

## PŮVODNÍ PRÁCE

**Biosurfaktanty a ich úloha v inhibícii biofilm tvoriacich patogénnych baktérií****Biosurfactants and their role in the inhibition of the biofilm-forming pathogens**

Karolína Englerová • Radomíra Nemcová • Eva Styková

Došlo 28. mája 2018 / Prijaté 10. júla 2018

**Súhrn**

Rezistencia patogénnych baktérií je v dnešnej dobe jedným z hlavných medicínskych problémov. Väčšina mikrobiálnych infekcií má základ v tvorbe biofilmov, ktoré sú významným rezervoárom patogénov. Táto práca sa zaoberá antibiofilmovou a antimikrobiálnou aktivitou biosurfaktantov z črevných laktobacilov a baktérií izolovaných zo vzoriek mora. Biosurfaktanty (BS) izolované z kmeňov *L. fermentum* 2I3, *L. fermentum* B2/6, *L. reuteri* SL16, *L. reuteri* B6/1, *S. luteola* 3/22, *Brevibacillus* sp. 4/9, *Brevibacillus* sp. 2/30 a *B. amyloliquefaciens* 1/6K signifikantne ( $p < 0,001$ ) inhibovali tvorbu biofilmu u *S. aureus* CCM 3953 a *P. mirabilis* CCM 7188, pričom výraznejšia inhibícia bola detegovaná v prípade BS morských baktérií oproti laktobacilovým BS. Výsledky naznačujú, že mechanizmus antibiofilmového efektu laktobacilových BS voči obidvom referenčným kmeňom je rovnaký a nie je výsledkom ich antimikrobiálneho pôsobenia. Naproti tomu, mechanizmus antibiofilmového efektu BS získaných z morských baktérií je pravdepodobne závislý od vlastností použitého referenčného kmeňa.

**KLúčové slová:** biosurfaktanty • biofilm • patogény • inhibícia

**Summary**

Resistance of pathogenic bacteria is currently one of the major medical problems. Most microbial infections are based on the formation of biofilms, which are a significant reservoir of pathogens. The aim of

this study is to determine the antibiofilm and antimicrobial activity of biosurfactants isolated from intestinal lactobacilli and marine bacteria. Biosurfactants (BS) isolated from the strains *L. fermentum* 2I3, *L. fermentum* B2/6, *L. reuteri* SL16, *L. reuteri* B6/1, *S. luteola* 3/22, *Brevibacillus* sp. 4/9, *Brevibacillus* sp. 2/30 and *B. amyloliquefaciens* 1/6K significantly ( $p < 0.001$ ) inhibited the biofilm formation of *S. aureus* CCM 3953 and *P. mirabilis* CCM 7188, with higher inhibition detected in BS of marine bacteria when compared to BS isolated from lactobacilli. The results suggest that the mechanism of the antibiofilm effect of BS isolated from lactobacilli against both the reference strains is the same and it is not the result of their antimicrobial action. In contrast, the mechanism of the antibiotic effect of BS isolated from marine bacteria probably depends on the properties of the indicator strain.

**Key words:** biosurfactants • biofilm • pathogens • inhibition

**Úvod**

Antibiotická rezistencia a nozokomiálne infekcie sa stávajú čoraz rozsiahlejším problémom súčasnej medicíny. Podiel na tejto situácii majú, okrem iného, aj biofilmy. Biofilmy umožňujú mikroorganizmom kolonizovať nielen tkanivá a orgány, ale aj rôzne medicínske nástroje a zariadenia, čím významne prispievajú k vzniku a šíreniu nozokomiálnych infekcií. Biofilm tvoriace mikroorganizmy sú charakteristické zvýšenou odolnosťou voči antimikrobiálnym a dezinfekčným látkam a schopnosťou odolávať imunitnému systému hostiteľa. ATB terapia biofilmových infekcií je veľmi náročná a mnohokrát nedostatočná, preto tieto infekcie majú dlhodobý, často návratný charakter<sup>1-4)</sup>. V celosvetovom meradle prevláda snaha o hľadanie nových prístupov, resp. cielených a racionálnych stratégií riešenia tejto problematiky bez rizika navodenia rezistencie. Stále aktuálnejšími a vyhľadávanejšími sú metódy využívajúce prírodné a bakteriálne bioaktívne látky, u ktorých možno pozorovať lepší profil aj z hľadiska toxicity, biodegradovateľnosti a ekologického dopadu<sup>5)</sup>.

