

Antiadhezívna, antibiofilmová a disperzná aktivita biosurfaktantov izolovaných z *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22

Antiadhesive, antibiofilm and dispersion activity of biosurfactants isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22

Karolína Englerová • Radomíra Nemcová • Zdenka Bedlovičová • Eva Styková

Došlo 21. júna 2021 / Prijato 6. septembra 2021

Súhrn

Cieľom práce bolo sledovanie potenciálnych antibiofilmových vlastností biosurfaktantov (BS) izolovaných z kmeňa *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22 voči tvorbe biofilmu indikátorového kmeňa *Staphylococcus aureus* CCM 4223. V práci bol sledovaný účinok BS 3/22 na rast biofilmu počas spoločnej inkubácie, inhibícia adhézie biofilm tvoriacich buniek a disperzia biofilmu. BS 3/22 inhibovali tvorbu biofilmu, pričom sa jeho tvorba s rastúcou koncentráciou BS signifikantne ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) znižovala. BS 3/22 preukázali aj antiadhezívnu aktivitu, ktorá korelovala s použitou koncentráciou. Detegovaný bol taktiež disperzný efekt izolovaných BS 3/22 na 24-hodinový biofilm *S. aureus* CCM 4223. BS 3/22 boli pri disperzii biofilmu účinné aj pri nižších koncentráciách v porovnaní s antiadhezívnou aktivitou a inhibíciou tvorby biofilmu.

Kľúčové slová: biosurfaktanty • biofilm • inhibícia • disperzia

Summary

The aim of this work was to monitor the potential antibiofilm properties of biosurfactants (BS) isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22 against biofilm

formation of the indicator strain *Staphylococcus aureus* CCM 4223. In this work, the effect of BS 3/22 on biofilm growth during co-incubation, inhibition of biofilm-forming cell adhesion and biofilm dispersion was studied. BS 3/22 inhibited biofilm formation, with its formation decreasing significantly ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$) with increasing BS 3/22 concentration. BS 3/22 also showed antiadhesive activity, which correlated with the concentration used. The dispersing effect of isolated BS 3/22 on a 24-hour biofilm was also detected. BS 3/22 were effective in biofilm dispersion even at lower concentrations compared to antiadhesive activity and inhibition of biofilm formation.

Key words: biosurfactants • biofilm • inhibition • dispersion

Úvod

Biosurfaktanty (BS) sú povrchovo aktívne amfifilné molekuly získavané z rôznych mikroorganizmov¹. V oblasti medicíny majú potenciál využitia v boji proti agresívnym patogénom vďaka ich cytotoxickým, antimikrobiálnym, antiadhezívnym, či antibiofilmovým vlastnostiam². Baktérie patriace do rodu *Bacillus* sú osvedčenými producentmi lipopeptidov, veľkej skupiny BS, ktorých molekula pozostáva z aminokyselinového reťazca a rôznej dĺžky mastných kyselín³. Lipopeptidy produkované kmeňmi *Bacillus* možno kategorizovať do rodín surfaktínu, iturínu a fengycínu s dobre definovanou všeobecnou štruktúrou⁴.

Biofilm je spoločenstvo mikroorganizmov adheujúce na rôzne povrchy uložené v matici zloženej z extracelulárnych polymérnych látok. Prítomnosť biofilmov môže spôsobiť vážne problémy v oblasti zdravia ľudí. Biofilmy môžu viesť k rozvinutiu infekcií u pacientov s medicínskymi pomôckami, ako sú močové, endotracheálne, intravenózne a iné typy katétrov a implantátov zavedených u viac ako 25 % hospitalizo-

PharmDr. Karolína Englerová (✉) • R. Nemcová
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
e-mail: karolina.englerova@gmail.com

Z. Bedlovičová
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Katedra chémie, biochémie a biofyziky

E. Styková
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Klinika koní

vaných pacientov⁵). V súčasnej dobe pretrváva problém s rezistenciou biofilmov na bežné antibiotiká a dezinfekčné prostriedky z dôvodu ich špecifických rastových podmienok a transformácie rezistentných génov⁶). Významným patogénom tvoriacim biofilmy je aj *Staphylococcus aureus*. MSSA (metecilín-senzitívny *S. aureus*) aj MRSA (metecilín-rezistentný *S. aureus*) sú mimoriadne úspešné a adaptabilné patogény spôsobujúce závažné nozokomiálne infekcie⁷). Preto sa biosurfaktanty dostávajú do popredia ako zaujímavé natívne antibiofilmové zlúčeniny vďaka svojej povrchovej aktivite a antimikrobiálnym vlastnostiam^{8,9}).

