

Pseudomonas otitidis PS 균주의 항생물질 생산과 작용 기작

안경준*

서원대학교 생물교육과

Received: December 11, 2017 / Revised: February 14, 2018 / Accepted: February 17, 2018

Antibiotic Production of *Pseudomonas otitidis* PS and Mode of Action

Kyung-Joon Ahn*

Department of Biology Education, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

An isolate capable of inhibiting the growth of gram-positive bacteria was obtained from the soil of Mushroom stream, Cheongju. The isolate was identified as *Pseudomonas otitidis* PS by 16S rRNA gene sequence analysis. *P. otitidis* PS produced antibiotics as a secondary metabolite when cultured in 1% soybean meal with 0.5% glucose. The maximum yield was about 0.1%. The antibiotic substance of *P. otitidis* PS extracted using ethyl acetate displayed a minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml for *Staphylococcus aureus* KCTC 1261. The antibiotic substance produced an orange halo on chrome azurol S agar due to siderophore activity. Growth inhibition was decreased when the iron was depleted. Since the antibiotic activity was lost upon the addition of the reducing agent ascorbic acid or during anaerobic culture, it was considered that antibiotic of *P. otitidis* PS strain exerts its bactericidal effect by the generation of reactive oxygen species.

Keywords: *Pseudomonas otitidis*, antibiotic, bactericidal activity, siderophore

Gram 음성의 γ -proteobacteria에 속하는 *Pseudomonas* 속 세균들은 다양한 탄소원을 이용하여 생육이 가능하므로 자연계 내에 흔하게 분포하고 있다. 특히 다양한 2차 대사산물을 생산하는 종들은 인간을 비롯한 동물에게 기회감염균이 되기도 하며, 식물에게 질병을 유발하거나 또는 식물의 생장을 촉진하는 등의 생물학적 조절자 역할을 수행하고 있다.

Pseudomonas 속 세균들이 생산하는 2차 대사산물 중에는 수용성의 형광색소를 비롯하여 각종 항생물질이 포함되어 있다. Phenazine 계열에 속하는 pyocyanin [1], phenazine-1-carboxylic acid [2] 등이 있으며, 그 외에도 pyoluteorin [3], pyrrolnitrin [4], pyochelin [5], 2,4-diacetylphloroglucinol [6] 등이 알려져 있는데 이러한 항생물질들 중에서 상당수는 방향족 아미노산 생합성 과정의 중간 대사산물이나 최종산물로부터 기원한다.

한편 철은 모든 생물에게 있어서 필수적으로 요구되는 원소인데 에너지 대사 과정에서 산화 환원 반응의 핵심성분이며, 다양한 대사과정에 관여하는 효소들의 보조인자로 사용

된다.

그러나 대부분의 서식지 환경에서 철은 산소와 반응하여 불용성의 안정된 화합물로 존재하므로 생물의 생존에는 제한요인이 된다. 따라서 미생물들은 철 획득을 위한 별도의 독특한 철 흡수 기작을 진화 과정 동안 발달시켜 왔다. Siderophore라고 불리는 철과 친화력이 높은 분자(<1 kDa)를 세포 외부로 분비하여 Fe(III) 포획에 효과적으로 사용하며 [7], 또한 이를 세포 내로 받아들이기 위한 특이적인 수용체 분자들을 세포막 부위에 배열하고 있다 [8]. 그러나 필요하다면 자기 스스로 생산하지 않은 철 흡착물질인 xenosiderophore를 활용하기도 하는데 이러한 능력은 균주의 생존력을 강화시키는 것으로 알려져 있다 [9, 10].

대부분의 근권 *Pseudomonas* 속 세균들은 Fe(III) 결합 peptide인 pyoverdine [11, 12]을 생산하여 식물 병원균과 경쟁하며, 인체에 감염을 일으키는 *P. aeruginosa* 균주들도 pyoverdine과 더불어 pyochelin 같은 phenolic siderophore를 분비하여 Fe(III)을 확보하며, 특히 pyochelin은 인체나 주변의 미생물들에게는 활성산소(ROS)를 배출하여 독성을 나타낸다고 알려져 있다 [13, 14]. 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas otitidis* PS 균주가 Gram 양성세균의 생육을 효과적으로 억제하는 소수성 방향족 화합물을 2차 대사산물로 생산하는

*Corresponding author

Tel: +82-43-299-8403, Fax: +82-43-299-8400

E-mail: kjahn@seowon.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

데, 이 항생물질의 생산과 작용 기작을 조사하였다. *P. otitidis* 세균은 중이염 환자에게서 처음 분리되었으며, *P. aeruginosa*와 같은 기회감염균이지만 주변 환경에도 널리 분포하고 특히 작물의 근권토양에 서식하면서 식물 생육을 촉진한다는 연구가 있으나, pyocyanin을 비롯한 항생물질 생산은 보고된 바 없다[15, 16].