PharmDr. Karolína Englerová (✉) • R. Nemcová  
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie  
Komenského 73, 041 81 Košice, SR  
e-mail: karolina.englerova@student.uvlf.sk

E. Styková  
Klinika koní, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, SR

Biosurfaktanty (BS) sú povrchovo aktívne zlúčeniny produkované rôznymi druhmi mikroorganizmov. Ich molekuly sú amfifilné, tvorené hydrofilnými a hydrofóbnymi oblasťami, ktoré spôsobujú agregáciu na rozhraní medzi kvapalinami rôznej polarity, ako je napríklad voda a uhlíkovodíky<sup>6)</sup>. BS majú schopnosť modifikovať povrchové vlastnosti a tým ovplyvniť príľnavosť mikroorganizmov. Tieto vlastnosti BS je možné využiť v oblasti antimikrobiálnej a antibiofilmovej aplikácie<sup>4)</sup>. V rámci terapeutickej praxe sa BS môžu použiť ako fungicídne, baktericídne, insekticídne, antivírusové a antiadhézne činidlá a inhibítory enzýmov<sup>7)</sup>.

Cieľom práce bola izolácia BS z črevných laktobacilov a baktérií získaných zo vzoriek mora a testovanie ich antibiofilmových a antimikrobiálnych vlastností voči biofilm tvoriacim referenčným kmeňom *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Proteus mirabilis* CCM 7188 v podmienkach *in vitro*.

## Experimentálna časť

### Materiál a metódi

#### Bakteriálne kmene

V práci boli použité kmene *Lactobacillus fermentum* 213, *Lactobacillus fermentum* B2/6, *Lactobacillus reuteri* SL16, *Lactobacillus reuteri* B6/1 izolované z trusu sliepky, bažanta a ošípanej a kmene *Sporosarcina luteola* 3/22, *Bacillus amyloliquefaciens* 1/6K, *Brevibacillus* sp. 2/30, *Brevibacillus* sp. 4/9 izolované z morskej vody a morského piesku. Ako referenčné biofilm tvoriace kmene boli použité kmene *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Proteus mirabilis* CCM 7188 (Česká zbierka mikroorganizmov, Masarykova univerzita, Brno, ČR).

#### Izolácia BS viazaných na bunky

Na izoláciu BS bola použitá modifikovaná metóda podľa Gudiňa a kol.<sup>8)</sup>. Laktobacily rástli na de Man-Rogosa-

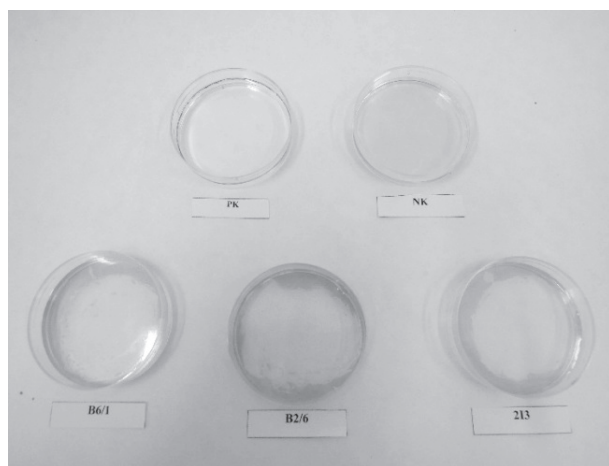
-Sharpe agare (MRS; pH 6.5; Carl Roth GmbH, Germany) v anaeróbných podmienkach (Gas Pak Plus, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, USA) 48 hodín pri 37 °C. Morské baktérie boli inkubované na Brain Heart Infusion agare (BHI; pH 7; HIMEDIA) v aeróbnom prostredí pri teplote 27 °C 48 hodín. Na prípravu štandardizovanej suspenzie testovaných kmeňov boli použité 3–4 solitárne kolónie, ktoré boli resuspendované v 5 ml fyziologického roztoku tak, aby vzniknutý zákal odpovedal 1. stupňu McFarland zákalovej stupnici. MRS bujón (50 ml) bol inokulovaný 0,5 ml štandardizovanej suspenzie kmeňov laktobacilov. Kmene boli inkubované aeróbnou 24 hodín pri 37 °C. Štandardizované suspenzie morských baktérií (0,5 ml) boli inokulované do 50 ml McKeen média (20 g/l glukóza; 5 g/l kyselina glutámová; 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,02 g/l MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g/l KCl; 1 g/l minerálny roztok: 0,5 g/l MnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 0,16 g/l CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O; 0,015 g/l FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; pH 7) a inkubované aeróbnou 24 hodín pri 27 °C v trepacom vodnom kúpeli (Julabo SW 2C, Labor Technik, Seelbach, Germany). Pomnožené kultúry boli centrifugované 45 minút, pri 4 °C a 4500 otáčkach/min. Supernatanty boli odstránené a premyté bunky boli resuspendované v 20 ml PBS (8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,42 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g/l KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4). Bunky boli dve hodiny jemne pretrepávané na orbitálnej trepačke (150 otáčok/min.) a následne centrifugované. Získané supernatanty boli sterilizované filtráciou cez mikrobiologické filtre s veľkosťou pórov 0,25 μm (Frisenette ApS, Denmark). Potom boli supernatanty dialyzované voči destilovanej vode (6–8 kDa, 4 °C, 72 h; D-Tube™ Dialyzer, Merck) za účelom odstránenia solí a iných komponentov a zlyofilizované.

