

# 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 mikroorganizmov<sup>1</sup>. V oblasti medicíny majú potenciál využitia v boji proti agresívnym patogénom vďaka ich cytotoxickým, antimikrobiálnym, antiadhezívnym, či antibiofilmovým vlastnostiam<sup>2</sup>. Baktérie patriace do rodu *Bacillus* sú osvedčenými producentmi lipopeptidov, veľkej skupiny BS, ktorých molekula pozostáva z aminokyselinového reťazca a rôznej dĺžky mastných kyselín<sup>3</sup>. Lipopeptidy produkované kmeňmi *Bacillus* možno kategorizovať do rodín surfaktínu, iturínu a fengycínu s dobre definovanou všeobecnou štruktúrou<sup>4</sup>.

Biofilm je spoločenstvo mikroorganizmov adhérujúce na rôzne povrchy uložené v matrici 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 pacientov<sup>5</sup>). V súčasnej dobe pretrváva problém s rezistenciou biofilmov na bežné antibiotiká a dezinfekčné prostriedky z dôvodu ich špecifických rastových podmienok a transformácie rezistentných génov<sup>6</sup>). Významným patogénom tvoriacim biofilmy je aj *Staphylococcus aureus*. MSSA (meticilín-senzitívny *S. aureus*) aj MRSA (meticilín-rezistentný *S. aureus*) sú mimoriadne úspešné a adaptabilné patogény spôsobujúce závažné nozokomiálne infekcie<sup>7</sup>). Preto sa biosurfaktanty dostávajú do popredia ako zaujímavé natívne antibiofilmové zlúčeniny vďaka svojej povrchovej aktivite a antimikrobiálnym vlastnostiam<sup>8,9</sup>).

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 rRNA<sup>10</sup>). Získané BS boli identifikované genotypicky ako lipopeptidy surfaktín, iturín a fengycín<sup>11</sup>). 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.<sup>12</sup>). 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 vytrepaním 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 violetou<sup>13</sup>). 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 violety 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 Prapulla<sup>14</sup>) 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 pridať 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 violety, 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.<sup>15)</sup> s nasledovnou modifikáciou: jamky polystyrénovej mikrotitračnej platničky (Greiner ELISA 8 Well Strips, 350  $\mu$ l, flat bottom, medium binding) boli naplnené 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 včelky. Pokus sa uskutočnil v troch nezávislých pokusoch a výsledky sú uvedené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka. Percento disperzie bolo vypočítané obdobne ako percento inhibície tvorby biofilmu.

### Štatistické vyhodnotenie

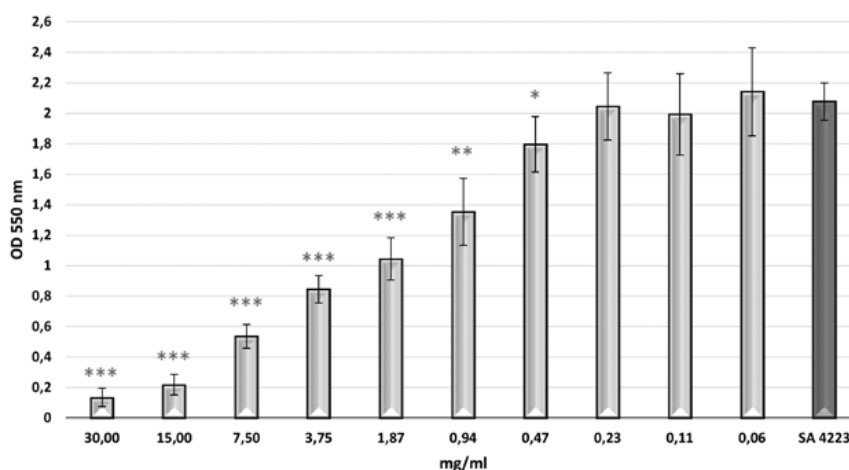
Pre vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednorozmerná analýza rozptylu (ANOVA) s doplnkovým Dunnettovým testom v štatistickom programe GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

### 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 koncentraciou (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  $\pm$  SD; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  v porovnaní s kontrolou.

