



Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2022

21. dubna 2022

Editor: Olga Maťátková

Praha 2022

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Patronát: Česká společnost chemická

Přípravný a organizační výbor:

doc. Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

doc. Ing. Olga Maťátková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani odbornou úpravou. Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022

ISBN 978-80-7592-136-9

Obsah

Faktory virulence u <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Metody sledování tvorby biofilmu vláknitých mikromycet	13
Charakterizace nanočástic stříbra a jejich antibiofilmové účinky vůči <i>Candida albicans</i>	20
Siderofory aneb aktivní složka biopesticidního preparátu	27
Charakterizace extraktů <i>Vitis vinifera</i> a jejich vliv na zástupce mikroorganismů trávicího traktu	36
Metody zelené syntézy nanočástic kovů	42

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Faktory virulence u *Staphylococcus aureus*

Virulence factors in *Staphylococcus aureus*

E. Kroupová, P. Kašparová, O. Mat'átková, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Bakterie *S. aureus* vyvinula řadu regulačních systémů, pomocí kterých kontroluje produkci virulenčních faktorů. Virulenční faktory umožňují bakterii napadnout, přežít a množit se v hostiteli. Virulenční faktory lze rozdělit do dvou skupin: adhesivní neboli povrchové a extracelulární. Exprese virulenčních faktorů *S. aureus* je regulována systémem quorum sensing, konkrétně operonem *agr* (accessory gene regulator). V případě nízké bakteriální buněčné hustoty je stimulována exprese adhesivních faktorů a dochází k následné kolonizaci hostitelovy tkáně. Pokud je buněčná hustota vysoká, dochází k invazi tkání a produkci hydrolytických enzymů a toxinů jakožto extracelulárních virulenčních faktorů.

Abstract

The bacterium *S. aureus* has developed a number of regulatory systems by which it controls the production of virulence factors. Virulence factors enable the bacterium to invade, survive and multiply in the host. Virulence factors can be divided into two groups: adhesive or surface and extracellular. The expression of *S. aureus* virulence factors is regulated by the quorum sensing system, specifically by the *agr* operon (accessory gene regulator). In the case of low bacterial cell density, the expression of adhesive factors is stimulated and subsequent colonization of the host tissue occurs. If cell density is high, tissue invasion and production of hydrolytic enzymes and toxins as extracellular virulence factors occur.

Klíčová slova: biofilm; quorum sensing; adhesivní proteiny; exotoxiny

Key words: biofilm; quorum sensing; adhesive proteins; exotoxins

Povrchové virulenční faktory *S. aureus*

Skupina adhesivních faktorů virulence *S. aureus* zahrnuje především povrchové proteiny kovalentně vázané k peptidoglykanu v buněčné stěně označované jako CWA proteiny (cell wall-anchored proteins). *S. aureus* produkuje 24 odlišných CWA proteinů, které lze dále klasifikovat do 4 skupin na základě jejich struktury a funkce (Foster a kol., 2014).

Nejznámější skupinou jsou tzv. MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) (Foster, Geoghegan, Ganesh and Höök, 2014). MSCRAMM proteiny interagují s proteiny extracelulární matrix, především fibronectinem, fibrinogenem, kolagenem a jinými. Kolagen je extracelulární skleroprotein nerozpustný ve vodě, který se podílí na podpoře struktury tkání, slouží jako lešení pro podporu extracelulární matrix ECM a také je schopen ovlivňovat buněčné chování přímo skrze buněčné receptory (Madani a kol., 2017). Pro kolagen je typická helixová struktura skládající se z opakujících se sekvencí obsahujících především aminokyselinu glycin a prolin (Patti a kol., 1993). Mnoho bakterií produkuje kolagenové adhesiny, které se na tuto strukturu vážou, mezi tyto bakterie řadíme i bakterii *S. aureus*, u které tento adhesin označujeme Cna (collagen adhesin). Cna se tak významně účastní patogeneze *S. aureus*. Tento adhesivní virulenční faktor způsobuje například endokarditidu (Madani, Garakani and Mofrad, 2017). Do skupiny MSCRAMM proteinů dále řadíme virulenční faktor ClfA (clumping factor A). ClfA je protein skládající se ze dvou domén, který je schopen navázat fibrinogen. Fibrinogen (Fg) je glykoprotein krevní plazmy o molekulové hmotnosti 340 kDa. Fg má klíčovou roli v homeostázi a koagulaci. Fg je složen ze šesti polypeptidových řetězců: struktura obsahuje dva α , dva β a dva γ řetězce. Právě ke γ řetězci se *S. aureus* váže pomocí ClfA faktoru (Deivanayagam a kol., 2002). Dále byly identifikovány další proteiny z MSCRAMM skupiny, a to FnbpA a FnbpB neboli fibronectin vázící proteiny A a B. Bylo zjištěno, že se na Fg váží stejně jako faktor ClfA, čili na C-konec γ řetězce (Wann a kol., 2000). Do MSCRAMM skupiny dále patří Sdr proteiny (serine-aspartate repeat proteins), v jejich struktuře nalezneme opakující se dipeptidové úseky aminokyselin serinu a aspartátu. Mezi Sdr patří SdrC, SdrD a SdrE typy proteinů. SdrC rozeznává sekvenci na neuronálním proteinu β -neurexinu a váže se na něj pomocí C-konce řetězce. β -neurexin je tedy ligandem pro SdrC protein. Neurexiny jsou molekuly buněčné adheze v nervové tkáni a ačkoli biologický význam interakce SdrC- β -neurexin není znám, je možné, že tato vazba by mohla způsobovat indukci intracelulární signalizace nebo narušovat vazby neuroliginů na neurexiny. (Barbu a kol., 2010, Liu a kol., 2015).

Druhou skupinou CWA proteinů jsou NEAT (near iron transporter) proteiny zahrnující IsdA (iron-regulated surface protein A), který je schopen navázat se například na hem či fibrinogen. Podstata mechanismu účinku IsdA spočívá v adsorpci hemu a příjmu železa. Poté se *S. aureus* může navázat na epiteliální buňky. Kromě IsdA sem řadíme ještě proteiny IsdB a IsdH, které mají obdobný účinek (Foster, Geoghegan, Ganesh and Höök, 2014).

Třetí skupinou CWA proteinů jsou tři helixové svazky (three-helix bundle). Mezi tyto proteiny patří protein A, který se může vázat na imunoglobuliny (IgG, IgM). Protein A tak působí inhibici imunitního systému hostitele (Foster, Geoghegan, Ganesh and Höök, 2014).

Poslední skupinou jsou G5-E proteiny zahrnující *S. aureus* povrchový protein A (SasG). Ligand, ke kterému je SasG komplementární, není znám, avšak mechanismem účinku je adheze k epiteliálním buňkám stejně jako u proteinu IsdA (Foster, Geoghegan, Ganesh and Höök, 2014).

Extracelulární virulenční faktory *S. aureus*

S. aureus kromě adhesivních virulenčních faktorů produkuje také mnoho extracelulárních toxinů (exotoxinů) a enzymů. Dosud bylo popsáno 40 různých exotoxinů, které však ve většině případů plní podobné funkce. Bližší pohled na danou problematiku ukazuje, že každý z těchto 40 exotoxinů má zcela unikátní vlastnosti. Exotoxiny produkované *S. aureus* můžeme rozdělit do tří skupin: cytotoxiny, superantigeny a extracelulární (cytotoxické) enzymy (TamaTorres, 2019).

Cytotoxiny působí na buněčné membrány hostitele. Výsledkem tohoto cílení je lyze napadených buněk, například erytrocytů či leukocytů, a následný vznik zánětu. Superantigeny způsobují vyšší produkci cytokinů, pomocí nichž jakožto signálních molekul je následně spuštěna proliferace T-lymfocytů a B-lymfocytů, a tak je způsobena odezva imunitního systému hostitele. Poslední zmíněné, tedy cytotoxické enzymy, působí destrukci savčích buněk. Lze tedy říci, že výše zmíněné extracelulární virulenční faktory *S. aureus* inhibují přirozené fungování imunitního systému hostitele a zapříčiňují tak celou řadu infekcí (TamaTorres, 2019).