Práca poukazuje na potenciálnu inhibičnú aktivitu lipopeptidových biosurfaktantov produkovaných kmeňom *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22 voči adhézii a tvorbe biofilmu u *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

Experimentálna časť

Materiál a metodika

Mikroorganizmy

Na produkciu biosurfaktantov bol použitý kmeň *Bacillus amyloliquefaciens* 3/22 izolovaný zo vzorky morských rias z Jadranského mora, identifikovaný pomocou sekvenčnej metódy 16S rRNA¹⁰). Získané BS boli identifikované genotypicky ako lipopeptidy surfaktín, iturín a fengycín¹¹). Ako indikátorový kmeň tvoriaci biofilm bol použitý *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika).

Izolácia biosurfaktantov z *B. amyloliquefaciens* 3/22

Povrchovo aktívne BS boli izolované použitím modifikovanej metódy podľa Płaza et al.¹²). 300 ml McKeen média bolo naočkovaných 3 % (v/v) štartovacej kultúry *B. amyloliquefaciens* 3/22 kultivovanej v BHI bujóne počas 18 hodín pri teplote 27 °C. Inokulované médium bolo potom inkubované 72 hodín pri 27 °C a 140 ot./min. (Shaker SKO-D XL, ARGOLab, Carpi, Taliansko). Po kultivácii sa bakteriálna kultúra centrifugovala (4754 g/65 min/4 °C) a supernatant sa okyslil pomocou 6 M HCl na pH 2. Precipitát vytvorený pri 4 °C počas noci sa znovu centrifugoval (4754 g/55 min/4 °C) a sediment bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody. pH všetkých vzoriek bolo upravené pomocou 1 M NaOH na hodnotu 7. BS boli extrahované vytrepáním do organickej fázy v sústave pozostávajúcej z etylacetátu a metanolu v pomere 4 : 1 (v/v). Organické vrstvy boli spojené a vysušené síranom sodným. Po filtrácii bolo organické rozpúšťadlo odparené (IKA RV 10 Digital, IKA, Nemecko). Žltý olejovitý produkt sa na záver lyofilizoval a uskladnil pri –20 °C.

Antibiofilmová aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22 počas ko-kultivácie Jamky polystyrénovej mikrotitračnej platničky (Greiner ELISA 8 Well Strips, 350 µl, Flat Bottom, Medium Binding; Cruinn Diagnostics Ltd., Dublin, Írsko) boli

naplnené 100 µl BHI média (mBHI; Brain Heart infusion broth; HIMEDIA) obohateného o 1 % glukózu a 2 % NaCl a obsahujúceho BS 3/22 s koncentraciami 30 – 0,058 mg/ml (dvojkové riedenie). Médium bolo naočkované indikátorovým kmeňom *S. aureus* CCM 4223 (McFarland 1; 15 µl na jednu jamku). Negatívnou kontrolou bolo mBHI s fyziologickým roztokom, resp. mBHI s príslušnými koncentraciami BS 3/22. Ako pozitívna kontrola slúžilo mBHI s indikátorovým kmeňom bez BS 3/22. Platničky boli inkubované pri 37 °C 24 hodín.

Tvorba biofilmu bola stanovená pomocou modifikovaného testu s kryštálovou violetou¹³). Supernatant bol z jamiek odstránený, jamky boli trikrát premyté deionizovanou vodou a sušené 40 minút pri izbovej teplote. Po vysušení sa jamky zafarbili 200 µl 0,1 % roztoku kryštálovej violeti a nechali sa inkubovať 30 minút pri izbovej teplote. Potom sa prebytočné farbivo odstránilo a jamky sa trikrát premyli deionizovanou vodou a nechali sa znova sušiť 30 minút pri izbovej teplote.