#### Oil spreading test

Na meranie povrchovej aktivity BS bol použitý oil spreading test (test šírenia oleja) (obr. 1) podľa Morikawa a kol.<sup>9)</sup> s následnou modifikáciou: na povrch 10 ml destilovanej vody v Petriho miske (priemer 60 mm) bola pridaná kvapka ropy tak, aby sa na povrchu vody vytvorila tenká membrána. Na vytvorenú vrstvu ropy bolo opatrne napipetovaných 100 μl supernatantu získaného po pretrepaní bakteriálnych buniek v PBS. V pozitívnom prípade došlo vo vrstve ropy k vytvoreniu prečistenej zóny, ktorej priemer bol následne zmeraný. Ako pozitívna kontrola bol použitý detergent Tween 80 a ako negatívna kontrola PBS. Testovanie každého BS bolo uskutočnené v troch opakovaníach.

#### Antimikrobiálna a antibiofilmová aktivita BS

Efekt BS na rast a tvorbu biofilmu u referenčných kmeňov *S. aureus* CCM 3953 a *P. mirabilis* CCM 7188 bol sledovaný modifikovanou metódou podľa O'Toole a kol.<sup>10)</sup> nasledovne: získané množstvo BS (180 mg) bolo rozpustené v Tryptónovom sójovom bujóne (TSB; pH 7; Carl Roth GmbH, Germany) na výslednú koncentráciu 8,57 mg/ml. Štandardizovaná nočná kultúra referenčného kmeňa (Mc Farland 1) bola pridaná do takto pripraveného bujónu v pomere 100 : 1. Ako kontroly



Obr. 1. Oil spreading test (tvorba prečistenej zóny)  
PK – pozitívna kontrola, NK – negatívna kontrola

boli použité TSB s referenčným kmeňom bez BS a TSB s BS bez referenčného kmeňa. Do jamiek stripov (Greiner ELISA 8 Well Strips, Flat Bottom, Medium Binding; Cruinn Diagnostics Ltd., Dublin, Ireland) bolo pridaných 200 µl jednotlivých roztokov. Uzavreté stripy fixované v rámčekoch boli inkubované aeróbne v termostate 24 hodín pri teplote 37 °C. Po inkubácii bola zmeraná optická denzita (Synergy TM 4 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, USA) pri vlnovej dĺžke 570 nm za účelom hodnotenia rastu referenčných kmeňov v prítomnosti BS. Následne bol supernatant odsatý a jamky 3-krát premyté deionizovanou vodou a vysušené pri izbovej teplote. Po vysušení boli jamky ofarbené 0,1% roztokom kryštálovej violete (200 µl) a ďalej inkubované pri izbovej teplote 30 minút. Po odstránení prebytočného farbiva boli jamky 3-krát premyté deionizovanou vodou a vysušené pri izbovej teplote 30 minút. Kryštálová violet' naviazaná na adherované bunky (biofilm) bola extrahovaná 200 µl 95% etanolu. Optická denzita roztoku bola meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 570 nm. Na základe získaných hodnôt absorbcie bola za tvorbu biofilmu považovaná absorbcia vyššia ako 0,1. Kmene boli testované najmenej v troch nezávislých experimentoch, každý s 8 opakovaniami.

#### Štatistické vyhodnotenie

Pre vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednorozmerná analýza rozptylu (ANOVA) s doplnkovým Tukeyho testom v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 3.00.