Nejprostudovanějším cytotoxinem je α -toxin nazývaný též jako α -hemolysin (pro jeho označení se také používá zkratka Hla). Hla je kódován stejnojmenným genem *hla*, který je součástí monocistronního operonu *S. aureus*. Monomerní podjednotky Hla vytvářejí heptamerní β -barelové struktury, které jsou umístěné v plazmatické membráně, kde následně tvoří póry. Takto může docházet k lyzi buňky (BerubeaBubeck Wardenburg, 2013). Tvorbě β -

barelu předchází konformační změna tzv. prepóru ve struktuře toxinu. K této konformační změně dochází mutací His-35 (Valeva a kol., 1997). V roce 2010, Wilke a kol. (2010) identifikovali protein ADAM-10 jako receptor plazmatické membrány, na který je α -toxin schopen se vázat, což vysvětluje specifitu vazby u zkoumaných druhů (Wilke a Bubeck Wardenburg, 2010).

Stafylokokokové superantigeny jsou rozšířenou skupinou exotoxinů. Superantigeny *S. aureus* (SAGs) patří mezi neglykosylované nízkomolekulární exotoxiny. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 19-30 kDa. SAGs produkují všechny kmeny *S. aureus*, které působí jako lidské patogeny. SAGs *S. aureus* jsou velmi odolné vůči teplu, vysoušení, žaludečním kyselinám a proteolýze (nelze je například rozštěpit pepsinem či trypsinem) (Spaulding a kol., 2013). Kmeny bakterie *S. aureus* jsou schopny produkovat 1 až 23 SAGs z 24 identifikovaných stafylokokových superantigenů, mezi které řadíme například TSST-1 superantigen (toxin syndromu toxického šoku) nebo enterotoxiny *S. aureus* (SEs) (Dinges a kol., 2000).

Poslední skupinou zde uvedených extracelulárních virulenčních faktorů jsou extracelulární enzymy. *S. aureus* produkuje 10 hlavních proteolytických extracelulárních enzymů. Tyto enzymy zahrnují metaloproteasy, mezi které patří i studované gelatinasy, serinové proteasy, cysteinové proteasy či staphopain B (SspB). Zmíněné exoenzymy štěpí specifické hostitelovy proteiny. Například SspB je schopen degradovat fibronektin nebo fibrinogen, a také může napomáhat k šíření této bakterie (Kolar a kol., 2013). Vylučované proteasy *S. aureus* mohou též štěpit těžké řetězce imunoglobulinů, a tak narušovat imunitní systém hostitele (McGavin a kol., 1997). *S. aureus* produkuje také enzymy fosfolipázy a lecithinasy. Fosfolipid lecithin je součástí biologických membrán, a právě enzymy lecithinasy, které tato bakterie produkuje, mají schopnost lecithin degradovat a přispět tak k lyzi buňky. Lecithinasy tak mohou poškodit například tkáň reprodukčního traktu, dále mohou způsobovat hemolýzu (Sharaf a kol., 2014).

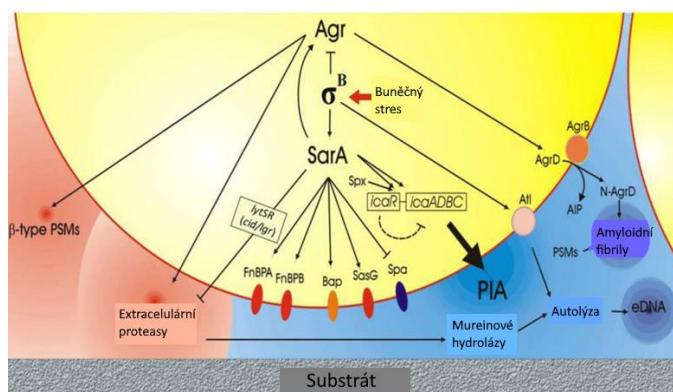
Významným virulenčním faktorem bakterie *S. aureus* je také karotenoid stafyloxantin, který vykazuje antioxidační účinky, a tak bakteriální buňky chrání před oxidačním stresem způsobeným vnějšími vlivy (Clauditz a kol., 2006).

Tvorba biofilmu *S. aureus*

Tvorbu biofilmu *S. aureus* můžeme také řadit mezi jeden z virulenčních faktorů, jelikož se podílí na patogenitě této bakterie. *S. aureus* není jedinou bakterií, která biofilm tvoří, obecně jsou bakteriální buňky schopny přichytit se na různé povrchy, kde začnou tvořit buněčné

shluky, které jsou obalené v hydratované matrix složené z látek, které buňky samy vyprodukovaly. A právě takové uskupení se nazývá biofilm (Costerton a kol., 1999, MoormeieraBayles, 2017). Tyto bakteriální shluky mohou být přichyceny buď k biotickému či abiotickému povrchu (Resch a kol., 2005). Zmíněná matrix, ve které jsou buňky obalené se označuje extracelulární matrix pod zkratkou ECM a skládá se z proteinů, sacharidů a extracelulární DNA (eDNA) (Branda a kol., 2005).

Tvorba biofilmu probíhá celkem ve čtyřech fázích. Poté, co dojde k přichycení buněk k danému substrátu (povrchu), dojde k rozšíření bakteriálních mikrokolonií. Následuje maturace neboli zrání těchto mikrokolonií v jednotný biofilm. Poslední fází je oddělení buněk a rozšíření kolonií na jiných odlehlých místech, tato fáze je zvaná také jako disperze (ShuklaaRao, 2017). Bylo potvrzeno, že tato schopnost bakterií tvořit biofilm se podílí na vzniku a rozvoji mnoha infekčních onemocnění. *S. aureus* je schopen kolonizovat lidskou kůži a je častým zdrojem tvorby biofilmu na lékařských implantátech. Takto kontaminované medicínské nástroje jsou v nemocnicích častým problémem. Tyto infekce, které často vedou k život ohrožujícím stavům, se souhrnně označují jako nozokomiální a byly krátce popsány v kapitole 2.1.2 (Donlan, 2001). Při primární adhezi (první fázi tvorby biofilmu) se uplatňují adhesivní povrchové molekuly, které se označují zkratkou MSCRAMM, tyto molekuly byly již zmíněny v kapitole 2.1.3.1 (ListeraHorswill, 2014).

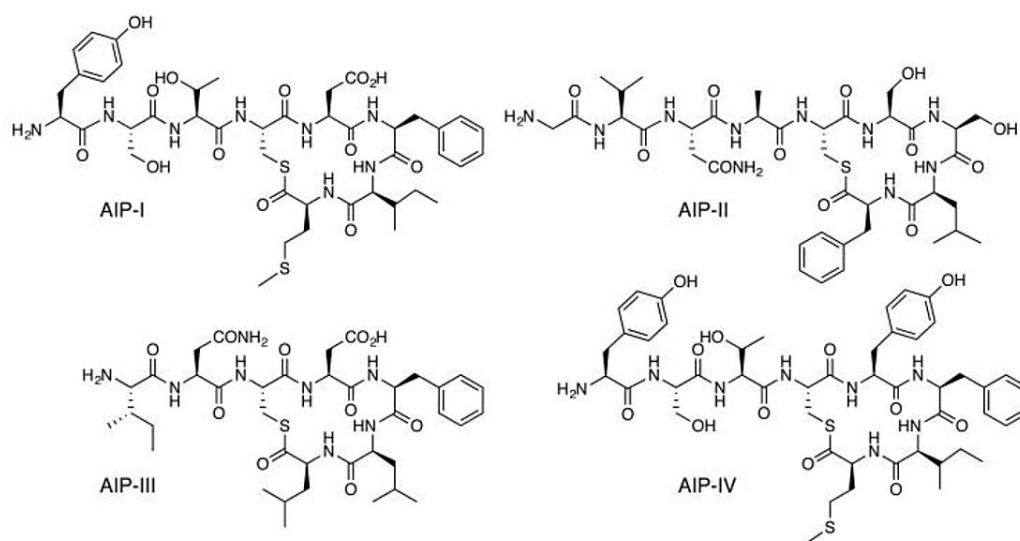


Obr. 1 Komplexní schéma interakcí podílejících se na tvorbě biofilmu *S. aureus*. Pravá strana obrázku ilustruje anabolickou fázi tvorby biofilmu s produkcí extracelulárních polymerních látek včetně polysacharidového mezibuněčného adhesinu (PIA), extracelulární DNA (eDNA) a amyloidních fibril. Střed obrázku ukazuje proteinové membránové komponenty, které se podílejí na tvorbě biofilmu (tyto složky jsou FnBPA, FnBPB, Bap, SasG a Spa). Na levé straně obrázku jsou vidět látky podílející se na rozpadu extracelulární biofilmové matrix (PSMs a extracelulární proteasy). Agr quorum sensing systém, σ^B faktor a SarA jsou zde vyobrazeny jako centrální regulátory, které řídí bakteriální chování v reakci na stresové faktory, buněčnou hustotu a buněčný cyklus bakterie *S. aureus* ((Arciola, Campoccia, Ravaoli and Montanaro, 2015)