우선 미생물의 생육을 억제하는 항생물질 생산 균주를 찾기 위하여 충북 청주시 무심천 주변 토양에서 시료를 채취하였고, 멸균한 0.85% NaCl 용액 10 ml에 시료 1 g을 넣어 섞은 후 LB 평판배지에 도말하여 형태적으로 다른 균주들을 순수 분리하였다. LB 및 YM 평판배지 중앙에 분리 균주를 희석 접종하여 30°C에서 1일간 배양한 다음, 양쪽에 대상 균주들을 접종하고 다시 1일간 배양하면서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621과 *Bacillus cereus* KCTC 1012 등의 Gram 양성세균 생육을 효과적으로 억제하는 PS 균주를 선발하였다. 분리한 PS 균주는 API 20NE kit (Biomérieux, France)를 이용하여 동정시험을 하였고, 16S rRNA유전자 염기서열 분석 결과를 EzBiocloud database에서 BLAST search하였을 때 type strain인 *P. otitidis* MCC 10330과 1458 염기 중 1 염기가 다른 99.93%의 상동성을 보여 *P. otitidis* PS로 명명하였고, NCBI Genbank에 제출하였으며 accession number는 MG 589936이다.

Soybean meal과 glucose로 조성된 배지에서 32°C, 240 rpm으로 20시간 진탕 배양하면 PS 균주는 항생물질을 생산하였으나, LB 배지에서는 전혀 생산을 보이지 않았다. 배양시간 별로 균 성장을 조사하기 위해 시료를 채취하여 0.85% saline에 희석하고 이를 LB 평판배지에 도말하여 24시간 배양 후의 생균수(colony forming unit/ml)를 측정하였다. 그리고 생산된 항생물질의 농도를 비교하기 위하여 이중 평판

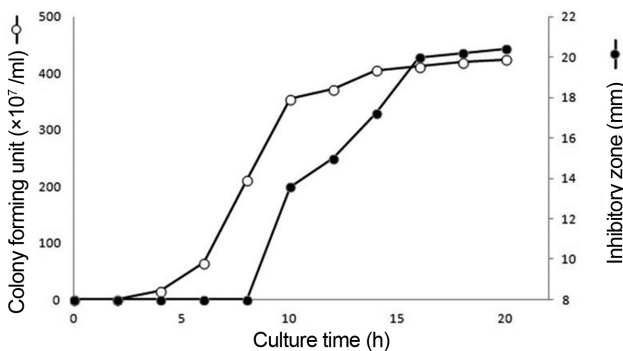


Fig. 1. The growth curve of *P. otitidis* PS and antibiotic production. The growth of PS strain (open) in soybean meal medium was measured by colony forming unit ($\times 10^7$ /ml) according to the culture time and antibiotic activity was compared by size of inhibitory zone (closed) on PCA plate against *S. aureus* KCTC 1261.

Table 1. Effect of medium composition on inhibitory activity of *Pseudomonas otitidis* PS against *Staphylococcus aureus* KCTC 1261.

Glucose (%)	Inhibitory activity			
	Soybean meal (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
0	-	-	+	+
0.25	+	++	+	+
0.5	+	+++	++	+
0.75	+	+++	++	+
1.0	+	++	+	+

+, -: diameter of inhibitory zone (-: no inhibition, +: under 16 mm, ++: 17–20 mm, +++: above 21 mm).