#### Výsledky a diskusia

BS patria v súčasnosti k významným mikrobiálnym produktom, ktorých potenciálne využitie sa skúma v mnohých priemyselných a medicínskych odvetviach. Z toxikologického aj ekologického hľadiska predstavujú vhodnejšiu náhradu k aktuálne používaným syntetickým surfaktantom<sup>11</sup>. Vzhľadom na pomerne malé percento preskúmanej časti morských ekosystémov a tiež na extrémnejšie podmienky prostredia, ktorým sú baktérie v nich vystavené, sa predpokladá, že by morské baktérie mohli byť veľmi bohatým zdrojom nových BS. Navyše takto získané BS by mohli byť odolnejšie voči určitým vonkajším faktorom, akými sú napríklad teplota, salinita, hodnota pH alebo tlaku, ako BS získané z iných prírodných zdrojov. Predpokladá sa úzky vzťah medzi produkciou bioaktívnych metabolitov a procesmi adaptácie baktérií<sup>12</sup>.

Laktobacily produkujú rôzne metabolické produkty, ktoré majú antimikrobiálnu aktivitu, ako je napríklad kyselina mliečna, peroxid vodíka, bakteriocíny, bakteriocínové látky a tiež biosurfaktanty. Široká škála kmeňov *Lactobacillus* spp. produkuje rôzne typy BS<sup>13</sup>. Glykolipidy, lipopeptidy, látky podobné proteínu, fosfolipidy, masťné kyseliny a lipopolysacharidy produkované *Lactobacillus* spp. boli charakterizované viacerými výskumníkmi<sup>14–16</sup>. Jedným zo špecifických lipidových BS produkovaných

len kmeňmi *Lactobacillus* je surlaktín. Ten je svojím mechanizmom pôsobenia podobný rhamnolipidom produkovaným *Pseudomonas* spp. a surfaktinom produkovaným *Bacillus* spp.<sup>17</sup>.

Na testovanie a skrining mikroorganizmov tvoriacich BS boli vyvinuté a úspešne aplikované rôzne metódy. Niektorými sa testuje prítomnosť povrchovej a medzypovrchovej aktivity, iné sa využívajú na meranie týchto aktivít. Ďalšou skupinou testov sú testy založené na hydrofóbnosti bunkového povrchu. Sú to nepriame metódy a je nimi možná rýchla identifikácia BS. Avšak hydrofóbnosť baktérií závisí od fyziologických aspektov (rastové podmienky, vek buniek). Medzi špecifické testy zaradíme CTAB agar plate test a test na hemolýzu, pretože nepatria medzi testy všeobecného skriningu baktérií tvoriacich BS<sup>18</sup>.

Oil spreading test sa môže využiť ako kvalitatívna metóda<sup>19</sup>. Princíp tejto metódy je založený na schopnosti BS meniť kontaktný uhol na rozhraní voda – olej. Priemer vzniknutej vyčirenej zóny na povrchu oleja koreluje s aktivitou povrchovo aktívnej látky. Táto metóda je rýchla a ľahko realizovateľná, nevyžaduje špecializované zariadenia a je potrebný len malý objem vzorky. Môže sa použiť, ak je aktivita a množstvo BS nízke. BS sú produkované buď na povrchu buniek, alebo extracelulárne do prostredia<sup>20</sup>. V našej práci boli izolované a testované BS viazané na povrchu buniek, ktoré boli extrahované jemným pretrepávaním do PBS. BS získané z testovaných kmeňov laktobacilov a morských baktérií vykazovali povrchovú aktivitu (tab. 1). U BS kmeňov *S. luteola* 3/22, *Brevibacillus* spp. 4/9, *B. amyloliquefaciens* 1/6K, *L. reuteri* B6/1 a *L. fermentum* 2I3 boli zaznamenané zóny vyčirenia v rozmedzí od 49 do 58 mm. Tieto hodnoty boli porovnateľné s hodnotou zistenou pri pozitívnej kontrole Tween 80 (60 mm), čo poukazuje na vysoké povrchovo aktívne vlastnosti testovaných BS. Nižšiu povrchovú aktivitu (veľkosť zón 22–35 mm) preukazovali BS z kmeňov *Brevibacillus* spp. 2/30, *L. fermentum* B2/6 a *L. reuteri* SL16. Namerané hodnoty boli vyš-