Extracelulární matrix (ECM), která tvoří podstatnou část architektury biofilmu *S. aureus*, je složena z extracelulárních polymerních látek (EPS), především z polysacharidového mezibuněčného adhesinu (PIA), eDNA, proteinů a amyloidních fibril. PIA je částečně deacetylovaný protein s pozitivním nábojem, jehož syntéza je zprostředkována expresí *icaADBC* operonu (Arciola a kol., 2015).

Systém quorum sensing *S. aureus*

Quorum sensing systém (QS) je typem komunikace mezi bakteriálními buňkami *S. aureus* a zprostředkovává tak buněčnou regulaci pomocí signálních molekul zvaných autoinduktory (Obr. 2). Quorum sensing systém tedy závisí na tvorbě, uvolňování a akumulaci těchto signálních molekul. Jeden ze systémů quorum sensing bakterie *S. aureus* se nazývá agr systém a je centrem regulace exprese virulenčních faktorů včetně tvorby biofilmu. Dalším způsobem buněčné komunikace *S. aureus* je systém luxS, který se také podílí na tvorbě biofilmu (LeaOtto, 2015). Systém agr je řízen autoinduktorovým peptidem AIP v jehož struktuře nalezneme thiolaktonový kruh a exocyklickou strukturu na N-konci tohoto peptidu (Kim a kol., 2017).



Obr. 2 Strukturní vzorce čtyř autoindukčních peptidů (AIP) *S. aureus* (Tal-Gan a kol., 2013)

Obecně se systém QS *Staphylococcus* podílí také na tvorbě již zmíněného biofilmu. Na rozdíl od bakterie *S. epidermidis* se však agr QS systém *S. aureus*, resp. jeho produkty, nepodílejí na počáteční adhezi tedy první fázi tvorby biofilmu, kdy dochází ke vzniku fyzikálně-chemických interakcí mezi buňkami a povrchem. Systém agr *S. aureus* se podílí na uvolnění buněk ze zralého biofilmu a jejich disperzi a možnosti adherovat na jiných místech v organismu. Za toto oddělení v poslední fázi tvorby biofilmu jsou zodpovědné molekuly PSMs, jejichž

tvorba je podmíněna právě systémem agr. Schopnost PSMs způsobit oddělení buněk z biofilmu je přisuzována jejich amfipatické povaze. Regulací agr QS systému naopak inhibicí produkce molekul PSMs dochází k tvorbě tlustšího a odolnějšího biofilmu (Kong a kol., 2006). V cílení proti tvorbě biofilmu mohou být uvažovány dvě strategie. První možností je aplikace látek s antiagregačním účinkem vůči biofilmovému uspořádání. Jedná se například o enzymy, které by štěpily PNAG, eDNA nebo například proteinkinasu K. Druhou možností je tzv. quorum quenching, což by znamenalo zasahování do buněčné komunikace a tím podporu planktonického stadia oproti přisedlé formě života v podobě biofilmu. Zasahování do systému quorum sensing je proto diskutovanou strategií boje proti biofilmovým infekcím *S. aureus* (Arciola, Campoccia, Ravaioli and Montanaro, 2015).

Literatura

- Arciola C. R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, str. 7-7.
- Barbu E. M., Ganesh V. K., Gurusiddappa S., Mackenzie R. C., Foster T. J., Sudhof T. C., Höök M. (2010) beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS Pathog*, 6 (1), str. e1000726-e1000726.
- Berube B. J., Bubeck Wardenburg J. (2013) *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)*, 5 (6), str. 1140-1166.
- Branda S. S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1), str. 20-26.
- Clauditz A., Resch A., Wieland K.-P., Peschel A., Götz F. (2006) Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun*, 74 (8), str. 4950-4953.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284 (5418), str. 1318-1322.
- Deivanayagam C. C. S., Wann E. R., Chen W., Carson M., Rajashankar K. R., Höök M., Narayana S. V. L. (2002) A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *EMBO J*, 21 (24), str. 6660-6672.
- Dinges M. M., Orwin P. M., Schlievert P. M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13 (1), str. 16-34.
- Donlan R. M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*, 7 (2), str. 277-81.
- Foster T. J., Geoghegan J. A., Ganesh V. K., Höök M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*, 12 (1), str. 49-62.
- Kim M. K., Zhao A., Wang A., Brown Z. Z., Muir T. W., Stone H. A., Bassler B. L. (2017) Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nat Microbiol*, 2, str. 17080-17080.
- Kolar S. L., Ibarra J. A., Rivera F. E., Mootz J. M., Davenport J. E., Stevens S. M., Horswill A. R., Shaw L. N. (2013) Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiologyopen*, 2 (1), str. 18-34.
- Kong K.-F., Vuong C., Otto M. (2006) *Staphylococcus quorum* sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (2), str. 133-139.

- Le K. Y., Otto M. (2015) Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology*, 6, str. 1174-1174.
- Lister J. L., Horswill A. R. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, str. 178-178.
- Liu H., Lv J., Qi X., Ding Y., Li D., Hu L., Wang L., Yu F. (2015) The carriage of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among *Staphylococcus aureus* lineages. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19 (5), str. 498-502.
- Madani A., Garakani K., Mofrad M. R. K. (2017) Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PLoS One*, 12 (6), str. e0179601-e0179601.
- McGavin M. J., Zahradka C., Rice K., Scott J. E. (1997) Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun*, 65 (7), str. 2621-2628.
- Moormeier D. E., Bayles K. W. (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*, 104 (3), str. 365-376.
- Patti J. M., Boles J. O., Höök M. (1993) Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 32 (42), str. 11428-35.
- Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Götz F. (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 71 (5), str. 2663-2676.
- Sharaf E. F., El-Sayed W. S., Abosaif R. M. (2014) Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8 (3), str. 207-215.
- Shukla S. K., Rao T. S. (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J Med Res*, 146 (Supplement), str. S1-S8.
- Spaulding A. R., Salgado-Pabón W., Kohler P. L., Horswill A. R., Leung D. Y. M., Schlievert P. M. (2013) Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 26 (3), str. 422-447.
- Tal-Gan Y., Ivancic M., Cornilescu G., Cornilescu C. C., Blackwell H. E. (2013) Structural characterization of native autoinducing peptides and abiotic analogues reveals key features essential for activation and inhibition of an AgrC quorum sensing receptor in *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society*, 135 (49), str. 18436-18444.
- Tam K., Torres V. J. (2019) *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr*, 7 (2), str. 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- Valeva A., Palmer M., Bhakdi S. (1997) Staphylococcal α -Toxin: Formation of the Heptameric Pore Is Partially Cooperative and Proceeds through Multiple Intermediate Stages. *Biochemistry*, 36 (43), str. 13298-13304.
- Wann E. R., Gurusiddappa S., Hook M. (2000) The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem*, 275 (18), str. 13863-71.
- Wilke G. A., Bubeck Wardenburg J. (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (30), str. 13473-13478.

