제(inhibitors)

억제제는 효소 및 신호와 같은 생물막 형성 과정에 관여하는 분자들을 차단하는 작용제(blocking agents)이다. 일부 억제제는 정족수감지 과정을 직접 억제하여 생물막 형성을 차단한다. 이러한 억제제 분자는 합성하거나 천연재료를 사용한다.

N-ethyl maleimide (NEM)와 NEM 유사체(analogs) N-phenyl maleimide, N,N'-(1,2-phenylene)dimalimide (oPDM) 및 N-(1-pyrenyl)maleimide (PyrM)를 포함하는 GlmU (N-acetyl-D-glucosamine-1-phosphate acetyltransferase)에 대항하는 효소 억제제들은 카테리관련 요로감염균 생물막에 존재하는 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*의 임상적 분리균에 대한 항생물막 활성을 보여 주었다(Burton *et al.*, 2006). GlmU는 그람양성균과 그람음성균의 펩티도글리칸과 지질다당류의 필수 전구체인 활성화된 핵산당(nucleotide sugar) UDP-GlcNAc의 생합성에 관여한다(Raetz, 1996). 또한 UDP-GlcNAc는 *E. coli*와 *S. epidermidis*에서 생물막 형성에 필요한 β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine 다당류 부착물질(adhesin)의 합성에 관여한다(Itoh *et al.*, 2005).

신호전달 억제제인 BdcA 단백질은 운동성 상태에서 고착 상태로 “생활방식의 전환”을 조정하는 세포 내 신호전달분자인(Römling *et al.*, 2013) c-di-GMP를 격리 또는 국지적 농도 감소를 유도하여 생물막의 분산을 증가시켰다. 이는 BdcA의 c-di-GMP 결합 친화력을 증가시킴으로써 더 높은 운동성 유도를 초래한 것이다(Ma *et al.*, 2011). c-di-GMP의 증가는 일반적으로 세포 외 다당류 및 선모의 생산증가 및 운동성의 감소를 가져오고, c-di-GMP의 감소는 반대 효과를 유발하여 생물막의 분산을 유도한다. Siamycin I은 FsrC/FsrA에 의한 GBAP 신호전달 억제제로서 젤라틴분해효소(gelatinase)와 젤라틴분해효소 생합성-활성 페로몬(gelatinase biosynthesis-activating pheromone, GBAP)을 억제했다.

정족수감지 억제제인 5-imino-4,6-dihydro-3H-1,2,3-triazolo [5,4-d]pyrimidin-7-one (G1)은 생물막에서 *P. aeruginosa*에 의해 방출된 세포 외 DNA의 양을 감소시킬 수 있었고 *P. aeruginosa*의 LasR 단백질에 결합하여 하류(downstream) 유전자 발현을 변경하므로 세포 내 여러가지 lasR 조절 독성인자의 수준을 감소시켰다(Tan *et al.*, 2013). 천연물 할로젠화 퓨라논(halogenated furanone)은 *P. aeruginosa* 생물막 형성을 억제하고 만성

Pseudomonas 감염으로부터 실험쥐를 보호하였으며 항생제인 토브라마이신(tobramycin)과 함께 시너지 효과를 발휘할 수 있었다(Hentzer *et al.*, 2002, 2003). 할로젠화 퓨라논은 가속화된 LuxR 회전을 통해 정족수감지를 억제하고(Manefield *et al.*, 2002), meta-bromo-thiolactone은 병원성 인자 발현 및 생물막 형성을 예방할 뿐만 아니라, *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충) 및 인간 A549 폐세포를 *P. aeruginosa*에 의한 사멸로부터 보호하였다. Meta-bromo-thiolactone (mBTL)은 두 가지 *P. aeruginosa* 정족수감지 수용체인 LasR과 RhIR의 억제를 통해 독성인자인 피오시아닌(pyocyanin)의 생산과 생물막 형성을 억제하였다(O'Loughlin *et al.*, 2013).