법에 따라 55°C의 1.5 ml PCA 상층배지에 미리 전 배양한 *S. aureus* KCTC 1261 균액 50 μ l를 섞어서 PCA 하층 평판배지 위에 붓고 8 mm stainless cylinder를 놓은 다음, 시간 별로 채취한 배양 상등액 50 μ l를 가지고 24시간 배양하면서 나타나는 생육 억제환의 직경을 조사하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 접종 후 8시간이 지나 PS 균주의 생장이 대수기 후반부를 지나면서 항생물질의 생산이 보이기 시작하여 16시간에서 최대가 되었고 더 이상 크게 증가하지 않았으며, PS 균주가 생산하는 항생물질은 2차 대사산물임을 알 수 있었다. Soybean meal과 glucose 양을 다양하게 조정하여 배양한 결과(Table 1) soybean meal의 농도를 1.0%로 하고 glucose를 첨가하지 않은 배지에서는 항생물질의 생산이 적었으나 0.5% 첨가하였을 때 생육 억제환의 크기가 22 mm를 넘어 최대 생산을 보였다. Glucose와 soybean meal의 농도를 더 높이면 항생물질 생산은 오히려 억제되었으며, 배지에 FeCl₃를 첨가하면 생산량은 증가하였고 반대로 철분을 흡착하는 2,2'-dipyridyl을 0.2 mM 이상 첨가하면 항생물질 생산을 전혀 보이지 않는 것으로 보아 Fe(III)와의 연관성을 알 수 있었다. 효과적으로 항생물질을 생산하는 조건에서 PS 균주를 배양한 다음, 10,000 \times g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 농축하기 위하여 ethyl acetate를 동량 가하여 추출하였으며, 감압 하에서 용매를 제거하고 소수성 분획은 ethanol로, 그리고 친수성 분획은 증류수로 용해시켰다. 대상균의 생육 저해 여부를 조사한 결과 소수성 분획에서만 저해능이 나타났으며, 121°C에서 20분간 가열하여도 생육 저해능은 유지되어서 내열성이 있는 안정된 화합물로 판단하였다. PS 균 배양액 100 ml를 ethyl acetate로 추출하여 최대 100 mg의 건조 중량을 얻어서 약 0.1%의 수율을 보였으며, 이를 ethanol에 용해하여 40 mg/ml 농도로 조정하였다. Ethyl acetate로 추출한 소수성 분획의 성분 분포를 알아보기 위하여 HPLC (LC-20A, Shimadzu, Japan)를 통하여 분석하였다. Sunfire C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, Waters,

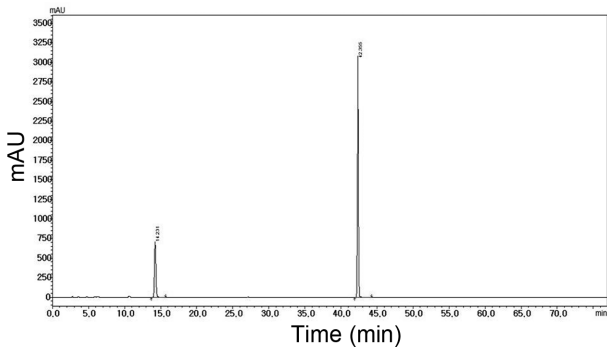


Fig. 2. HPLC analysis of hydrophobic fraction of *P. otitidis* PS culture ethyl acetate extract.

USA) column을 사용하였고, column oven (CTO-20AC, Shimadzu, Japan) 온도는 35°C로 설정하였다. 이동상 조성은 0분에서 20분까지는 80% acetonitrile로, 20분에서 40분까지는 acetonitrile과 0.1% formic acid를 동량으로, 40분에서 60분까지는 acetonitrile과 0.1% formic acid를 각각 90%와 10%로 하여 단계적으로 농도 구배를 주었다. 유속은 1.0 ml/min, 시료 주입량은 10 µl, 검출기 (SPD-M20A, Shimadzu, Japan) 파장은 330 nm로 하여 분석한 자료는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 거의 불순물이 없었고 주된 peak는 41-43분대에 나타났다. 이 시료를 2 fold dilution하여 Wegner 등 [17]의 방법에 따라 Gram 양성세균과 음성세균을 대상으로 MIC (minimum inhibitory concentration)를 측정하였다 (Table 2). Gram 양성세균이 음성세균에 비하여 낮은 농도에서 성장 억제를 보였는데, 이는 *P. aeruginosa* 균주가 생산하는 pyochelin의 성장 억제 pattern과 유사하였다 [14]. 시판되고 있는 기존의 항생제와 비교하기 위하여 *S. aureus* KCTC 1261 균주를 대상으로 PS 시료, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin를 각각 0.8 mg/ml씩 cylinder에 가하고 배양하여 Fig. 3(1)와 같은 결과를 얻었으며, PS 균주가 생산한 항생물질은 기존의 항생제와 비교하여 유