Metody sledování tvorby biofilmu vláknitých mikromycet **Methods for monitoring biofilm formation of filamentous fungi**

M. Kulišová, L. Majerová, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Tvorba biofilmu je jednou z nejvíce rozšířených strategií přežití mikroorganismů. Mimo bakterie a kvasinky tvoří biofilm i mikroskopické vláknité houby. Tento typ biofilmů je do dnešního dne velmi málo prozkoumanou problematikou, i když jsou vláknité houby velmi dobře uzpůsobeny tvorbě biofilmů, které mohou způsobovat problémy v řadě průmyslových odvětví. Metody kultivace biofilmů jsou různorodé, řadí se sem jak dynamické, tak statické metody. V laboratorním prostředí jsou velmi často využívány mikrotitrační destičky, které umožňují testování velkého množství vzorků za využití minima rozpouštědel. Mezi další metody patří The Calgary device, Robinson device či využití biofilmových reaktorů.

Abstract

Biofilm formation is one of the most widespread survival strategies of microorganisms. In addition to bacteria and yeast, the biofilm could be also formed by microscopic filamentous fungi. This type of biofilm is still very little explored by researchers, although filamentous fungi are very well adapted to biofilm formation, which can cause problems in many industries. Biofilm cultivation methods are diverse, including both dynamic and static methods. In the laboratory experiments, microtiter plates are very often used, which allow testing of many samples using a minimum of solvents. Other methods include The Calgary device, Robinson device or the use of biofilm reactors.

Klíčová slova: biofilm, vláknité mikromycety, mikrotitrační deska, biofilmové reaktory

Keywords: biofilm, filamentous fungi, microtiter plate, biofilm reactors

Metody tvorby biofilmu mikromycet

Metody kultivace biofilmu in vitro jsou děleny na statické a dynamické. Oba typy metod lze použít pro sledování adheze, uvolňování buněk nebo pro testování odolnosti vůči působení antimikrobiálních a dezinfekčních látek. Při použití statických metod nelze sledovat maturaci biofilmu. Dynamické metody napodobují podmínky kontinuálního proudění, které se přirozeně vyskytuje v životním prostředí, průmyslu nebo lidském těle. In vivo modely nejsou používány příliš často z důvodu nesnadné kontroly stavu v průběhu experimentů a z možných etických problémů (Cattò a Cappitelli, 2019; Franklin a kol., 2015; I. B. Gomes a kol., 2018).

Christensenova zkumavková metoda

Patří mezi nejstarší metody stanovující tvorbu biofilmu, která byla navržena pro ověření schopnosti tvorby biofilmu bakterie *Staphylococcus epidermis* (Christensen a kol., 1985). Tato metoda se stala základem pro vyhodnocování dalších metod stanovující nárůst biofilmu (Hassan a kol., 2011).

Jednotlivé kroky této metody jsou lehce proveditelné. Do sterilní zkumavky je nalito sterilní médium, které je následně inokulováno jedním druhem mikroorganismu. Po určité době je médium ze zkumavky vylito. Obsah zkumavky je nabarven safraninem nebo trypanovou modří. Pokud se na stěnách zkumavky vytvoří barevné linie, daný mikroorganismus je klasifikován jako biofilm-pozitivní, v opačném případě se jedná o biofilm-negativní mikroorganismus (Christensen a kol., 1985; Kırmusaoğlu, 2019).

Mikrotitrační destička

Nejčastěji používanou metodou pro sledování biofilmu je kultivace mikrobiální biomasy na mikrotitrační destičce. Biofilm se vytváří na stěnách a na dnech jamek (nejběžnější 96jamkové mikrotitrační destičky) nebo může růst na povrchu speciálně vloženého materiálu na dno jamek (nejběžnější 6, 12, 24jamkové mikrotitrační destičky) (L. C. Gomes a kol., 2014).

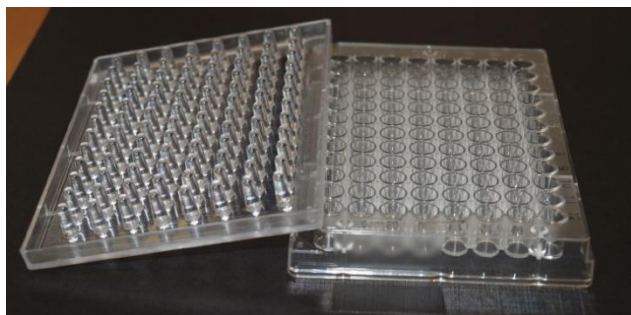
Tato technika má velké množství výhod, mezi které se řadí malé množství reagentů při použití dražších látek, možnost testování velkého množství vzorků najednou nebo relativní cenová dostupnost a jednoduchost provedení práce. Dále mají mikrotitrační destičky široké využití v oblasti sledování biofilmu. Při jejich použití lze zjistit celkové množství biofilmové biomasy, poměr živých a mrtvých buněk, fyziologickou aktivitu přítomných buněk nebo množství matrix. Velkou popularitu zaznamenaly ve farmaceutickém výzkumu v případě

testování antimikrobiálních látek cílených na biofilmy, kdy je sledován vývoj a inhibice biofilmu v reakci na přítomnost těchto látek (L. C. Gomes a kol., 2014).

Naopak zásadní nevýhodou je, že se jedná o vsádkový způsob kultivace, při kterém dojde velmi rychle k vyčerpání živin v médiu a nelze tedy tuto metodu použít pro dlouhodobé experimenty. Další negativní vlastností pro vyhodnocení tvorby biofilmu je skutečnost, že pozorované buňky díky působení gravitace po určité době začnou sedimentovat na dno jamky. Zde jsou následně obklopeny EPS. Celkové množství biomasy na dně nemusí tedy přímo korelovat se schopností tvorby biofilmu (Azeredo a kol., 2017).

The Calgary device

Vylepšeným modelem mikrotitrační destičky pro formování a sledování růstu biofilmu je tzv. The Calgary device (TCBD) (Obr. 1), které je produktem firmy Innovotech a jeho komerční název je The MBEC Assay® (Pesciaroli a kol., 2013, www.innovotech.ca, 2013, online).



Obr. 1: The Calgary device (Gilmore, 2011)

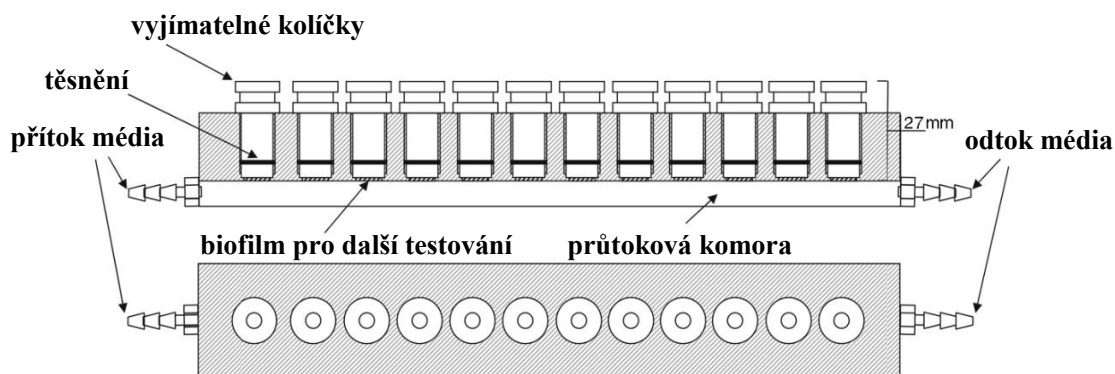
Tento produkt je prodáván ve dvou modelech. První model je podobný mikrotitrační destičce a obsahuje také 96 jamek, jež umožní provádění velkého množství rozdílných experimentů simultánně. Druhý typ představuje destičku bez oddělených jamek (celá destička je zaplavena jedním druhem média), lze tedy kultivovat pouze jeden kmen mikroorganismu. Oba tyto modely mají navíc polystyrenové víčko pokryté 96 vyčnívajícími kuličky, které po uzavření destičky přesně zapadají do jednotlivých jamek a jsou tedy, vedle stěn a dna jamky, dalším místem pro utváření biofilmu. Kuličky mohou být potaženy různými materiály a lze tak sledovat schopnost tvorby biofilmu na odlišných površích, biotických i abiotických (Azeredo a kol., 2017, Pesciaroli a kol., 2013; www.innovotech.ca, 2013, online).