한편, 천연 인간 cathelicidin 펩티드 LL-37은 *P. aeruginosa* 생물막의 성장을 차단하고 이미 형성된 생물막의 분해를 가속화할 수 있었다(Overhage *et al.*, 2008). 펩티드 1037은 매우 약한 항균활성을 나타내지만, 그람음성 병원균인 *P. aeruginosa* 및 *Burkholderia cenocepacia*와 그람양성 *L. monocytogenes*에 의한 생물막 형성을 효과적으로 방지하여 생물막에서 세포 사멸을 유도할 수 있었다. *P. aeruginosa*에서 1037은 직선 및 집단 운동성을 줄이고 경련(twitching) 운동성을 자극하고 생물막 형성에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 억제함으로써 생물막을 직접적으로 저해했다(de la Fuente-Núñez *et al.*, 2012).

병합요법(combined therapy)

항생제치료는 창상감염을 비롯한 세균감염을 치료하는데 가장 널리 사용되어 왔다. 그러나 이 치료법은 항생제 효과를 막는 생물막 때문에 만성감염질환을 제대로 치료할 수 없었다. 앞서 언급했듯이 그동안 분산기작을 이용하여 생물막 구조를 파괴하는 방법들이 많이 개발되어 왔다. 이러한 분산방법은 항생제치료 또는 다른 치료법과 같은 다른 방법과 함께 적용하여 치료에 효과를 더 할 수 있다. 창상감염과 같은 만성질환에 대한 가능한 치료전략으로서 많은 조합들이 개발되었다.

항생제와 효소: 항생제에 대한 생물막내 병원균의 감수성(susceptibility) 증가는 분산제 B, 단백질분해효소 K 및 DNase I와 같이 산업적으로 생산되는 많은 효소들, 즉 대부분의 분산제(dispersal agents)에서 관찰되었다(Lauderdale *et al.*, 2010; Kaplan *et al.*, 2012; Shukla and Rao, 2013; Refluveille *et al.*, 2014). 외인성으로 첨가된 알긴산 분해효소는 액상에서 배양된 *P. aeruginosa* 생물막에 대한 일부 항생제의 효과를 증가시킨다(Alkawash *et al.*, 2006; Alipour *et al.*, 2009). 예를 들어 알

긴산 분해효소와 겐타마이신(gentamycin)으로 생물막을 96 시간 동안 배양시켰을 때 생물막의 구조와 살아있는 박테리아가 완전히 소멸되었다(Alkawash *et al.*, 2006). 또한 선택된 항생제에 대한 박테리아 감수성은 DNase I 존재 하에서 증가했다. 즉 아지스로마이신(azithromycin), 리팜핀(rifampin), 레보플록사신(levofloxacin), 암피실린(ampicillin) 및 세포탁심(cefotaxime)은 DNase I (5 µg/ml)의 존재시에 보다 효과적이었다(Tetz *et al.*, 2009). *Candida albicans*를 암포테리신 B(amphotericin B; 1 µg/ml) 단독으로 처리하면 세포 생존율이 1 log10 단위 감소하고 DNase I와 함께 처리하면 3.5 log10 단위로 감소율이 증가했다. 그러나 caspofungin과 fluconazole은 DNase I와 병용할 때 살균효과가 감소했는데 이는 둘 사이의 시너지효과가 사용된 살균제에 따라 다르다는 것을 의미한다(Martins *et al.*, 2012). 0.3 U/ml의 락톤분해효소(lactonase)는 생물막 구조를 파괴하고 ciprofloxacin과 gentamycin의 침투 및 항균활성을 증가시켰다(Kiran *et al.*, 2011). Lysostaphin(endopeptidase)과 oxacillin의 병용으로 생물막에서 자라는 박테리아의 항생제 감수성을 증가시켰으나 헤테로-반코마이신에 감수성이 저하된 *S. aureus*와 methicillin 내성의 *S. epidermidis* 균주에 대한 항생물막 효과는 관찰되지 않았다(Walenccka *et al.*, 2005).