Table 2. Minimum inhibitory concentration of an antibiotic substance produced by *P. otitidis* PS

Bacteria strains	MIC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	2
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	16
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	>128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>128

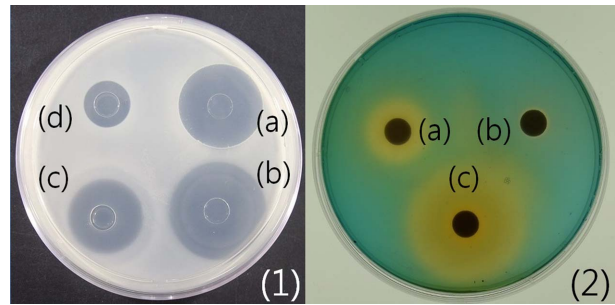


Fig. 3. Growth inhibition and iron uptake of antibiotic substance produced by *P. otitidis* PS. (1) Inhibitory activity against *S. aureus* KCTC 1261 was compared on PCA plate by antibiotics [PS antibiotic, (a); ampicillin, (b); chloramphenicol, (c); and streptomycin, (d)]. (2) Iron uptake was carried on CAS agar plate by addition of 40 mg/ml PS, (a); 20 mM catechol, (b); and 40 mg/ml PS with 20 mM catechol, (c).

사하거나 더 뛰어난 성장 억제능을 보였다. 형광성의 pseudomonad 세균들이 생산하는 2차 대사산물들은 매우 다양하며 그 중에 상당수는 방향족의 소수성 화합물이다 [18]. PS 항생물질이 방향족 화합물인지 알아보기 위하여 PS 시료의 흡광 pattern을 UV-visible spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu)로 조사한 결과 방향족화합물의 특징적인 210 nm와 280 nm 부근의 peak가 보였으며 330 nm 부근에서 또 다른 peak가 나타났다. 추출물의 색은 노란색을 띠었으며, FeCl₃를 가했을 때 적갈색을 나타냈고 반대로 EDTA 처리로 탈색됨으로 보아 Fe(III) 이온과 반응함을 알 수 있었다. 철이 부족한 환경에서 다양한 세균들이 생산하는 siderophore들은 방향족의 phenolate 및 catechol type과 그 외에 hydroxamate 그리고 carboxylate type 등으로 나뉘는데 [19], PS 균주가 생산하는 항생물질이 siderophore로서의 역할도 하는지 알아 보았다. Schwyn와 Neilands [20]의 방법에 따른 CAS (chrome azurol S) 평판배지에 PS 항생물질을 50 µl 가하여 24시간 후 나타난 주황색의 halo를 관찰하였으며, Reeves 등 [21]의 방법에 따라 Hathway 반응을 적용한 결과 PS 항생물질은 3,4-dihydroxybenzoic acid과 유사한 pattern을 보여서 catechol형 siderophore임을 확인하였고, Gillam 등 [22]의 Csaky test를 실시한 결과 hydroxamate 형은 없었다. Fig. 3(2)에서와 같이 PS 시료 단독으로는 siderophore 기능이 매우 약했으나, 20 mM catechol을 함께 처리하였을 때 뚜렷한 halo를 보였다. Adler 등 [14]에 의하면 siderophore 중에서 장내세균이 생산하는 enterobactin은 iron affinity constant가 10⁴⁹ M⁻¹임에 비하여 pseudomonad들이 생산하는 pyochelin은 10⁵ M⁻¹으로 매우 낮는데 PS 균주가 생산하는 siderophore 성 항생물질은 pyochelin과 유사한 것으로 판단되며, catecholate 성질을 갖는 2,3-