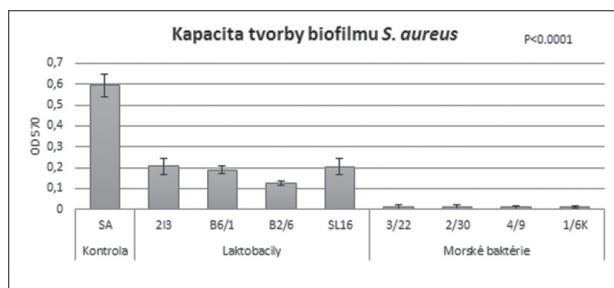
Tab. 1. Povrchová aktivita BS. Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer troch nameraných hodnôt ± smerodajná odchýlka

Kmene	Veľkosť zóny (mm)
<i>Lactobacillus reuteri</i> SL16	22,67 ± 1,25
<i>Lactobacillus fermentum</i> 2I3	45,67 ± 3,09
<i>Lactobacillus reuteri</i> B6/1	49,33 ± 0,47
<i>Lactobacillus fermentum</i> B2/6	26,67 ± 1,69
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 1/6K	49,00 ± 0,82
<i>Brevibacillus</i> sp. 4/9	54,33 ± 1,25
<i>Brevibacillus</i> sp. 2/30	35,67 ± 0,47
<i>Sporosarcina luteola</i> 3/22	58,00 ± 0,47

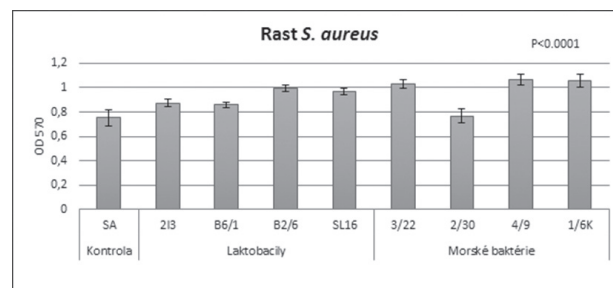
šie ako tie, ktoré zistil Fracchia a kol.<sup>21)</sup> pri testovaní 12 vzoriek *Lactobacillus* sp. izolovaných z rôznych druhov čerstvého ovocia a zeleniny. Všetky vzorky preukazovali povrchovú aktivitu s veľkosťami zón vyčerenia od 5 do 15 mm. Na koncentrácii závislá povrchová aktivita bola popísaná u BS izolovaného z *L. plantarum* CFR 2194 s veľkosťou zón od  $1,9 \pm 0,28$  do  $3,4 \pm 0,12$  mm<sup>14)</sup>, u BS z *L. rhamnosus* s veľkosťou zón od  $6,8 \pm 0,5$  do  $4,1 \pm 0,1$  mm a u BS z *L. jensenii* s veľkosťou zón od  $7,6 \pm 0,5$  do  $3,8 \pm 0,2$  mm<sup>20)</sup>. Supernatanty z pomnožených kultúr *Bacillus* sp. a *Pseudomonas* sp. vykazovali povrchovú aktivitu s veľkosťou zón 4,0 mm<sup>22)</sup>.

Po zistení existencie BS ako aktívnych produktov sa vedci zameriavali hlavne na ich antiadhezívnu a neskôr antimikrobiálnu aktivitu<sup>23)</sup>. Až Sambanthamoorthy a kol.<sup>20)</sup> ako prví popísali u BS získaných z bunkového povrchu kmeňov *L. jensenii* a *L. rhamnosus* výraznú antimikrobiálnu, antiadhezívnu a antibiofilmovú aktivitu voči *A. baumannii*, *E. coli* a *S. aureus* pri koncentrácii BS 50 mg/ml. Nami izolované BS inhibovali tvorbu biofilmu u testovaných referenčných kmeňov (obr. 2 a 3). Zaznamenali sme signifikantne nižšiu tvorbu biofilmu u kmeňa *S. aureus* CCM 3953 a *P. mirabilis* CCM 7188 oproti kontrole ( $p < 0,001$ ) v prítomnosti laktobacilových BS, ako aj BS získaných z morských baktérií. Pri porovnaní účinku jednotlivých BS, výraznejšia antibiofilmová aktivita ( $p < 0,001$ ) bola zaznamenaná u BS z morských kmeňov (s výnimkou účinku BS získaného z kmeňa *Bre-*