항생제와 킬레이트제(chelating agent): Disodium-EDTA는 tigeicyclin이나 gentamicin과 함께 Hickman 카테터 실험에서 *Staphylococcus* 종과 *P. aeruginosa*에 의한 생물막의 형성을 감소시켰다(Bookstaver *et al.*, 2009). 미노사이클린(minocycline)과 disodium-EDTA의 조합은 3종류의 다른 환자를 대상으로 한 연구에서 카테터 관련 혈류감염의 치료뿐만 아니라 시험관 내 또는 외과용 카테터팁에 생물막 형성 저해효과를 나타내었다(Raad *et al.*, 1997, 2003). 또한 미노사이클린-EDTA 용액은 암에 걸린 소아의 체내이식형 포트(port) 감염을 예방하는데 성공적으로 사용되었다(Chatzinikolaou *et al.*, 2003). 또한, 카테터 관련 혈류감염의 감소는 미노사이클린-EDTA로 카테터를 처리한 후에 투석 환자에서 관찰되었다(Bleyer *et al.*, 2005; Feely *et al.*, 2007).

항생제와 항부착제(antiadhesion agent): 만노시드(mannosides)의 복합사용은 임상환경에서 trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMZ) 치료에 내성을 가진 UPEC (uropathogenic *Escherichia coli*) PBC-1 (균주명)에 대한 항균효과를 향상시켰다(Cusumano *et al.*, 2011; Guiton *et al.*, 2012).

항생제와 다당류: 항생물막 다당류를 함께 투여 시 항생제 기능을 향상시키기 때문에 보조제(adjutant)로써 유용하다 (Kostakioti *et al.*, 2013).

항생제와 분산신호: NO 공여체인 sodium nitroprusside는 시험관 내에서 이미 형성된 *P. aeruginosa* 생물막의 균집분리를 유도하고 생물막 제거 시 항생제의 효능을 크게 향상시킨다 (Barraud *et al.*, 2006).

항생제와 파지: 파지와 항생제의 조합은 항생제 내성 *E. coli*의 현저한 감소를 가져왔다 (Coulter *et al.*, 2014).

항생제와 광화학물질: 광화학물질인 I3C는 *S. aureus* 내성 균주에 대한 항생제와의 상승작용을 보였다 (Monte *et al.*, 2014).

파지와 효소: 고정상 세포에서 복제하는 dispersin B를 생성하도록 공학적으로 변형한 파지는 시험관 내에서 이미 형성된 *E. coli* 생물막의 완전한 파괴를 유도했는데 비가공파지 또는 dispersin B 단독 투여보다 더 현저한 효과를 나타냈다. 이는 dispersin B 매개 EPS 분해로 파지가 생물막 구조의 더 깊은 층에 접근하도록 허용했기 때문이다 (Lu and Collins, 2007).

효소와 효소: 알긴산분해효소는 핵산분해효소와 함께 사용하면 낭포성섬유증 환자의 폐에서 알긴산 다당류 축적(alginate polysaccharide build-up)을 치료하는데 유용할 수 있다 (Wong *et al.*, 2000; VanDevanter and Van Dalssen, 2005).

파지와 파지: 박테리오파지 카테일은 단일 박테리오파지만 사용하는 것보다 훨씬 많은 양의 박테리아 세포의 용해를 일으키기 때문에 생물막 내의 박테리아에 더 큰 영향을 미친다. 첫번째 파지가 분해효소(depolymerase)를 사용하여 박테리아 생물막 기질 내의 다당류를 분해함으로써 다른 파지의 감염을 촉진시킬 수 있다 (Sharma *et al.*, 2016).

킬레이트제와 방부제(antiseptic): 2% chlorhexidine과 젖산(lactic acid)의 동시 투여는 젖산의 살균효율을 약간 향상시켰고, 0.2% cetrimide 투여는 사용된 젖산농도에 관계없이 시험된 모든 균주를 완전히 제거했다 (Arias-Moliz *et al.*, 2012).

결론

분산은 창상의 효과적인 치료를 위한 가장 기대되는 분야 중 하나이다. 본 고찰에서 소개된 많은 분산제 또는 신호(cues)들은 창상치료에 적용 가능한 많은 선택 중 하나가 될 수 있고 항생제 요법과 같은 다른 치료법들과 병행하여 다양하게 개발될 수 있다. 그러나 많은 연구에서 어떤 분산전략이 효과적인지 선택하는데 도움을 주기 때문에 메타게노믹스(metagenomics)를 통한 창상의 생물막에 존재하는 세균의 균집구조를 분석하는 것이 필요할지도 모른다.