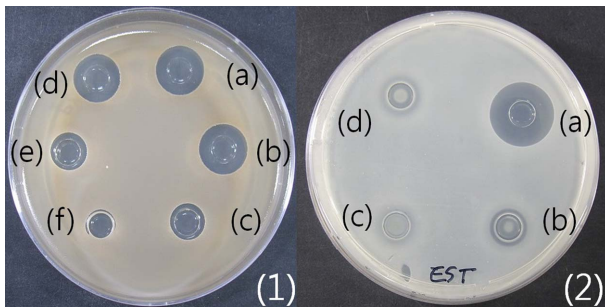


Fig. 4. Recovery from growth inhibition of antibiotic substance of *P. otitidis* PS by iron depletion and addition of reducing agents. (1) The growth inhibition against *B. cereus* KCTC 1012 in M9 minimal medium was recovered by iron depletion with catechol 0 mM, (a); 3.3 mM, (b); 6.7 mM, (c) and with 2, 2'-dipyridyl 0 mM, (d); 0.67 mM, (e); 1.34 mM, (f). (2) The antibacterial activity against *S. aureus* KCTC 1261 in PCA medium was decreased by addition of none, (a); 26 mM ascorbic acid, (b); 25 mM dithiothreitol, (c) and 13 mM NaBH₄, (d).

dihydroxybenzoyl-L-serine 3분자가 모여서 철과의 결합력이 뛰어난 triscatecholate siderophore인 enterobactin이 합성되듯이[9] PS 항생물질도 catechol과 만나서 철 흡착력이 증가된 분자를 형성하는 것으로 보인다. 또 다른 가능성은 원래 PS 항생물질이 철을 갖고 있어서 CAS 평판에서의 효과가 약했지만 같이 처리한 catechol이 철을 빼앗아 감으로써 원래의 siderophore로서의 기능을 다시 찾게 되었을 수도 있다. 이러한 가정을 뒷받침하는 실험 결과로 6.7 mM catechol이나 1.34 mM 2,2'-dipyridyl 만으로는 *B. cereus* KCTC 1012균의 생육이 영향을 받지 않지만(data not shown), Fig. 4(1)에서와 같이 철분이 제한된 M9 최소배지에서 PS 항생물질에 catechol이나 2,2'-dipyridyl을 첨가하면 가지고 있던 철을 잃으면서 생육 억제환의 크기가 줄어들었다. PS 균주의 항생물질만 처리한 대조균의 경우 억제환의 크기가 1.52 cm이었으나 catechol을 6.7 mM 첨가하면 1.09 cm로 줄어들고, 2,2'-dipyridyl 0.67 mM, 1.34 mM을 각각 첨가하면 1.09 cm, 0.84 cm로 줄어서 대상균에 대한 억제력이 감소함을 알 수 있었다. PS 균이 생산하는 항생물질은 철과 결합되어 있으며 이것이 대상 균들에게는 철분을 획득할 수 있는 기회로 받아들여져서 세포 내로 유입이 되고 [23, 24], 세포 내로 유입된 후에는 별도의 기작에 의해 생육 억제 효과를 보이는 것으로 생각된다. Pyochelin과 유사하게 활성산소를 방출하여 bactericidal activity를 보이는 지 확인하기 위하여 Adler 등[14]의 방법에 따라 호기적 조건과 혐기적 조건을 조성하여 PS 항생물질을 첨가하고 *Escherichia coli* K12 균주의 생육을 비교한 결과 호기적 조건에서는 배양 24시간 후 23.1 ± 3.3%만 생존하였고 혐기적 조건에서는 59.8 ± 5.8%가 살아 남았다. 또한 PCA 배지에서 PS 항생물

질을 대상 균주인 *B. cereus* KCTC 1012에게 처리하면서 환원제인 ascorbic acid, dithiothreitol, NaBH₄를 같이 첨가하면 Fig. 4(2)에서와 같이 항세균 활성이 소멸되는 결과를 보이는데 이는 *P. aeruginosa*가 생산하는 pyochelin 처럼 PS 항생물질이 활성산소를 방출하여 치사작용을 일으킴을 의미한다. 그러나 Cox 등[5]에 의하면 pyochelin의 UV spectrum은 218 nm, 248 nm, 310 nm에서 peak를 보여 PS 항생물질과는 구조적으로 다른 물질로 판단되며 분자량을 비롯한 보다 자세한 분자 구조의 차이에 관한 규명이 필요하다.

P. otitidis PS 균주가 생산하는 항생물질에 관한 연구 결과는 항생제 내성이 문제가 되고 있는 최근의 상황에서 다제내성 세균으로의 약제 전달을 철 흡수와 관련하여 용이하게 하거나 낮은 농도에서도 원하는 효과를 얻을 수 있는 새로운 개념의 항생제를 합성하는 등의 개발에 응용이 가능할 것으로 기대한다[19, 25, 26].