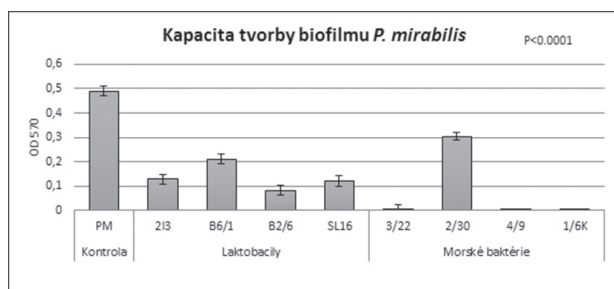
*vibacillus* sp. 2/30 voči *P. mirabilis* CCM 7188) oproti laktobacilovým BS. Antibiofilmová aktivita môže súvisieť s chemickou štruktúrou BS. Zatiaľ, čo laktobacily produkujú hlavne glykoproteíny, zástupcovia rodov *Bacillus* a *Brevibacillus* produkujú lipoproteíny s výraznou povrchovou aktivitou a antibiotickým potenciálom<sup>24)</sup>. Ciandrini a kol.<sup>25)</sup> pozorovali antibiofilmovú aktivitu BS izolovaných z *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* a *L. paracasei* voči *S. mutans* a *S. oralis*. Zistili, že pri koncentrácii 10 mg/ml bola inhibícia tvorby biofilmu takmer 100 %. V našej práci použitá koncentrácia 8,57 mg/ml v prípade laktobacilových BS inhibovala tvorbu biofilmu 70–80 % a v prípade väčšiny BS z morských baktérií takmer 100 %. Avšak existujú aj také práce, kde bola použitá nižšia koncentrácia BS s porovnateľnou antibiofilmovou aktivitou. BS surfaktín izolovaný z *B. subtilis* s koncentráciou 100 µg/ml inhiboval tvorbu biofilmu *E. coli* a *S. marcescens*<sup>26)</sup> a s koncentráciou 66 µg/ml rozrušil 6-dňový biofilm *L. pneumophila*<sup>27)</sup>. BS izolované z *B. pumilus* a ďalších morských baktérií inhibovali biofilm *P. aeruginosa* ATCC 10145 pri koncentrácii 100 µg/ml<sup>28)</sup>. Glykolipidový BS produkovaný baktériou *Brevibacterium casei* MSA19 pri koncentrácii 30 µg/ml odstránil vytvorené biofilmy patogénnych mikroorganizmov *C. albicans*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *V. parahaemolyticus*, *V. hareyi*, *V. alginolyticus*, *V. alcaligenes*, *V. vulnificus*, *Thalassomonas* sp., *Alteromonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudoalte-*



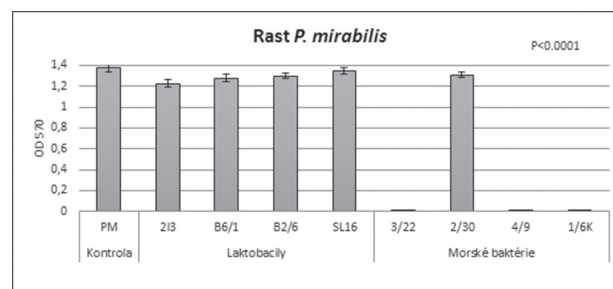
Obr. 2. Antibiofilmová aktivita BS ( $c = 8,57$  mg/ml) izolovaných z laktobacilov a morských baktérií voči *S. aureus* CCM 3953



Obr. 4. Vplyv BS ( $c = 8,57$  mg/ml) izolovaných z laktobacilov a morských baktérií na rast *S. aureus* CCM 3953



Obr. 3. Antibiofilmová aktivita BS ( $c = 8,57$  mg/ml) izolovaných z laktobacilov a morských baktérií voči *P. mirabilis* CCM 7188



Obr. 5. Vplyv BS ( $c = 8,57$  mg/ml) izolovaných z laktobacilov a morských baktérií na rast *P. mirabilis* CCM 7188

*romonas* sp. a *Ruegeria* sp.<sup>29)</sup>. Hassan a Mohammad<sup>30)</sup> v rámci svojej štúdie dokázali antibiofilmovú aktivitu lipopeptidových BS produkovaných *Bacillus cereus*. Na koncentrácii závislá inhibícia tvorby biofilmu bola pozorovaná pri gramnegatívnych baktériách (*P. aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*). Pri grampozitívnej baktérii *S. aureus* bola zistená najvyššia aktivita pri nižších koncentráciách a s ich zvyšovaním sa zaznamenal, naopak, pokles inhibície.