Kryštálová violeta naviazaná na adherujúce bunky (biofilm) bola extrahovaná 200 µl 30 % kyseliny octovej. Z každej jamky bolo prenesených 150 µl do novej platničky. Optická denzita bola meraná pomocou Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., USA) pri vlnovej dĺžke 550 nm. Pokus bol uskutočnený trikrát a výsledky sú prezentované ako priemer ± smerodajná odchýlka. Percento inhibície bolo vypočítané ako % inhibície = $[1 - (A_{BS}/A_0)] \times 100$,

kde A_{BS} predstavuje absorbanciu jamky s BS a A_0 absorbanciu kontrolnej jamky.

Antiadhezívna aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22

Na testovanie antiadhezívnej aktivity BS 3/22 bola použitá metodika podľa Madhu a Prapulla¹⁴) s nasledovnými modifikáciami: jamky polystyrénovej mikrotitračnej platničky (Greiner ELISA 8 Well Strips, 350 µl, flat bottom, medium binding) boli naplnené 100 µl BS v PBS s koncentraciami 30 – 1,8 mg/ml (dvojkové riedenie) a inkubované 18 hodín pri 4 °C za účelom opracovania jamiek biosurfaktantom. Po inkubácii boli jamky premyté PBS a vysušené. Následne boli naplnené 100 µl mBHI naočkovaného indikátorovým kmeňom *S. aureus* CCM 4223 (1 % inokulum). Ako pozitívna kontrola bol použitý *S. aureus* CCM 4223 v jamkách neopracovaných BS a ako negatívna kontrola čisté mBHI médium bez pridaania indikátorového kmeňa v jamkách opracovaných BS. Platničky boli inkubované 4 hodiny pri 37 °C. Po inkubácii sa kvantifikácia adhézie uskutočnila pomocou modifikovanej metodiky s využitím kryštálovej violete, ako je opísané vyššie. Pokus sa uskutočnil v troch nezávislých pokusoch a výsledky sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Percento antiadhezívnej aktivity bolo vypočítané obdobne ako percento inhibície tvorby biofilmu.

Disperzná aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22

Disperzná aktivita BS 3/22 bola testovaná metódou podľa e Silva et al.¹⁵⁾ s nasledovnou modifikáciou: jamky polystyrénovej mikrotitračnej platničky (Greiner ELISA 8 Well Strips, 350 µl, flat bottom, medium binding) boli naplnené 100 µl mBHI naočkovaného indikátorovým kmeňom *S. aureus* CCM 4223 (1 % inokulum). Platnička bola inkubovaná pri 37 °C 24 hodín za účelom vytvorenia biofilmu *S. aureus* CCM 4223. Po inkubácii sa jamky premyli roztokom PBS. Po vysušení boli jamky polystyrénovej mikrotitračnej naplnené 100 µl BS v PBS s koncentraciami 30 – 0,06 mg/ml (dvojkové riešenie) a inkubované pri 37 °C 24 hodín za účelom disperzie biofilmu *S. aureus* CCM 4223. Pozitívnu kontrolou boli jamky s vytvoreným biofilmom opracované len PBS a negatívnou kontrolou boli jamky opracované roztokom BS bez predvytvoreného biofilmu. Po inkubácii sa kvantifikácia adhézie znova uskutočnila pomocou modifikovanej metodiky s využitím kryštálovej violete. Pokus sa uskutočnil v troch nezávislých pokusoch a výsledky sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Percento disperzie bolo vypočítané obdobne ako percento inhibície tvorby biofilmu.

Štatistické vyhodnotenie

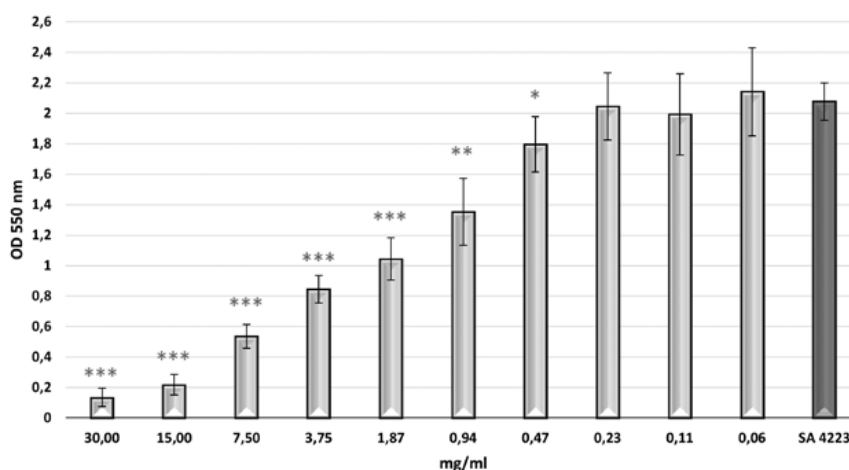
Pre vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednorozmerná analýza rozptylu (ANOVA) s doplnkovým Dunnettovým testom v štatistickom programe GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