Na rozdíl od mikrotitrační destičky je sledován biofilm vytvořený na kolíčkách, který není podpořen sedimentací buněk. Ke stanovení celkového množství biomasy se využívá účinek sonikace, kdy jsou přisedlé buňky odděleny od kolíčků. Tato metoda však nemá 100% účinnost a na kolíčkách může zůstat značná část biofilmu. Uvolněné buňky mají navíc značně rozdílnou fyziologii od buněk biofilmových (Azeredo a kol., 2017).

TCBD je hojně využíván ke stanovení účinnosti antimikrobiálních látek působících na biofilm, kdy je nejdříve použita jedna destička pro vytvoření biofilmu a následně je víčko s vytvořeným biofilmem přeneseno na druhou destičku s předpřipravenými roztoky s různou koncentrací antimikrobiálních látek. V tomto případě však musí biofilm při přemístění do jiné mikrotitrační destičky čelit vzdušným podmínkám, což může významně ovlivnit výsledky testování (Pesciaroli a kol., 2013; www.innovotech.ca, 2013, online). V současné době je TCBD nejvíce využíváno pro testování bakteriálních biofilmů. Některé studie se již věnovaly i houbovým biofilmům, a to především kvasinkovým rodům *Candida* a *Cryptococcus* a vláknitému druhu *Aspergillus fumigatus* (Pesciaroli a kol., 2013).

Robbinson device

Jedná se o dynamický *in vitro* model používaný pro sledování tvorby biofilmu a jeho testování vůči působení různorodých podmínek. Tento model umožňuje tvorbu mikrobiálního biofilmu na různých substrátech za nastavitelné intenzity toku tekutiny (Coenye a kol., 2008). Tento model byl poprvé použit v druhé polovině 20. století. Záhy na to byl však v roce 1981 modifikován Billem McCoyem. V dnešní době je tedy používán upravený model – „Modified Robbins device“ (Obr. 2), který má znatelnou výhodu oproti předchůdci v tom, že přítomné kolíčky neovlivňují charakteristiku proudění kapaliny (Azeredo a kol., 2017; Kharazmi a kol., 1999).



Obr. 2: Modifikovaný Robinson device (Mcbain, 2009, upraveno)

Jedná se o trubici, do které jsou vloženy vyjímatelné kolíčky tvořící de facto její vnitřní stěnu, na níž se formuje biofilm (Kharazmi a kol., 1999). Do trubice je vháněna peristaltickou pumpou tekutina (McBain, 2009). Na vstupu je daleko vyšší vliv proudu vháněné tekutiny, proto pro získání homogenních vzorků biofilmu je potřeba použít delší trubici s vyšším počtem kolíčků. Velikost střížných sil a působení toku lze nastavit libovolně. V trubici můžeme regulací toku docílit laminárního i turbulentního způsobu proudění (Azeredo a kol., 2017; Kharazmi a kol., 1999).

Zaočkování je prováděno tak, že inokulum protéká zařízením po několik hodin a následně je do zařízení vháněno sterilní médium. Tento stav je dlouhodobě udržitelný, kdy živiny a metabolity jsou přiváděny, respektive odváděny kontinuálně. Po vytvoření biofilmu lze vzorkovací kolíčky asepticky odstranit a provést na nich další testování. Manipulace s kolíčky pro provedení dalších pokusů však může způsobit přetváření biofilmu (Azeredo a kol., 2017; Kharazmi a kol., 1999)

Biofilmové reaktory

Mikromycety jsou důležitým zdrojem řady technologicky významných enzymů (proteas, amylas, celulas). Díky tomu získává kultivace vláknitých hub ve formě biofilmu v poslední době v průmyslovém odvětví stále větší pozornost (Villena a Gutiérrez-Correa, 2012). V mnoha případech bylo dokázáno, že houby jsou schopny růst při vysokých koncentracích polutantů, dokonce již byla několikrát potvrzena jejich vysoká degradační schopnost například v případě syntetických barviv (Deveci a kol., 2016; Maloney, 2001).

Způsob kultivace ve formě biofilmu vykazuje znaky submerzní kultivace i kultivace na pevném substrátu. Mikromycety totiž vytvářejí biofilm na přítomném podpůrném materiálu a zároveň jsou zcela ponořeny do kapalného média (Xiros a Studer, 2017).

Kritickým faktorem pro počáteční přichycení buněk a následné rozšíření biofilmu je materiál nosiče. Schopnost přichycení je ovlivněna mnoha fyzikálními vlastnostmi daného materiálu (hydrofobicita, drsnost povrchu, elektrostatický náboj) (Zune, 2015). Pro úspěšnou produkci požadovaných metabolitů je potřeba znát i anatomické, fyziologické a morfologické vlastnosti, jelikož každý houbový kmen je unikátním (Musoni a kol., 2015). I přes tyto nesnadné požadavky bylo již několikrát dokázáno, že biofilm je oproti submerzní kultivaci daleko produktivnější (Gutiérrez-Correa a kol., 2012). V případě průmyslově významného druhu *Aspergillus niger* byla při produkci celulas ve formě biofilmu zaznamenána o 70 % vyšší výtěžnost v porovnání se submerzní kultivací (Gamarra a kol., 2010). Takto vysoká

metabolická aktivita je zapříčiněna vyšší specifickou růstovou rychlostí, která je podpořena přítomností kanálků mezi vlákny mikromycet umožňujících daleko lepší přestup živin (Gutiérrez-Correa a kol., 2012). Kromě těchto výhod je také zásadní, že vůči submerzní kultivaci je v tomto případě možné několikanásobné použití mikromycetní biomasy či značné usnadnění downstream procesů (Zune, 2015).

V současné době jsou biofilmové reaktory nejvíce využívány pro zpracování znečištěných vod nebo plynů. Pro tyto bioreaktory je nejvýhodnější mnohadruhé konsorcium, jehož vzájemné interakce zajišťují vysokou robustnost vůči změně podmínek. Reaktory jsou používány v různém uspořádání („tickle-bed biofilm reactor“, „packed-bed biofilm reactor“, „fluidized-bed biofilm reactor“) (Zune, 2015).

Závěr

Nárůst biofilmu lze studovat celou řadou metod. Nejstarší z nich, Christensenova zkumavková metoda, dala základ vyhodnocování všech novějších metod sledování biofilmu. Nejvyužívanější metodou v laboratorním prostředí je použití mikrotitračních destiček, jimiž se dá sledovat řada biofilmových vlastností – celkové množství biomasy, poměr živých a mrtvých buněk, metabolickou aktivitu přítomných buněk či množství matrix. Pro studium většího množství biofilmů a produkce jejich sekundárních metabolitů se mohou využívat biofilmové reaktory.