날카로운 절제술(debridement)은 생물막을 물리적으로 현저하게 감소시키지만, 잔여 생물막을 완전히 파괴할 수 없으며, 오히려 생물막의 재성장을 일으킬 수 있고 일부 창상은 주변조직의 심각한 손상을 초래할 수 있다. 따라서 분산전략의 직접적인 사용이나 절제술 후 간접적인 사용은 창상유형에 따라 선택적으로 사용할 수 있다. 또한 분산제를 포함한 상처 드레싱의 사용은 분산전략을 적용하는 방법 중 하나일 수 있다.

거의 모든 분산연구가 실험실의 통제된 조건하에서 즉 시험관 내에서 수행되었기 때문에 이러한 결과를 창상의 생물막과 같은 실제 임상상황에 적용하는 것은 극히 어렵다. 따라서 앞으로의 연구는 많은 연구자와 임상인들이 동물 또는 인간의 창상에서 이미 개발된 다양한 분산전략을 실제 임상에 사용할 것을 강력하게 권장한다. 실용적인 응용을 통한 지속적인 연구는 분산에 대한 많은 이전 연구들의 가치를 높일 것으로 전망된다.

적요

대부분의 만성창상(chronic wounds)은 생물막으로 인해 상처 치유시 염증단계를 지속시킨다. 생물막은 항생제(antibiotics)에 대한 저항성을 가지며 침투력을 저하시키고 살균제(biocides)에 대한 내성을 지니며 국소면역반응을 약화시킨다. 또한 생물막은 주변의 조직에 단단히 붙어 있어 제거하는 작업이 매우 어렵다. 그러므로 주변 조직을 손상시키지 않으면서 단단한 생물막을 제거하는 전략은 매우 중요하다. 그 중에 하나가 분산기작을 이용한 생물막의 해체이며 지금까지 많은 연구가 수행되어 왔다. 본 고찰논문에서는 특별히 화학주성, 파지요법, 다당류, 다양한 효소(당분분해효소, 단백질분해효소, DNA 분해효소), 계면활성제, 분산신호, 자기유도인자, 조절인자, 억제제 등이 소개되었으며 더 나아가 항생제 치료 및 다른 치료와의 병행을 통한 병합요법도 소개되었다. 앞으로 본 논문

에서 제시된 생물막의 분산기작의 지식을 이용하여 만성 창상 감염치료의 가능성이 더 높아지길 기대한다.

감사의 말

본 연구는 2017학년도 경기대학교 학술연구비(연구년) 지원에 의하여 수행되었음.

References

- Alipour M, Suntres ZE, and Omri A. 2009. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 317-325.
- Alkawash MA, Soothill JS, and Schiller NL. 2006. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS* **114**, 131-138.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, and Tolker-Nielsen T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114-1128.
- Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, and Gilbert P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 179-184.
- An S, Wu J, and Zhang LH. 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8160-8173.
- Applegate DH and Bryers JD. 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal process. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 17-25.
- Arias-Moliz MT, Baca P, Ordonez-Becerra S, Gonzalez-Rodriguez MP, and Ferrer-Luque CM. 2012. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **17**, e902-e906.
- Attinger C and Wolcott R. 2012. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. *Adv. Wound Care* **1**, 127-132.
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, and Webb JS. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7344-7353.
- Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, and Kjelleberg S. 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* **191**, 7333-7342.
- Belyansky I, Tsirlina VB, Martin TR, Klima DA, Heath J, Lincourt AE, Satishkumar R, Vertegel A, and Heniford BT. 2011a. The addition of lysostaphin dramatically improves survival, protects porcine biomes from infection, and improves graft tensile shear strength. *J. Surg. Res.* **171**, 409-415.
- Belyansky I, Tsirlina VB, Montero PN, Satishkumar R, Martin TR, Lincourt AE, Shipp JL, Vertegel A, and Heniford BT. 2011b. Lysostaphin-coated mesh prevents staphylococcal infection and significantly improves survival in a contaminated surgical field. *Am. Surg.* **77**, 1025-1031.
- Bleyer AJ, Mason L, Russell G, Raad II, and Sherertz RJ. 2005. A randomized, controlled trial of a new vascular catheter flush solution (minocycline-EDTA) in temporary hemodialysis access. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**, 520-524.
- Boles BR and Horswill AR. 2008. agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **4**, e1000052.
- Boles BR, Thoendel M, and Singh PK. 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**, 1210-1223.
- Bookstaver PB, Williamson JC, Tucker BK, Raad II, and Sherertz RJ. 2009. Activity of novel antibiotic lock solutions in a model against isolates of catheter-related bloodstream infections. *Ann. Pharmacother.* **43**, 210-219.
- Boyd A and Chakrabarty AM. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2355-2359.
- Briandet R, Hery JM, and Bellon-Fontaine MN. 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **21**, 299-310.
- Burrows B, Harper DR, Anderson J, McConville M, and Enright MC. 2011. Bacteriophage therapy: Potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **9**, 775-785.
- Burton E, Gawande PV, Yakandawala N, LoVetri K, Zhanel GG, Romeo T, Friesen AD, and Madhyastha S. 2006. Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1835-1840.
- Carlson HK, Vance RE, and Marletta MA. 2010. H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **77**, 930-942.
- Cava F, Lam H, de Pedro MA, and Waldor MK. 2011. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 817-831.
- Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, and Jabbouri S. 2007. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 125-132.
- Chatzinikolaou I, Zipf TF, Hanna H, Umphrey J, Roberts WM, Sherertz R, Hachem R, and Raad I. 2003. Minocycline-ethylenediaminetetraacetate lock solution for the prevention of implantable port infections in children with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 116-119.
- Chavez de Paz LE, Lemos JA, Wickstrom C, and Sedgley CM. 2012.