Exaktný mechanizmus antibiofilmového efektu nie je úplne objasnený. Najjednoduchší spôsob, ako vysvetliť antibiofilmovú aktivitu BS, by mohlo byť ich priame antimikrobiálne pôsobenie. Pravdepodobný mechanizmus antimikrobiálneho účinku je schopnosť BS interagovať s bunkovými membránami, vytvárať v nich póry, a tým viesť ku destabilizácii bunkového povrchu, narušeniu metabolických a transportných procesov a v konečnom dôsledku môžu spôsobiť až lýzu, čiže smrť bunky<sup>31)</sup>. Avšak, inhibícia rastu nebola pozorovaná vo všetkých prípadoch<sup>32,33)</sup>. Podobne bolo v našich experimentoch zistené, že BS negatívne neovplyvnili rast *S. aureus* CCM 3953 (obr. 4). Naopak, pozitívne ( $p < 0,001$ ) bol podporený jeho rast oproti kontrole, s výnimkou BS získaného z kmeňa *Brevibacillus* sp. 2/30. Tieto výsledky naznačujú, že nami zistený antibiofilmový efekt BS voči *S. aureus* CCM 3953 nie je pravdepodobne výsledkom antimikrobiálneho pôsobenia, ale môže súvisieť s antiadhezívnou aktivitou testovaných BS. Spôsob, akým BS ovplyvňujú interakcie medzi baktériou a povrchom (alebo interakcie bunka–bunka), je pravdepodobne úzko spätý so zmenami v povrchovom napätí a náboji bunkovej steny baktérie. BS môžu interagovať s fázovým rozhraním a ovplyvňovať adhéziu a odlúpnutie baktérií z povrchu. Interakcie BS s povrchom bunky a pevným substrátom závisí od chemických vlastností BS a povrchovej energie buniek a substrátu<sup>34)</sup>. Viacerí autori uvádzajú pozitívny účinok BS produkovaných laktobacilmi na inhibíciu adhézie patogénov na biomateriáloch a bunkových povrchoch<sup>12, 15, 35)</sup>. BS produkovaný *B. circulans* vykazoval antiadhezívnu aktivitu v koncentráciách medzi 0,1–10 mg/ml voči patogénom *E. coli*, *M. flavus*, *P. vulgaris*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *K. aerogenes*, *A. faecalis* a *S. Typhimurium*. Pri najvyššej testovanej koncentrácii (10 mg/ml) bola mikrobiálna adhézia inhibovaná v rozmedzí od 84–89 % a biofilm všetkých testovaných patogénnych mikroorganizmov bol odstránený<sup>36)</sup>. Obrázok 5 poukazuje na rozdielnosť vplyvu BS izolovaných z laktobacilov a morských baktérií na rast *P. mirabilis*. Zatiaľ, čo v prípade laktobacilových BS nebol inhibovaný jeho rast, BS morských baktérií, s výnimkou kmeňa *Brevibacillus* sp. 2/30, významne ( $p < 0,001$ ) inhibovali rast *P. mirabilis* oproti kontrole. Tieto výsledky korelujú s výsledkami Bernat a kol.<sup>37)</sup>, ktorí taktiež zistili antimikrobiálnu aktivitu BS izolovaných z *B. subtilis* voči gramnegatívnym uropatogénnym kmeňom *E. coli*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *C. freundii*. Naproti tomu, Das a kol.<sup>38)</sup> zistili, že BS izolovaný z *B. circulans* neselektívne inhiboval rast grampozitívnych aj gramne-

gatívnych bakteriálnych kmeňov. To je do značnej miery protichodné aj s predchádzajúcimi štúdiami o antimikrobiálnych účinkoch BS, pri ktorých sa uvádza, že lipopeptidové BS sú aktívne väčšinou proti grampozitívnym baktériám<sup>39, 40)</sup>.

## Záver

Dosiahnuté výsledky poukazujú na možný antibiofilmový potenciál BS získaných z črevných laktobacilov a baktérií izolovaných zo vzoriek mora. Bola potvrdená ich povrchová aktivita a schopnosť inhibovať tvorbu biofilmov patogénnych baktérií. Za biofilm-inhibičný efekt BS je pravdepodobne zodpovedný tak antimikrobiálny, ako aj antiadhezívny účinok testovaných BS, ktorý sa zdá byť závislý od typu BS a vlastností cieľovej mikrobiálnej bunky. Ďalšie štúdie si budú vyžadovať objasnenie mechanizmu antibiofilmového efektu aj na molekulárnej úrovni so zameraním na posúdenie zmien v expresii génov zodpovedných za syntézu bakteriálnych faktorov zapojených do procesu tvorby biofilmov.