Literatura

- Azeredo J., Azevedo N. F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A. R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knøchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R. L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C. (2017) Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, **43**, str. 313-351.
- Cattò C., Cappitelli F. (2019) Testing anti-biofilm polymeric surfaces: where to start? *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, str. 1-60.
- Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., Beachey E. H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**, str. 996-1006.
- Coenye T., Prijck K., Wever B., Nelis H. J. (2008) Use of the modified Robbins device to study the *in vitro* biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, str. 733-740.
- Deveci E. Ü., Dizge N., Yatmaz H. C., Aytepe Y. (2016) Integrated process of fungal membrane bioreactor and photocatalytic membrane reactor for the treatment of industrial textile

- wastewater. Biochemical Engineering Journal, **105**, str. 420-427.
- Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. (2015) New technologies for studying biofilms. Microbiology Spectrum, **3**, str. 1-41.
- Gamarra N., Villena G., Gutiérrez-Correa M. (2010) Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology, **87**, str. 545-551.
- Gilmore B. (2011) Antimicrobial ionic liquids (Ionic Liquids: Applications and Perspectives, Kokorin A., Ed.), IntechOpen, London, str. 587-604.
- Gomes I. B., Meireles A., Gonçalves A. L., Goeres D. M., Sjollema J., Simões L. C., Simões M. (2018) Standardized reactors for the study of medical biofilms: a review of the principles and latest modifications. Critical Reviews in Biotechnology, **38**, str. 657-670.
- Gutiérrez-Correa M., Ludena Y., Ramage G., Villena G. (2012) Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. Applied Biochemistry and Biotechnology, **167**, str. 1235-1253.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazilian Journal of Infectious Diseases, **15**, str. 305-311.
- Innovotech [online]. Poslední aktualizace: 1.8.2013 [10. 10. 2020].
Dostupné z: <https://www.innovotech.ca/products/mbec-assays/>.
- Kharazmi A., Giwerzman B., Høiby N. (1999) Robbins device in biofilm research (Methods in Enzymology, Abelson J. N., Simon M. I., Doyle R. J., Eds.), Academic Press, London, str. 207-215.
- Kirmusaoğlu S. (2019) The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents (Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods, Kirmusaoğlu S., Ed.), IntechOpen, London, str. 1-17.
- Maloney S. E. (2001) Pesticide degradation (Fungi in Bioremediation, Gadd G. M., Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 188-223.
- McBain A. J. (2009) *In vitro* biofilm models: an overview. Advances in Applied Microbiology, **69**, str. 99-132.
- Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J.-B., Delvigne F. (2015) Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, **19**, str. 430-442.
- Pesciaroli L., Petruccioli M., Fedi S., Firrincieli A., Federici F., D'Annibale A. (2013) Characterization of *Pleurotus ostreatus* biofilms by using the Calgary biofilm device. Applied and Environmental Microbiology, **79**, str. 6083-6092.
- Villena G., Gutiérrez-Correa M. (2012) Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, **2**, str. 804-814.
- Xiros C., Studer M. H. (2017) A multispecies fungal biofilm approach to enhance the cellulolytic efficiency of membrane reactors for consolidated bioprocessing of plant biomass. Frontiers in Microbiology, **8**, str. 1-14.
- Zune Q. (2015) Design of a single-species biofilm reactor based on metal structured packing for the production of high added value biomolecules, Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 187 stran.

Charakterizace nanočástic stříbra a jejich antibiofilmové účinky vůči *Candida albicans*

Characterization of silver nanoparticles and their antibiofilm effects against *Candida albicans*

Kočí M., Miškovská A., Mařátková O.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

S rostoucím výskytem patogenních mikroorganismů rezistentních vůči konvenčním antimikrobiálním látkám narůstá poptávka po nových antimikrobiálních agens. Mnoho patogenních mikroorganismů disponuje schopností tvořit biofilm. Unikátní vlastnosti biofilmu pak zapříčiňují obtížnou léčbu těchto s biofilmem spjatých infekcí. Kvůli zvýšené rezistenci vůči konvenčním léčivům je proto nutné hledat nové efektivní antimikrobiální látky. Rod *Candida* představuje širokou skupinu oportunních patogenů schopných tvorby biofilmu. Nanočástice stříbra (AgNPs) představují jedno z nových slibných antimikrobiálních agens účinným vůči biofilmům *Candida* spp. AgNPs lze připravit různými metodami, které lze rozdělit na metody fyzikální, chemické a biosyntetické. Fyzikální metody využívají především různé formy energetického záření pro indukci tvorby AgNPs v roztoku. Chemické metody využívají anorganická či organická reakční činidla pro redukci stříbrných iontů. Biosyntetické metody využívají mikrobiální buňky, organické materiály nebo jejich komponenty či extrakty pro redukci stříbra. Biosyntetické metody si získávají rostoucí pozornost díky jejich finanční výhodnosti, relativní jednoduchosti provedení a absenci toxických reagensů a odpadů.

Abstract

With an increasing occurrence of pathogenic strains of microorganisms resistant to conventionally used antimicrobial agents, there is a need for new effective antimicrobial agents. Many pathogenic microorganisms are capable of biofilm formation which makes the resulting infections difficult to eradicate due to the unique properties of biofilm populations. Their increased resistance to conventional treatment leads to an urgent need of new effective antimicrobial agents. Genus *Candida* represents a widespread group of opportunistic pathogens capable of biofilm formation. Silver nanoparticles (AgNPs) count as one of the promising antimicrobial agents against *Candida* spp. biofilms. AgNPs can be produced by multiple

methods. These can be divided into physical, chemical, and biosynthetic methods. Physical methods mainly use irradiation to initiate the AgNPs formation. Chemical methods include the use of either inorganic or organic reagents to reduce silver ions in solution. Biosynthetic methods rely on microbial cells, organic materials or their components/extracts to reduce the silver ions. Biosynthetic methods are receiving growing attention as they are easy to carry out, these materials can be often acquired as agricultural waste and do not use toxic reagents nor produce toxic wastes.

Klíčová slova: antibiotická rezistence, biofilm, infekce spjaté s tvorbou biofilmu, *Candida albicans*, *Candida* spp., nanočástice stříbra, AgNPs, biosyntéza nanočástic

Keywords: antibiotic resistance, biofilm, biofilm infections, *Candida albicans*, *Candida* spp., silver nanoparticles, AgNPs, nanoparticle biosynthesis

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) count as one of the very promising antimicrobial agents for local treatment of infections. Silver as such has been known since ancient times for its antimicrobial properties (Martínez-Castañón et al., 2008). Multiple products containing silver and silver nanoparticles are already in medical use such as in dressings for burns (Franci et al., 2015) as well as in many consumer products such as silver-impregnated clothing (Tulve et al., 2015). More and more biosynthetic approaches for obtaining AgNPs are reported in scientific literature, one of the main approaches being the use of plant extracts which are able of reducing Ag^+ ions in solutions and stabilizing the emerging AgNPs by the capping effect of present biomolecules (Ahmed et al., 2016). These syntheses are normally performed under mild conditions, without the presence of toxic reagents and the production of toxic wastes, and the plant material can be obtained as agricultural waste, therefore, the whole process is compliant with the methods of, so called, green chemistry (Aldosary and El-Rahman, 2019).

Biofilm related infections are receiving increasing attention due to their high significance in clinical context. The biofilm formation is a mode of life native to many species of bacteria as well as unicellular eukaryotes - including many pathogenic species. Biofilm populations have unique properties which enable them to resist as much as thousand-fold higher concentrations of antimicrobials as compared to their same-species planktonic populations (Hall-Stoodley et al., 2004; Olsen, 2015). This speaks for the need for new antimicrobials capable of targeting and eradicating these difficult to treat infections.

AgNPs synthesis and characterization

Physical and chemical methods

Physical methods include various approaches and most often use some kind of radiation (microwaves, laser irradiation) to induce Ag^+ aggregation. These methods do not even need the use of reducing agents, while only capping agent may be needed, which can make them as “green” as many biosynthetic methods (Sharma et al., 2009).

Chemical methods prepare AgNPs bottom up by reducing Ag^+ ions in solution. The standard reaction solution contains a source of Ag^+ ions (silver salts such as commonly used AgNO_3), a capping agent which stabilizes the produced nanoparticles (very common capping agent is citric acid) and a reducing agent (such as NaBH_4 or gallic acid). Very often, a single compound can fulfil both the function of capping and reducing agent, e.g., gallic acid (Lok et al., 2007; Martínez-Castañón et al., 2008; Pal et al., 2007; Panáček et al., 2006).

AgNPs biosynthesis

Biosynthetic methods use microscopic or macroscopic organisms, their parts or extracts to reduce silver ions in solution. Many organisms are capable of precipitating heavy metals from their environment as a resistance mechanism to protect themselves from their toxic effect. This reduction can occur on the host's cellular surface or independently on the presence of the host - in solution by the effect of secreted metabolites.