Výsledky

Antibiofilmová aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22 počas ko-kultivácie BS mali inhibičný efekt na tvorbu biofilmu u testovaného indikátorového kmeňa *S. aureus* CCM 4223 (obr. 1). Jeho tvorba sa signifikantne znižovala ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie 0,47 – 30 mg/ml BS 3/22. Koncentrácie nižšie ako 0,47 mg/ml nemali inhibičný efekt na tvorbu biofilmu. Najvyššie percento inhibície tvorby biofilmu (viac ako 89 %) bolo dosiahnuté pri koncentrácii 30 mg/ml BS 3/22 (tab. 1). Koncentrácie BS 3/22 od 15 do 3,75 mg/ml inhibovali tvorbu biofilmu viac ako 50 %. Percento inhibície tvorby biofilmu menej ako 50 % bolo pozorované pri koncentráciách BS 3/22 od 1,87 do 0,47 mg/ml.

Antiadhezívna aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22

Antiadhezívny efekt BS 3/22 koreloval s jeho koncentráciou (obr. 2). Po opracovaní jamiek s koncentraciami BS 3/22 30 – 15 – 7,5 mg/ml bolo zistené signifikantné zníženie ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) schopnosti indikátorového kmeňa *S. aureus* CCM 4223 adherovať na steny jamiek v porovnaní s kontrolou (*S. aureus* CCM 4223 bez opracovania jamiek BS 3/22). Ostatné testované koncentrácie (3,75 a 1,87 mg/ml) neovplyvňovali adhéziu indikátorového kmeňa. Viac ako 50% inhibícia adhézie bola pozorovaná pri najvyššej testovanej koncentrácii BS 3/22 (tab. 2). Koncentrácie BS 3/22 nižšie ako 30 mg/ml inhibovali adhéziu *S. aureus* CCM 4223 menej ako 50 %.



Obr. 1. Tvorba biofilmu *S. aureus* CCM 4223 v prítomnosti rôznych koncentrácií BS 3/22. Kontrola: SA 4223 – *S. aureus* CCM 4223 v mBHI bez BS 3/22; údaje sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± SD; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ v porovnaní s kontrolou.

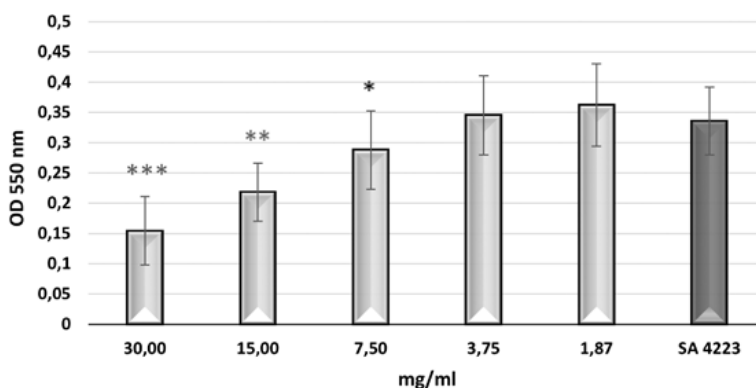
Tab. 1. Percento inhibície tvorby biofilmu *S. aureus* CCM 4223

Aktivita (%)	Koncentrácia BS 3/22 (mg/ml)						
	30	15	7,5	3,75	1,87	0,94	0,47
Inhibícia tvorby biofilmu	89,93 ± 2,70	84,53 ± 3,02	70,28 ± 3,49	60,01 ± 4,09	49,92 ± 5,21	34,84 ± 6,18	9,95 ± 2,88