- Role of (p)ppGpp in biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1627–1630.
- Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann HW, Kropinski AM, and Boerlin P.** 2012. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses* **4**, 471–487.
- Choi YC and Morgenroth E.** 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci. Technol.* **47**, 69–76.
- Costerton JW, Montanaro L, and Arciola CR.** 2007. Bacterial communications in implant infections: A target for an intelligence war. *Int. J. Artif. Organs* **30**, 757–763.
- Coulter LB, McLean RJC, Rohde RE, and Aron GM.** 2014. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses* **6**, 3778–3786.
- Craigen B, Dashiff A, and Kadouri DE.** 2011. The use of commercially available alpha-amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms. *Open Microbiol. J.* **5**, 21–31.
- Crossman L and Dow JM.** 2004. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* **6**, 623–629.
- Cusumano CK, Pinkner J, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, Henderson JP, Janetka JW, and Hultgren SJ.** 2011. Treatment and prevention of UTI with orally active mannoside FimH inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, 109ra115.
- Davey ME, Caiazza NC, and O'Toole GA.** 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**, 1027–1036.
- Davies DG and Marques CN.** 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **191**, 1393–1403.
- de la Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EB, Horsman S, Lewenza S, Burrows L, and Hancock RE.** 2012. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2696–2704.
- Delaquis PJ, Caldwell DE, Lawrence JR, and McCurdy AR.** 1989. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microb. Ecol.* **18**, 199–210.
- Delille A, Quiles F, and Humbert F.** 2007. *In situ* monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5782–5788.
- Dong YH, Zhang XF, An SW, Xu JL, and Zhang LH.** 2008. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun. Integr. Biol.* **1**, 88–96.
- Donlan RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 881–890.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, and Tang JL.** 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signalling and is required for full virulence in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10995–11000.
- Dubin G.** 2002. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol. Chem.* **383**, 1075–1086.
- Eckhart L, Fischer H, Barken KB, Tolker-Nielsen T, and Tschachler E.** 2007. DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Dermatol.* **156**, 1342–1345.
- Feely T, Copley A, and Bleyer AJ.** 2007. Catheter lock solutions to prevent bloodstream infections in high-risk hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* **27**, 24–29.
- Fey PD.** 2010. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 610–615.
- Freeman R, Geier H, Weigel KM, Do J, Ford TE, and Cangelosi GA.** 2006. Roles for cell wall glycopeptidolipids in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7554–7558.
- Fuqua C and Greenberg EP.** 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 685–695.
- Gerstel U, Kolb A, and Romling U.** 2006. Regulatory components at the *csgD* promoter-additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5 untranslated region. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 109–117.
- Gerstel U, Park C, and Romling U.** 2003. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* **49**, 639–654.
- Giacometti A, Cironi O, Gov Y, Ghiselli R, Del Prete MS, Mocchegiani F, Saba V, Orlando F, Scalise G, Balaban N, et al.** 2003. RNA III inhibiting peptide inhibits *in vivo* biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1979–1983.
- Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, and Tolker-Nielsen T.** 2010. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol. Microbiol.* **75**, 815–826.
- Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, and Tolker-Nielsen T.** 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**, 894–904.
- Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Deziel E, Greenberg EP, Poole K, and Banin E.** 2010. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 2973–2980.
- Guítton PS, Cusumano CK, Kline KA, Dodson KW, Han Z, Janetka JW, Henderson JP, Caparon MG, and Hultgren SJ.** 2012. Combinatorial small-molecule therapy prevents uropathogenic *Escherichia coli* catheter-associated urinary tract infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4738–4745.