One of the first cases of intracellular AgNPs synthesis described in literature was *Pseudomonas stutzeri* AG256 which was isolated from a silver mine (Klaus et al., 1999). Shortly after, many groups have described the ability of other microorganisms to precipitate silver in solution. Another example can be *Verticillium* sp. isolated from a *Taxus* plant by Mukherjee et al. (2001) which was capable of synthesizing nanoparticles on its cellular surface. Example of reduction using microbial extracts is *Fusarium oxysporum*, concerning eukaryotes, which has been shown by Ahmad et al. (2003) to reduce silver extracellularly by secretion of extracellular reducing enzymes. These were able to reduce the silver independently on the presence of the producing organism. From prokaryotes, we can name *Acinetobacter calcoaceticus* LRVP54 which's aqueous extract was used by Singh et al. (2013) to produce AgNPs.

Highly studied is the use of plant extracts as a more affordable alternative to microbial extracts. Many plant materials can be easily obtained in high quantity and at low cost, often as agricultural waste, and their use eliminates the elaborate processes of microbial cultivation. One

downside is the dependence of the material quality on environmental conditions which makes it uneasy to maintain constant reaction conditions long-term (Ahmed et al., 2016; Aldosary and El-Rahman, 2019; Song and Kim, 2009). Plant extracts provide a complex mixture of proteins or free amino acids, saccharides, polyphenols, and other components which overall act as both reducing and capping agents (Ahmed et al., 2016). Numerous plant extracts have been described in literature to be suitable for production of AgNPs, such as *Pelargonium graveolens* (Shankar et al., 2003), *Cinnamomum camphora* (Huang et al., 2007), or *Lycopersicon esculentum* extract (Choi et al., 2019), to name a few.

Characterization of AgNPs

The basic and most accessible method of characterizing the synthesized nanoparticles is UV-Vis spectroscopy. It can be used after the synthesis as well during the synthesis to observe the progress (Ahmad et al., 2003; Fayaz et al., 2010). Radiation in the wavelength range of visible light can induce oscillations in the nanoparticle surface conductive electron gas. This vibrational energy is dissipated through non-radiative decay. Therefore, the incident light is absorbed which causes AgNPs to exhibit a size and shape dependent absorption maximum. This absorption maximum is usually located between the wavelengths of 400 and 500 nm and tends to broaden towards higher wavelengths (with increasing size of nanoparticles) (Cunningham et al., 2021; Martínez-Castañón et al., 2008; Solomon et al., 2007).

The second most used method that allows for direct observation of synthesized nanoparticles is transmission electron microscopy (TEM). Size and shape of the synthesized AgNPs can be directly measured in the obtained microscopic images. One downside is that TEM can only deliver 2D data, which in practice means only planar measurements of nanoparticle projections can be taken (Cunningham et al., 2021; Martínez-Castañón et al., 2008; Solomon et al., 2007). Obtained data can be then used to create size distributions of the obtained nanoparticle suspensions (Velgosova et al., 2017).

Supplementary methods for obtaining more information about the obtained AgNPs are: energy dispersive X-ray spectroscopy which can be used to further study the surface chemistry of AgNPs (Fayaz et al., 2010), dynamic light scattering for estimating the size of AgNPs and creating size distributions (Martínez-Castañón et al., 2008; Panáček et al., 2006) or Fourier transformation infrared spectroscopy which can be used to study the interactions between AgNPs and biomolecules and their chemical changes, from the point of present functional groups, due to the reaction with ionic silver (Ahmad et al., 2003; Fayaz et al., 2010).

Antimicrobial effects of AgNPs

As bulk and ionic silver are known to possess antimicrobial properties, it is no wonder that AgNPs exhibit significant antimicrobial effects as well. However, due to the unique properties and immense specific surface area of nanomaterials, AgNPs show multiple advantageous properties, including enhanced surface interaction, enhanced mobility and penetration into the point of administration (Franci et al., 2015; Lok et al., 2006; Morones et al., 2005), yet low overall bioavailability limiting systemic toxic effects of silver (Sampath et al., 2021), and overall enhanced antimicrobial effects (Franci et al., 2015; Lok et al., 2006; Panáček et al., 2006).

The antimicrobial effect of AgNPs was shown to be size dependent, smaller sized nanoparticles generally achieving higher inhibition rates (Franci et al., 2015; Martínez-Castañón et al., 2008; Morones et al., 2005; Panáček et al., 2006) and also shape dependent, as nanoparticles with their faces oriented in certain crystallographic orientations (Miller index of (111)) showed higher antimicrobial effects (Pal et al., 2007).

AgNPs were shown to effectively inhibit biofilms of multitude of well-known pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Barabadi et al., 2021; Estevez et al., 2020), and there is also emerging literature on the antibiofilm effects of biosynthetically prepared AgNPs against *Candida* spp. (Al Aboody, 2019; Choi et al., 2019; Mare et al., 2021). For example, Choi et al. (2019) found biosynthetically prepared AgNPs using *Lycopersicon esculentum* extract to achieve MBIC₅₀ values of 32, 32, and 8 mg·L⁻¹ for *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, and *C. parapsilosis* ATCC 90018.

Conclusions

AgNPs are proving themselves to be intriguing new possibility for local treatment of biofilm infections and their prevention in new medical materials and dressings. A number of studies to date have shown the ease and cost effectivity of the preparation of biosynthetic AgNPs and their plausible antimicrobial effects. However, further optimalization of syntheses, dosage forms, development of new AgNPs containing materials, and further studies on their antimicrobial effects *in vivo* will be needed to exploit their full potential.

References

- Ahmad A., Mukherjee P., Senapati S., Mandal D., Khan M. I., Kumar R., and Sastry M. (2003) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 28 (4), pg. 313-318.
- Ahmed S., Ahmad M., Swami B. L., and Ikram S. (2016) A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7 (1), pg. 17-28.
- Al Aboody M. S. (2019) Silver/silver chloride (Ag/AgCl) nanoparticles synthesized from *Azadirachta indica* latex and its antibiofilm activity against fluconazole resistant *Candida tropicalis*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47 (1), pg. 2107-2113.
- Aldosary S. and El-Rahman S. (2019) Green Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles of *Lawsonia inermis*, *Rhamnus frangula*, *Camellia sinensis* and *Thymus vulgaris* Extracts. *Journal of pure & applied microbiology : an international research journal of microbiology*, 13 (2), pg. 1279-1284.
- Barabadi H., Mojab F., Vahidi H., Marashi B., Talank N., Hosseini O., and Saravanan M. (2021) Green synthesis, characterization, antibacterial and biofilm inhibitory activity of silver nanoparticles compared to commercial silver nanoparticles. *Inorganic Chemistry Communications*, 129, pg. 108647.
- Cunningham B., Engstrom A. M., Harper B. J., Harper S. L., and Mackiewicz M. R. (2021) Silver Nanoparticles Stable to Oxidation and Silver Ion Release Show Size-Dependent Toxicity In Vivo. *Nanomaterials*, 11 (6), pg. 1516.
- Estevez M. B., Raffaelli S., Mitchell S. G., Faccio R., and Alborés S. (2020) Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles. *Molecules*, 25 (9).
- Fayaz A. M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P. T., and Venketesan R. (2010) Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 6 (1), pg. 103-109.
- Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., and Galdiero M. (2015) Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*, 20 (5), pg. 8856-8874.
- Hall-Stoodley L., Costerton J. W., and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), pg. 95-108.
- Huang J. L., Li Q. B., Sun D. H., Lu Y. H., Su Y. B., Yang X., Wang H. X., Wang Y. P., Shao W. Y., He N., Hong J. Q., and Chen C. X. (2007) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18 (10), pg. 11.
- Choi J. S., Lee J. W., Shin U. C., Lee M. W., Kim D. J., and Kim S. W. (2019) Inhibitory Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Lycopersicon Esculentum* against Biofilm Formation in *Candida* Species. *Nanomaterials*, 9 (11).
- Klaus T., Joerger R., Olsson E., and Granqvist C. G. (1999) Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (24), pg. 13611-13614.
- Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K. H., Chiu J. F., and Che C. M. (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12 (4), pg. 527-534.
- Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H. Z., Tam P. K. H., Chiu J. F., and Che C. M. (2006) Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5 (4), pg. 916-924.
- Mare A. D., Man A., Ciurea C. N., Toma F., Cighir A., Mareş M., Berța L., and Tanase C. (2021) Silver Nanoparticles Biosynthesized with Spruce Bark Extract—A Molecular Aggregate with Antifungal Activity against *Candida* Species. *Antibiotics*, 10 (10).