Disperzná aktivita biosurfaktantov izolovaných z kmeňa B. amyloliquefaciens 3/22

Ďalej bola testovaná schopnosť BS 3/22 redukovať (odlupovať) 24-hodinový predvytvorený biofilm *S. aureus* CCM 4223. Disperzný efekt BS 3/22 znova koreloval s jeho koncentráciou (obr. 3). Bola detegovaná signifikantná redukcia ($p < 0,001$; $p < 0,05$) predvytvoreného 24-hodinového biofilmu indikátorového kmeňa v porovnaní s kontrolou (predvytvorený 24-hodinový biofilm *S. aureus* CCM 4223 bez opraco-

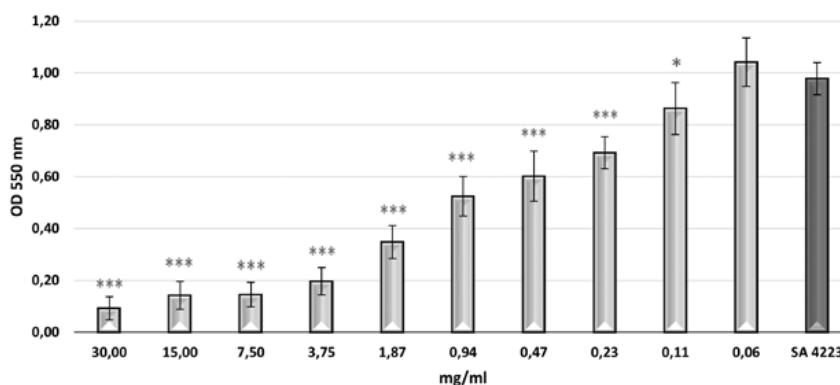
vania BS 3/22) pri koncentráciách od 30 – 0,11 mg/ml. BS 3/22 bol pri disperzii biofilmu *S. aureus* CCM 4223 účinný aj pri nižších koncentráciách v porovnaní s antiadhezívnou aktivitou, resp. inhibíciou tvorby biofilmu. Vysoké percento disperzie biofilmu (78 a viac %) bolo pozorované pri koncentráciách BS 3/22 od 30 do 3,75 mg/ml (tab. 3). Nižšie koncentrácie BS 3/22 stále účinne rozrušovali biofilm – percento disperzie sa postupne znižovalo v závislosti od koncentrácie BS 3/22 od 63 do 11,5 %.



Obr. 2. Adhénzia *S. aureus* CCM 4223 pri rôznych koncentráciách BS 3/22
Kontrola: SA 4223 – *S. aureus* CCM 4223 v jamkách opracovaných PBS;
údaje sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$;
* $p < 0,05$ v porovnaní s kontrolou.

Tab. 2. Percento adhénzie *S. aureus* CCM 4223

Aktivita (%)	Koncentrácia BS 3/22 (mg/ml)		
	30	15	7,5
Inhibícia adhénzie	50,31 \pm 8,15	31,79 \pm 8,49	14,35 \pm 11,57



Obr. 3. Efekt rôznych koncentrácií BS 3/22 na 24-hodinový biofilm *S. aureus* CCM 4223
Kontrola: jamky s vytvoreným biofilmom *S. aureus* CCM 4223, ktorý sme opracovali PBS; údaje sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ v porovnaní s kontrolou.

Tab. 3. Percento disperzie vytvoreného biofilmu *S. aureus* CCM 4223

Aktivita (%)	Koncentrácia BS 3/22 (mg/ml)									
	30	15	7,5	3,75	1,87	0,94	0,47	0,23	0,11	
Disperzia biofilmu	88,53 \pm 4,24	83,54 \pm 5,10	83,31 \pm 4,45	78,12 \pm 4,97	63,01 \pm 5,84	45,39 \pm 7,16	37,64 \pm 9,32	28,62 \pm 5,91	11,54 \pm 9,66	