- Guion PS, Hung CS, Kline KA, Roth R, Kau AL, Hayes E, Heuser J, Dodson KW, Caparon MG, and Hultgren SJ.** 2009. Contribution of autolysin and Sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect. Immun.* **77**, 3626–3638.
- Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, et al.** 2008. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* **8**, 173.
- Hammar M, Armqvist A, Bian Z, Olsen A, and Normark S.** 1995. Expression of two *csq* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **18**, 661–670.
- He H, Cooper JN, Mishra A, and Raskin DM.** 2012. Stringent response regulation of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **194**, 2962–2972.
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eber L, Molin S, Høiby N, et al.** 2002. Inhibition of quorum sensing in *P. aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**, 87–102.
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, et al.** 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* **22**, 3803–3815.
- Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, Kolter R, Aizenberg J, and Losick R.** 2011. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. *J. Bacteriol.* **193**, 5616–5622.
- Høiby N, Bjamsholt T, Givskov M, Molin S, and Ciofu O.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332.
- Hong W, Mason K, Jurcisek J, Novotny L, Bakaletz LO, and Swords WE.** 2007. Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect. Immun.* **75**, 958–965.
- Hughes KA, Sutherland IW, Clark J, and Jones MV.** 1998a. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases—Novel tools for study of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 583–590.
- Hughes KA, Sutherland IW, and Jones MV.** 1998b. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: The role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* **144**, 3039–3047.
- Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA, and Stewart PS.** 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7418–7425.
- Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston 3rd JF, and Romeo T.** 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 382–387.
- Izano EA, Amarante MA, Kher WB, and Kaplan JB.** 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 470–476.
- Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, and Romeo T.** 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 290–301.
- James GA, Korber DR, Caldwell DE, and Costerton JW.** 1995. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* **177**, 907–915.
- Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo JM, Lazzaroni JC, Lejeune P, and Dorel C.** 2005. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 2038–2049.
- Kaplan JB.** 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* **89**, 205–218.
- Kaplan JB, Lovetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, and Izano EA.** 2012. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot.* **65**, 73–77.
- Karatan E and Watnick P.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310–347.
- Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS., Bayles KW, and Horswill AR.** 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **6**, e26714.
- Kim MS, Kim YD, Hong SS, Park K, Ko KS, and Myung H.** 2015. Phage-encoded colanic acid-degrading enzyme permits lytic phage infection of a capsule-forming resistant mutant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 900–909.
- Kiran S, Sharma P, Harjai K, and Capalash N.** 2011. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Microbiol.* **3**, 1–12.
- Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, Bottcher T, Kolter R, Clardy J, and Losick R.** 2012. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell* **149**, 684–692.
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, and Losick R.** 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627–629.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, and Hultgren SJ.** 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a010306.
- Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, and Horswill AR.** 2009. Interconnections between sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect. Immun.* **77**, 1623–1635.
- Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, and Horswill AR.** 2010. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J. Orthop. Res.* **28**, 55–61.