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

Stret záujmov: žiadny.

## Literatúra

1. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms, survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15, 167–193.
2. Kurtz S., et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. J. Bone Joint Surg. Am. 2007; 89, 780–785.
3. Hamilton H., Jamieson J. Deep infection in total hip arthroplasty. Can. J. Surg. 2008; 51, 111–117.
4. Fracchia L., et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. AIMS Bioeng. 2015; 2, 144–162.
5. Chung P. Y., Toh Y. S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. Pathog. Dis. 2014; 70, 231–239.
6. Jennings E. M., Tanner R. S. Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research. 2000; 306, 299–306.
7. Rangarajan V., Ramkrishna S. An inexpensive strategy for facilitated recovery of metals and fermentation products by foam fractionation process. Colloids Surf. B. 2013; 104, 99–106.
8. Gudiña E. J., et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. Lett. Appl. Microbiol. 2010; 50(4), 419–424.
9. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. Biochim. Biophys. Acta 2000; 1488, 211–218.
10. O'Toole G. A. et al. Genetic approaches to study of biofilms. Methods Enzymol. 1999; 310, 91–109.
11. Santos D. K. F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17, 401.
12. Gudiña E. J., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. Mar. Drugs. 2016; 14, E38.

13. **Satpute S. K., et al.** Multiple roles of biosurfactants in biofilms. *Curr. Pharm. Des.* 2016; 22, 429–448.
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, 1777–1789.
15. **Sharma D., et al.** Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *The Scientific World J.* 2014; 1–9.
16. **Moldes A. B., et al.** Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *BioMed. Res. Int.* 2013; 1–9.
17. **Satpute S. K., et al.** Biosurfactants from *Lactobacilli* species: properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.* 2016; 56, 1–13.
18. **Walter V., Syldatk C., Hausmann R.** Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 672, 1–13.
19. **Plaza G. A., Zjawiony I., Banat I. M.** Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Petrol. Sci. Eng.* 2006; 50, 71–77.
20. **Sambanthamoorthy K. et al.** Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.* 2014; 14(1), 197.
21. **Fracchia L., et al.** *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. In: Mendez Vilas A (ed.) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*; Spain, 2010; 827–837.
22. **Femi-Ola T. O., et al.** Isolation and screening of biosurfactant bacteria from soil contaminated with domestic waste water. *Brit. J. Environ. Sci.* 2015; 3(1), 58–63.
23. **Lin S.** Biosurfactants: Recent advances. *J. Chem. Tech. Biotech.* 1996; 66(2), 109–120.
24. **Rodrigues L., et al.** Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57(4), 609–618.
25. **Ciandrini E., et al.** Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 100(15), 6767–6777.
26. **Moryl M., et al.** Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochim. Pol.* 2015; 62(4), 725–732.
27. **Loiseau C., et al.** Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(12), 5083–5093.
28. **Padmavathi A. R., Pandian S. K.** Antibiofilm activity of biosurfactant producing coral associated bacteria isolated from Gulf of Mannar. *Indian J. Microbiol.* 2014; 54(4), 376–382.
29. **Kiran G. S., Sabarathnam B., Selvin J.** Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; 59, 432–438.
30. **Hassan S. S., Mohammad F. R.** Effect of biosurfactant extracted from *Bacillus* sp. on biofilm formation by some pathogenic bacteria. *World J. Exp. Biosci.* 2015; 3, 139–145.
31. **Carrillo C., et al.** Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1611(1), 91–97.
32. **Vesterlund S., et al.** *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology* 2006; 152, 1819–1826.
33. **Walenccka E., et al.** The Influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol.* 2008; 53, 61–66.
34. **Banat I. M., De Rienzo M. A. D., Quinn G. A.** Microbial biofilms: Biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 98, 9915–9929.
35. **Saravanakumari P., Mani K.** Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresour. Technol.* 2010; 101(22), 8851–8854.
36. **Das P., Mukherjee S., Sen R.** Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surf. B.* 2009; 71(2), 183–186.
37. **Bernat P. et al.** Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 32(10), 157.
38. **Das P., Mukherjee S., Sen R.** Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104, 1675–1684.
39. **Kitamoto D., et al.** Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.* 1993; 29, 91–96.
40. **Singh P., Cameotra S. S.** Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* 2004; 22, 142–146.