Diskusia

Kmene patriace do rodu *Bacillus* sú bohatými zdrojmi biologicky aktívnych látok. Medzi ne radíme aj biosurfaktanty, povrchovo aktívne látky so širokým potenciálom využitia v boji proti patogénnym mikroorganizmom. Lipopeptidy a glykolipidy sú najbežnejšie uvádzanými triedami BS s antimikrobiálnou aj antibiofilmovou aktivitou¹⁶⁾. Z rodiny lipopeptidov sú najznámejšie polymyxín A a polymyxín B produkované *Bacillus polymyxa*¹⁷⁾; surfaktín, iturín, fengycín, mykosubtilíny a bacillomycíny produkované *Bacillus subtilis*¹⁸⁾; pumilacidín produkovaný *Bacillus pumilus*¹⁹⁾; lichenyzín z *Bacillus licheniformis*²⁰⁾; a viskozín z *Pseudomonas fluorescens*²¹⁾. Pokiaľ ide o glykolipidy, najlepšie sú preštudované rhamnolipidy z *Pseudomonas aeruginosa*²²⁾, soforolipidy z *Candida bombicola*²³⁾ a manozylerytritolové lipidy z *Candida antarctica*²⁴⁾.

Antibiofilmová aktivita izolovaných BS 3/22 voči biofilmu *S. aureus* CCM 4223 sa v tejto práci hodnotila tromi rôznymi spôsobmi: spoločnou inkubáciou, inhibíciou adhézie a disperzie biofilmu. Percento inhibície biofilmu bolo vzhľadom na kontrolu pri jednotlivých testoch odlišné. Ko-kultivačný test bol najefektívnejší, pretože pri použití 30 mg/ml BS 3/22 sa znížila tvorba biofilmu o viac ako 89 %. Percento inhibície sa s klesajúcou koncentráciou BS 3/22 znižovalo a pri koncentrácii nižšej ako 0,4 mg/ml inhibičný efekt nebol zaznamenaný. Inhibícia rastu *S. aureus* CCM 4223 v prítomnosti izolovaných BS 3/22 pri koncentráciách 30 – 7,5 mg/ml nebola zistená. Preto tento účinok pravdepodobne nesúvisí s antimikrobiálnou aktivitou. Podobné výsledky zistili aj Abdelli et al.²⁵⁾, kedy surfaktín získaný z kmeňa *Bacillus safensis* F4 v koncentráciách 5 a 10 mg/ml významne obmedzoval tvorbu biofilmu *Staphylococcus epidermidis* S61 s percentami inhibície 80 – 90 %. Zmes lipopeptidov (surfaktín, iturín a fengycín) izolovaných z *B. subtilis* preukázala dôležité antibiofilmové a antiadhezívne účinky na uropatogénne baktérie²⁶⁾. Liu et al.²⁷⁾ preukázali, že v podmienkach spoločnej inkubácie surfaktín produkovaný kmeňom *Bacillus subtilis* silne ovplyvňoval adhéziu *S. aureus* na niekoľkých materiáloch (sklo, polystyrén a nehrdzavejúca oceľ) a významne podporoval uvoľňovanie biofilmu.

Test na zistenie antiadhezívnej aktivity BS 3/22 odhalil, že najvyššia inhibícia adhézie 50,3 % bola dosiahnutá pri opracovaní povrchu BS 3/22 s koncentráciou 30 mg/ml. To naznačuje, že BS sú schopné modifikovať fyzikálno-chemické vlastnosti povrchu, čím znižujú adhéziu a inhibujú tvorbu biofilmu. Okrem toho BS menia hydrofóbnosť bakteriálneho povrchu a v dôsledku toho menia mechanizmus adhézie mikroorganizmov. Ich účinky závisia od počtočnej bakteriálnej hydrofóbnosti, ako aj od typu BS a ich koncentrácie, ktorá môže zvyšovať alebo znižovať hydrofóbnosť bakteriálneho povrchu v dôsledku toho, že je viac alebo menej hydrofóbná²⁸⁾. Antiadhezívna aktivita BS už bola opísaná v predchádzajú-

júcich prácach, napríklad Janek et al.²⁹⁾ prezentujú schopnosť pseudofaktínu II (0,5 mg/ml), cyklického lipopeptidu, brániť tvorbu biofilmu *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* a *Candida albicans* na polystyrénovom povrchu. De Araujo et al.³⁰⁾ zistili, že surfaktín pri 0,50 % (w/v) významne znížil adhéziu *Listeria monocytogenes* na polystyrénový povrch, keď sa použil pri vyšších koncentráciách, pričom dosiahol hodnoty až 54 % inhibície. Giri et al.³¹⁾ skúmali antibiofilmový potenciál lipopeptidov produkovaných *B. subtilis* VSG4 a *B. licheniformis* VS16 proti *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium a *Bacillus cereus*. Prvotné opracovanie mikrotitračných doštičiek biosurfaktantmi významne inhibovalo tvorbu biofilmu a podporovalo eradikáciu biofilmu s percentom redukcie pri najvyššej testovanej koncentrácii (5 mg/ml) 65 – 82 %, resp. 61 – 76 %. Účinok surfaktínu na adhéziu a tvorbu biofilmu hodnotili aj de Araujo et al.³²⁾, kedy BS významne znížili adhéziu *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 na polystyrénové povrchy (54 % inhibícia) a tvorbu biofilmu (73 %) na povrchu z nehrdzavejúcej ocele.