- Laursen JB and Nielsen J.** 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues and biological activity. *Chem. Rev.* **104**, 1663–1686.
- Lawrence JR, Scharf B, Packroff G, and Neu TR.** 2002. Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microb. Ecol.* **44**, 199–207.
- Lee KJ, Jung YC, Park SJ, and Lee KH.** 2018. Role of heat shock proteases in quorum-sensing-mediated regulation of biofilm formation by *Vibrio* species. *mBio* **9**, e02086-17.
- Lemos JA, Brown TA, and Burne RA.** 2004. Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **72**, 1431–1440.
- Lewis K.** 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)* **70**, 267–274.
- Lewis K.** 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 107–131.
- Lister JL and Horswill AR.** 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 178.
- Lu TK and Collins JJ.** 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11197–11202.
- Ma Q, Yang Z, Pu M, Peti W, and Wood TK.** 2011. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ. Microbiol.* **13**, 631–642.
- Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, and Herrmann M.** 2004. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: Functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 203–212.
- Manefield M, Rasmussen TB, Hentzer M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, and Givskov M.** 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* **148**, 1119–1127.
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, and Bayles KW.** 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* **4**, e5822.
- Marshall JC.** 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Can. J. Microbiol.* **34**, 503–506.
- Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, and Oliveira R.** 2012. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses* **55**, 80–85.
- Monte J, Abreu AC, Borges A, Simões LC, and Simões M.** 2014. Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathogens* **3**, 473–498.
- Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, and Sauer K.** 2006. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7335–7343.
- Musk DJ, Banko DA, and Hergenrother PJ.** 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* **12**, 789–796.
- Neu TR.** 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**, 151–166.
- Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, et al.** 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982–986.
- O'Loughlin CT, Miller LC, Siryapom A, Drescher K, Semmelhack MF, and Bassler BL.** 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 17981–17986.
- Orgaz B, Lobete MM, Puga CH, and Sanjose C.** 2011. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 817–828.
- Ott CM, Day DF, Koenig DW, and Pierson DL.** 2001. The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Curr. Microbiol.* **42**, 78–81.
- Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, and Hancock RE.** 2008. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* **76**, 4176–4182.
- Park S, Park YH, Lee CR, Kim YR, and Seok YJ.** 2016. Glucose induces delocalization of a flagellar biosynthesis protein from the flagellated pole. *Mol. Microbiol.* **101**, 795–808.
- Pei R and Lamas-Samanamud GR.** 2014. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5340–5348.
- Peschel A and Otto M.** 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 667–673.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, and Iglewski BH.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11229–11234.
- Pratt LA and Kolter R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**, 285–293.
- Preston LA, Wong TY, Bender CL, and Schiller NL.** 2000. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **182**, 6268–6271.
- Purevdorj-Gage B, Costerton WJ, and Stoodley P.** 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology* **151**, 1569–1576.
- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, and Schaefer AL.** 1997. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **179**, 7530–7537.
- Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, and Qu D.** 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**, 2083–2092.
- Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, and Tolker-Nielsen T.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth and disrupt established biofilms by *Staphylococcus epidermidis*.

Microbiology **155**, 2148–2156.