적 요

Gram 양성세균의 생육을 억제하는 세균을 청주시 무심천 토양에서 분리하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Pseudomonas otitidis* PS로 동정하였다. PS 균주는 0.5%의 glucose가 포함된 1% soybean meal 배지에서 2차 대사 산물로서 최대 약 0.1%의 수율로 항생물질을 생산하였다. 항생물질 성분은 ethyl acetate로 추출하였으며, *Staphylococcus aureus* KCTC 1261에 대한 minimum inhibitory concentration은 2 µg/ml이었다. 이 성분은 siderophore 활성을 띠어서 chrome azurol S 평판배지에서 주황색 halo를 나타내었으며, 철이 제거되면 생육 억제 효과가 감소하였다. Ascorbic acid 같은 환원제를 첨가하거나 혐기적 환경에서는 항생물질 활성을 잃으므로 PS 항생물질은 활성산소를 방출하여 bactericidal activity를 갖는 것으로 보인다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Baron SS, Rowe JJ. 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **20**: 814-820.
- Linda ST, David MW, Robert FB, Leland SP. 1990. Production of the antibiotic phenazin-1- carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 908-912.
- Arima K, Imanaka H, Kousaka M, Fukuta A, Tamura G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 575-576.

4. Howell CR, Stipanovic RD. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**: 712-715.
5. Cox CD, Rinehart Jr. KL, Moore ML, Cook Jr. JC. 1981. Pyochelin: Novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4256-4260.
6. Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.
7. Vandenberg PA, Gonzales CF, Wright AM, Kunka BS. 1983. Iron-chelating compounds produced by soil *Pseudomonas*: Correlation with fungal growth inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 128-132.
8. Cornelis P, Matthijs S. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* **4**: 787-798.
9. Sheldon JR, Heinrichs DE. 2015. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of Gram positive pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 592-630.
10. Endicott NP, Lee E, Wencewicz TA. 2017. Structural basis for xenosiderophore utilization by the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect. Dis.* **3**: 542-553.
11. Philson SB, Llinas M. 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **257**: 8081-8085.
12. Cox CD, Adams P. 1985. Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **48**: 130-138.
13. Ankenbauer RG, Toyokuni T, Staley A, Rinehart Jr. KL, Cox CD. 1988. Synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **170**: 5344-5351.
14. Adler C, Corbalan NS, Seyedsayamdost MR, Pomares MF, de Cristobal RE, Clardy J, et al. 2012. Catecholate siderophore protect bacteria from pyochelin toxicity. *PLoS One* **7**: e46754.
15. Clark LL, Dajcs JJ, McLean CH, Bartell JG, Stroman DW. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 709-714.
16. Sang MK, Shrestha A, Kim DY, Park KS, Pak CH, Kim KD. 2013. Bio-control of phytophthora blight and anthracnose in pepper by sequentially selected antagonistic rhizobacteria against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol. J.* **29**: 154-167.
17. Wegner DL, Mathis CR, Neblett TR. 1976. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapid growing blood pathogens. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **9**: 861-862.
18. Leisinger T, Margraff R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* **43**: 422-442.
19. Miethke M, Marahiel MA. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 413-451.
20. Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
21. Reeves M, Pine L, Neilands JB, Bullows A. 1983. Absence of siderophore activity in *Legionella* sp. grown in iron deficient media. *J. Bacteriol.* **154**: 324-329.
22. Gillam A, Lewis AG, Anderson RJ. 1981. Quantitative determination of hydroxamic acid. *Anal. Chem.* **53**: 841-844.
23. Roosenberg JM, Lin YM, Lu Y, Miller MJ. 2000. Studies and syntheses of siderophore, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr. Med. Chem.* **7**: 159-197.
24. Möllman U, Heinisch L, Bauernfeind A, Köhler T, Ankel-Fuchs D. 2009. Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy. *Biometals* **22**: 615-624.
25. Braun V, Pramanik A, Gwinner T, Koberle M, Bohn E. 2009. Sideromycin: tools and antibiotics. *Biometals* **22**: 3-13.
26. Ji C, Miller PA, Miller MJ. 2012. Iron Transport-mediated drug delivery: Practical syntheses and in vitro antibacterial studies of tris-catecholates siderophore-aminopenicillin conjugates reveals selectively potent anti-pseudomonad activity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**: 9898-9901.