V práci sme BS 3/22 použili taktiež na rozrušenie už existujúceho biofilmu, pričom bola dosiahnutá viac ako 88 % disperzia pri najvyššej použitej koncentrácii BS 3/22 (30 mg/ml). Percento disperzie zostalo na úrovni 83 % pri ošetrovaní biofilmu koncentraciami medzi 15 a 3,7 mg/ml. Pri nižších koncentráciách úmerne klesala aj účinnosť disperzie biofilmu. Zistené výsledky sú v zhode so zisteniami iných autorov^{6, 31, 32)}. Surfaktín izolovaný z *B. amyloliquefaciens* NS6 preukázal disperznú aktivitu voči vytvorenému biofilmu *Streptococcus mutans*, kedy pri najvyššej koncentrácii 80 mg/ml bolo percento disperzie $62,2 \pm 7,1$ %⁶⁾. Meena et al.³²⁾ udávajú, že biofilmy patogénnych bakteriálnych kmeňov *S. aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* NCTC 10418, *Salmonella* Typhi a *S. Typhimurium* NCTC74 boli po ošetrovaní surfaktínom izolovaným z *B. subtilis* KLP2015 (100 µg/ml) znížené o 58,10 %, 47,86 %, 14,83 %, 13,91 %, 11,01 % a 10,23 %. Lipopeptidy izolované z kmeňov *B. subtilis* VSG4 a *B. licheniformis* VS16 s najvyššou použitou koncentráciou 5 mg/ml eradikovali vytvorený biofilm kmeňov *S. aureus* ATCC 11778, *E. coli* MTCC65 a *S. Typhimurium* ATCC19430³¹⁾. Disperzia biofilmu bola pravdepodobne vyvolaná odstránením extracelulárnych polymérnych látok (EPS) a deštrukciou mikrokolónii spôsobenou BS³³⁾. EPS zohrávajú dôležitú úlohu v rezistencii biofilmu, pretože bránia kontaktu mikroorganizmov s antimikrobiálnou látkou³⁴⁾.

Záver

Predkladaná práca dokazuje, že biosurfaktanty izolované z kmeňa *B. amyloliquefaciens* 3/22 majú potenciál inhibovať nielen tvorbu biofilmu *S. aureus* v ich prítomnosti, ale majú taktiež schopnosť brániť adhéziu biofilm-tvoriacich buniek a dokážu aj

rozrušit vytvorený biofilm. Tieto výsledky naznačujú, že získané bioaktívne látky je možné využiť ako potenciálne antibiofilmové agens v boji proti patogénnym kmeňom *S. aureus* v biomedicínskej oblasti. Je potrebné ďalej preskúmať podrobnosti o aktivite izolovaných biosurfaktantov v podmienkach *in vivo*.

Práca vznikla za podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-15-0377 a č. APVV-16-0203 a projektu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA 1/0081/17.

Stret záujmov: žiadny.