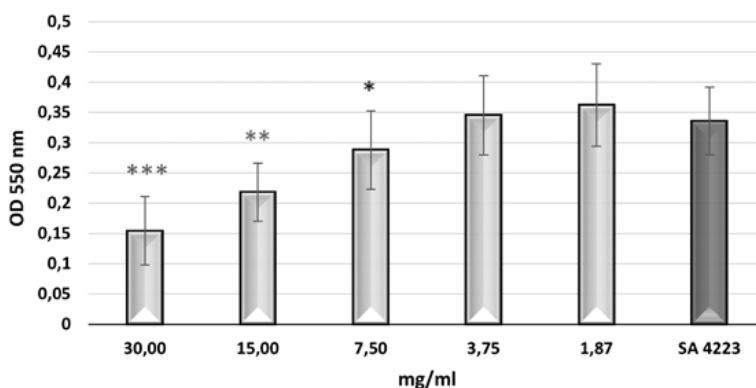
Tab. 1. Percento inhibície tvorby biofilmu *S. aureus* CCM 4223

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

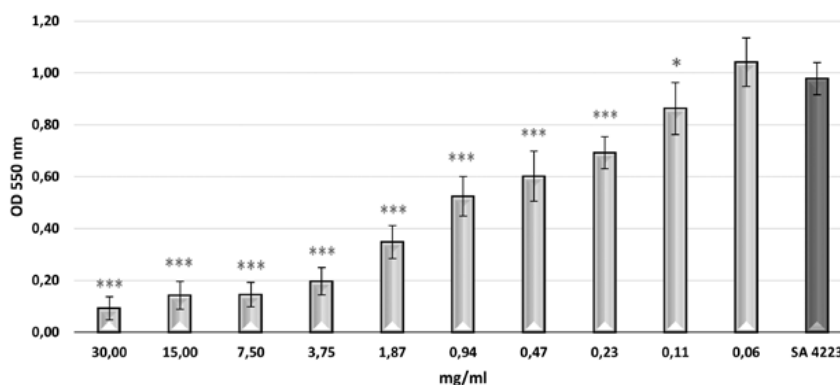
vania BS 3/22) pri koncentráciách od 30 – 0,11 mg/ml. BS 3/22 bol pri disperzii biofilmu *S. aureus* CCM 4223 účinný aj pri nižších koncentráciách v porovnaní s antiadhezívnou aktivitou, resp. inhibíciou tvorby biofilmu. Vysoké percento disperzie biofilmu (78 a viac %) bolo pozorované pri koncentráciách 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 aktivitou<sup>16)</sup>. Z rodiny lipopeptidov sú najznámejšie polymyxín A a polymyxín B produkované *Bacillus polymyxa*<sup>17)</sup>; surfaktín, iturín, fengycín, mykosubtilíny a bacillomycíny produkované *Bacillus subtilis*<sup>18)</sup>; pumilacidín produkovaný *Bacillus pumilus*<sup>19)</sup>; lichenyzín z *Bacillus licheniformis*<sup>20)</sup>; a viskozín z *Pseudomonas fluorescens*<sup>21)</sup>. Pokiaľ ide o glykolipidy, najlepšie sú preštudované rhamnolipidy z *Pseudomonas aeruginosa*<sup>22)</sup>, soforolipidy z *Candida bombicola*<sup>23)</sup> a manozylerytritolové lipidy z *Candida antarctica*<sup>24)</sup>.

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.<sup>25)</sup>, 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 baktérie<sup>26)</sup>. Liu et al.<sup>27)</sup> 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 hydrofóbná<sup>28)</sup>. Antiadhezívna aktivita BS už bola opísaná v predchádzajú-

júcich prácach, napríklad Janek et al.<sup>29)</sup> 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.<sup>30)</sup> 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.<sup>31)</sup> 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.<sup>32)</sup>, 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<sup>6, 31, 32)</sup>. Surfaktín izolovaný z *B. amyloliquefaciens* NS6 preukázal disperznú aktivitu voči vytvorenému biofilmu *Streptococcus mutans*, kedy pri najvyššej koncentrácii 80 mg/ml bolo percento disperzie  $62,2 \pm 7,1$  %<sup>6)</sup>. Meena et al.<sup>32)</sup> 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* ATCC19430<sup>31)</sup>. Disperzia biofilmu bola pravdepodobne vyvolaná odstránením extracelulárnych polymérnych látok (EPS) a deštrukciou mikrokolónii spôsobenou BS<sup>33)</sup>. EPS zohrávajú dôležitú úlohu v rezistencii biofilmu, pretože bránia kontaktu mikroorganizmov s antimikrobiálnou látkou<sup>34)</sup>.

## 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., Dalle 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.