- Raad I, Buzaid A, Rhyne J, Hachem R, Darouiche R, Safar H, Albitar M, and Sherertz RI**. 1997. Minocycline and ethylenediaminetetraacetate for the prevention of recurrent vascular catheter infections. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 149–151.
- Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, Dvorak T, Cook G, and Costerton W**. 2003. *In vitro* and *ex vivo* activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3580–3585.
- Raetz CRH**. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, pp. 1035–1063. In Neidhardt FC, Curtis III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, and Umberger HE. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Reffuveille F, de la Fuente-Nunez C, Mansour S, and Hancock RE**. 2014. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5363–5371.
- Rendueles O, Kaplan JB, and Ghigo JM**. 2013. Antibiofilm polysaccharides. *Environ. Microbiol.* **15**, 334–346.
- Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, and Kjelleberg S**. 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* **187**, 3477–3485.
- Romeo T**. 2006. When the party is over: a signal for dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **188**, 7325–7327.
- Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta W, and Normark S**. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* **180**, 722–731.
- Römling U, Galperin MY, and Gomelsky M**. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 1–52.
- Römling U, Rohde M, Olsen A, Normark S, and Reinkoster J**. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36**, 10–23.
- Rumbaugh KP**. 2007. Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 425–435.
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, and Gilbert P**. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* **186**, 7312–7326.
- Sawyer LK and Hermanowicz SW**. 1998. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. *Water Sci. Technol.* **37**, 211–214.
- Schaber JA, Triffo WJ, Suh SJ, Oliver JW, Hastert MC, Griswold JA, Auer M, Hamood AN, and Rumbaugh KP**. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect. Immun.* **75**, 3715–3721.
- Schleheck D, Barraud N, Klebensberger J, Webb JS, McDougald D, Rice SA, and Kjelleberg S**. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One* **4**, e5513.
- Schmidt I, Steenbakkers PJM, op den Camp HJM, Schmidt K, and Jetten MSM**. 2004. Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J. Bacteriol.* **186**, 2781–2788.
- Schooling S, Charaf UK, Allison DG, and Gilbert P**. 2004. A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* **1**, 91–99.
- Secinti KD, Ozalp H, Attar A, and Sargon MF**. 2011. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* **18**, 391–395.
- Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, and Baker CL**. 1990. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9188–9192.
- Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, and Gabrani R**. 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 309–319.
- Shaw L, Golonka E, Potempa J, and Foster SJ**. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **150**, 217–228.
- Shiner EK, Terentyev D, Bryan A, Sennoune S, Martínez-Zaguilan R, Li G, Gyorke S, Williams SC, and Rumbaugh KP**. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol.* **8**, 1601–1610.
- Shukla SK and Rao TS**. 2013. Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J. Antibiot. (Tokyo)* **66**, 55–60.
- Soberón-Chávez G, Lépinen F, and Déziel E**. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 718–725.
- Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, and Mizunoe Y**. 2013. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **195**, 1645–1655.
- Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, and Kamiya S**. 2013. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology* **159**, 1379–1389.
- Sun IF, Lee SS, Chiu CC, Lin SD, and Lai CS**. 2008. Hyperbaric oxygen therapy with topical negative pressure: an alternative treatment for the refractory sternal wound infection. *J. Card. Surg.* **23**, 677–680.
- Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, and Tait K**. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 1–6.
- Takahashi H, Suda T, Tanaka Y, and Kimura B**. 2010. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letts. Appl. Microbiol.* **50**, 618–625.
- Tan SY, Chua S, Chen Y, Rice SA, Kjelleberg S, Nielsen TE, Yang L,**

- and Givskov M. 2013. Identification of five structurally unrelated quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* from a natural-derivative database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5629–5641.
- Tetz GV, Artemenko NK, and Tetz VV. 2009. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1204–1209.
- Thormann KM, Saville RM, Shukla S, and Spormann AM. 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 1014–1021.
- Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, and Ghigo JM. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12558–12563.
- VanDevanter DR and Van Dalfsen JM. 2005. How much do *Pseudomonas* biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 504–506.
- Vogt SL, Green C, Stevens KM, Day B, Erickson DL, Woods DE, and Storey DG. 2011. The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect. Immun.* **79**, 4094–4104.
- Walencka E, Sadowska B, Różalska S, Hryniewicz W, and Różalska B. 2005. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Pol. J. Microbiol.* **54**, 191–200.
- Wexselblatt E, Oppenheimer-Shaanan Y, Kaspary I, London N, Schueler-Furman O, Yavin E, Glaser G, Katzhendler J, and Ben-Yehuda S. 2012. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathog.* **8**, e1002925.
- Wilson S, Hamilton MA, Hamilton GC, Schumann MR, and Stoodley P. 2004. Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5847–5852.
- Wolcott RD and Rhoads DD. 2008. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischemia. *J. Wound Care* **17**, 145–155.
- Wong TY, Preston LA, and Schiller NL. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 289–340.
- Wrangstadh M, Conway PL, and Kjelleberg S. 1989. The role of an extracellular polysaccharide produced by the marine *Pseudomonas* sp. S9 in cellular detachment during starvation. *Can. J. Microbiol.* **35**, 309–312.
- Xun LY, Mah RA, and Boone DR. 1990. Isolation and characterization of disaggregatase from *Methanosarcina mazei* LYC. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3693–3698.
- Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, and Greenberg EP. 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**, 1838–1850.
- Ymele-Leki P and Ross JM. 2007. Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1834–1841.
- Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, and Somerville GA. 2007. *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect. Immun.* **75**, 4219–4226.
- Zielinska AK, Beenken KE, Mrak LN, Spencer HJ, Post GR, Skinner RA, Tackett AR, Horswill AR, and Smeltzer MS. 2012. *sarA*-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* USA300 isolates. *Mol. Microbiol.* **86**, 1183–1196.
- Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, and Romling U. 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.