Literatúra

1. **Kim B. S., Kim J. Y.** Optimization Using 3 3 Full-Factorial Design for Crude Biosurfactant Activity from *Bacillus pumilus* IJ-1 in Submerged Fermentation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2020; 48(1), 48–56.
2. **Mehjabin J. J., et al.** Biosurfactants from Marine Cyanobacteria Collected in Sabah, Malaysia. *J. Nat. Prod.* 2020; 83(6), 1925–1930.
3. **Shekhar S., Sundaramanickam A., Balasubramanian T.** Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2014; 45, 1522–1554.
4. **Kourmentza K., Gromada X., Michael N., et al.** Antimicrobial activity of lipopeptide biosurfactants against foodborne pathogen and food spoilage microorganisms and their cytotoxicity. *Front. Microbiol.* 2021; 11, 3398.
5. **Nazareth T. C., Zanutto C. P., Tripathi L., et al.** The use of low-cost brewery waste product for the production of surfactin as a natural microbial biocide. *Biotechnol. Rep.* 2020; 28, e00537.
6. **Abdollahi S., Tofighi Z., Babaee T., et al.** Evaluation of Anti-oxidant and Anti-biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Pharm. Sci.* 2020; 19(2), 115.
7. **Tahaei S. A. S., Stájer A., Barrak I., et al.** Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: a Laboratory-Based Study in Hungary and a review of the literature. *Infect. Drug Resist.* 2021; 14, 1155.
8. **Meena K. R., Kanwar S. S.** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015, 1–15.
9. **Merghni A., Dallel I., Noumi E., et al.** Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their antibiofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microb. Pathog.* 2017; 104, 84–89.
10. **Filková A.** Štúdium účinku prospešných mikroorganizmov na inhibíciu biofilm tvoriacich patogénov. Diplomová práca. Košice: UVLF 2021.
11. **Englerová K., Nemcová R., Maďar M., et al.** Morské baktérie rodu *Bacillus* – prirodzení producenti lipopeptidových biosurfaktantov. In: Seminár doktorandov venovaný pamiatke akademika Boďu. Vedecké práce doktorandov 2019: zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu. 1. vydanie. Košice: Slovenská akadémia vied, Centrum biovied 2019; 17–19.
12. **Płaza G., Chojniak J., Rudnicka K., et al.** Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 119, 1023–1034.
13. **O'Toole G. A., Pratt L. A., Watnick P. I., et al.** Genetic approaches to study of biofilms. In: *Methods in enzymology*. Elsevier 1999; 91–109.
14. **Madhu A. N., Prapulla, S. G.** Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014; 172(4), 1777–1789.
15. **e Silva S. S., Carvalho J. W. P., Aires C. P., et al.** Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. *Int. J. Dairy Sci.* 2017; 100(10), 7864–7873.
16. **Cochrane S. A., Vederas J. C.** Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* 2016; 36(1), 4–31.
17. **Landman D., Georgescu C., Martin D. A., et al.** Polymyxins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21, 449–465.
18. **Vater J., Kablitz B., Wilde C., et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68, 6210–6219.
19. **Naruse N., Tenmyo O., Kobaru S., et al.** Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.* 1990; 43, 267–280.
20. **Grangemard I., Wallach J., Maget-Dana R., et al.** Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001; 90, 199–210.
21. **Saini H. S., Barragán-Huerta B. E., Lebrón-Paler A., et al.** Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *J. Nat. Prod.* 2008; 71, 1011–1015.
22. **Benincasa M., Abalos A., Oliveira I., et al.** Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 85, 1–8.
23. **Díaz De Rienzo M. A., Banat I. M., Dolman B., et al.** Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnol.* 2015; 32, 720–726.
24. **Kitamoto D., Yanagishita H., Shinbo T., et al.** Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.* 1993; 29, 91–96.

25. **Abdelli F., Jardak M., Elloumi J., et al.** Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. *Biodegradation* 2019; 30, 287–300.
26. **Moryl M., Spętańska M., Dziubek K., et al.** Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochim. Pol.* 2015; 62(4).
27. **Liu J., Li W., Zhu X., et al.** Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103, 4565–4574.
28. **Ahimou F., Jacques P., Deleu M.** Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 2000; 27(10), 749–754.
29. **Janek T., Łukaszewicz M., Krasowska A.** Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiol.* 2012; 12(1), 1–9.
30. **de Araujo L. V., Guimarães C. R., e Silva S.S, Marquitta R. L., et al.** Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control* 2016; 63, 171–178.
31. **Giri S. S., Ryu E. C., Sukumaran V., et al.** Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus strains*. *Microb. Pathog.* 2019; 132, 66–72.
32. **Meena K. R., Sharma A., Kanwar S. S.** Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2020; 26(1), 423–433.
33. **Díaz De Rienzo M. A., Stevenson P. S., Marchant R., et al.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm disruption using microbial surfactants. *J. Appl. Microbiol.* 2016; 120(4), 868–876.
34. **Araujo L. V. D., Freire D. M. G., Nitschke M.** Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quim. Nova* 2013; 36(6), 848–858.