- Martínez-Castañón G. A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutierrez F., Martínez-Mendoza J. R., and Ruiz F. (2008) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10 (8), pg. 1343-1348.
- Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., and Yacaman M. J. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 (10), pg. 2346-2353.
- Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar S. R., Khan M. I., Parishcha R., Ajaykumar P. V., Alam M., Kumar R., and Sastry M. (2001) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters*, 1 (10), pg. 515-519.
- Olsen I. (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34 (5), pg. 877-886.
- Pal S., Tak Y. K., and Song J. M. (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6), pg. 1712-1720.
- Panáček A., Kvítek L., Prucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V. K., Nevěčná T., and Zbořil R. (2006) Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (33), pg. 16248-16253.
- Sampath G., Govarthanam M., Rameshkumar N., Krishnan M., Alotaibi S. H., and Nagarajan K. (2021) A comparative analysis of in vivo toxicity, larvicidal and catalytic activity of synthesized silver nanoparticles. *Applied Nanoscience*.
- Shankar S. S., Ahmad A., and Sastry M. (2003) Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnology Progress*, 19 (6), pg. 1627-1631.
- Sharma V. K., Yngard R. A., and Lin Y. (2009) Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1-2), pg. 83-96.
- Singh R., Wagh P., Wadhvani S., Gaidhani S., Kumbhar A., Bellare J., and Balu Ananda C. (2013) Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*, 8 (1), pg. 4277-4290.
- Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky S. A., Boritz C., and Mulfinger L. (2007) Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84 (2), pg. 322-325.
- Song J. Y. and Kim B. S. (2009) Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (1), pg. 79-84.
- Tulve N. S., Stefaniak A. B., Vance M. E., Rogers K., Mwilu S., LeBouf R. F., Schwegler-Berry D., Willis R., Thomas T. A., and Marr L. C. (2015) Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218 (3), pg. 345-357.
- Velgosova O., Čižmarová E., Málek J., and Kavuličova J. (2017) Effect of storage conditions on long-term stability of Ag nanoparticles formed via green synthesis. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 24 (10), pg. 1177-1182.

Siderofory aneb aktivní složka biopesticidního preparátu

Siderophores – The Active Component of the Biopesticide Preparation

J. Mach, M. Halecký

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28, Praha 6

Abstrakt

Náplní této práce bylo podrobné studium mimoribosomálně syntetizovaných molekul zvaných siderofory. Jejich funkce spočívá v tvorbě komplexu (např. s ionty železa), který je následně transportován do intracelulárního prostředí buňky. Důsledkem tohoto procesu dochází k poklesu koncentrace iontů železa a dalších látek v půdě. Tento nutriční deficit negativně ovlivňuje životaschopnost některých fytopatogenních mikroorganismů, a proto by přítomnost sideroforů v preparátu byla žádoucí. Cílem této studie bylo potvrdit produkci sideroforu u studovaného mikroorganismu s jeho následnou identifikací. Dále bylo nutné určit závislost produkce sideroforů na době kultivace a složení média. Produkce sideroforu u studovaného mikroorganismu byla potvrzena. Jednalo se o pyoverdin. Doba kultivace a složení kultivačního média měly značný vliv na produkci studovaného metabolitu.

Abstract

In this study, non-ribosomally synthesized molecules called siderophores were studied in detail. Their function is to form a complex (e.g. with the iron ions), which is subsequently transported into the cell interior. The consequence of this process is a reduction in the local amount of iron ions in the soil. This deficiency negatively affects the viability of some soil bacteria, often phytopathogenic, and therefore their presence in the biopesticide preparation would be desirable. The aim of this study was to confirm siderophore production in the studied microorganism with its subsequent identification. It was also necessary to determine the dependence of siderophore production on cultivation time and medium composition. Siderophore production in microorganism under study was confirmed. It was pyoverdine. The production of pyoverdine was directly proportional to the cultivation time and the medium composition had a significant effect on its production.

Klíčová slova: biopesticid, antifytopatogenní účinek, siderofor, pyoverdin, ekologicky nezávadný produkt

Key words: biopesticide, antiphytopathogenic effect, siderophore, pyoverdine, eco-friendly product

Úvod

Neustálý nárůst lidské populace přináší komplikace spojené s rostoucími nároky na množství vyprodukovaných plodin. Kvalita a množství sklizených plodin z dané obhospodařované plochy je velmi závislá na schopnosti rostlin odolávat napadení všudypřítomnými škůdci. Lidé záměrně posilují obranu rostlin pomocí chemických postřiků, které mohou mít negativní dopad na životní prostředí, např. narušení potravního řetězce v ekosystému (Singh a kol., 2013). Za účelem nahrazení nebo snížení množství těchto látek se v posledních letech staly středem zájmu biopesticidy, jejichž základem jsou pouze antifytopatogenní činitelé či směs mikrobiálních producentů a jejich biologicky aktivních metabolitů (Liu a kol., 2021). Jedním ze základních vlastností registrovaného biopesticidního preparátu musí být jeho nulová toxicita vůči jiným organismům obývajícím prostředí, ve kterém by byl aplikován (Volcão a kol., 2022). Tento produkt šetrný k životnímu prostředí by měl být navržen jako směs biologicky aktivních molekul, které by mu poskytly jedinečné vlastnosti spojené s účinnou inaktivací rostlinných škůdců. Aktivní složky přípravku by byly reprezentovány především antibiotiky, enzymy, pigmenty nebo biosurfaktanty (čím větší je smáčivost preparátu na hydrofobním povrchu hmyzu nebo plísně, tím účinnější je inaktivace škůdce). Součástí preparátu by mohly být i nosiče, adjuvancia či glycerol. Přítomnost zbytkového množství zmíněného trojsytného alkoholu, sloužícího jako zdroj uhlíku a energie v průběhu kultivačního procesu, by měla také pozitivní vliv na stabilitu enzymů a obecně na trvanlivost preparátu (Bradbury a Jakoby, 1972).

Pigmenty, konkrétně siderofory, byly v této studii podrobně studovány. Tyto sekundární metabolity patří do heterogenní skupiny organických molekul o velikosti 500–1500 Da. Jejich hlavní funkce spočívá v tvorbě komplexu s ionty kovů, např. s ionty železa, což vede ke snížení lokálního množství tohoto nutrientu v půdě (nebo médiu). Tento deficit negativně ovlivňuje životaschopnost a růst některých půdních, fytopatogenních mikroorganismů (Behnsen a Raffatellu, 2016). Vzhledem k této unikátní vlastnosti by jejich přítomnost v potenciálním biopesticidním preparátu byla žádoucí. Produkce těchto metabolitů je závislá na složení okolního média. Rychlost produkce sideroforů se zvyšuje s klesající koncentrací iontů železa (Vindeirinho a kol., 2021).

Snaha o rozšíření spektra registrovaných biopesticidních preparátů je velmi důležitá z hlediska zvýšení ochrany hospodářsky významných plodin vůči škůdcům, a tedy i z hlediska

uspokojení rostoucí poptávky po potravě nezadržitelně rostoucí lidskou populací, ne však za cenu rostoucí kontaminace životního prostředí.

Materiál a metody

Mikroorganismus

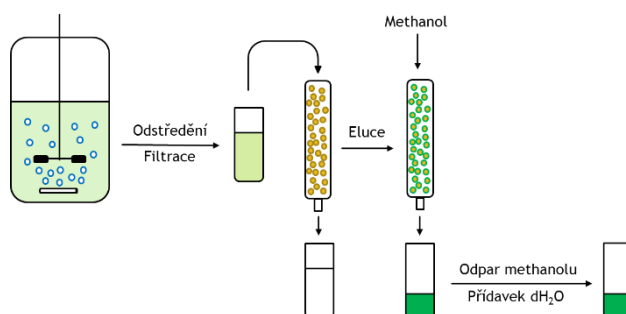
Pseudomonas sp. – gramnegativní, nesporulující, pohyblivá bakterie patřící do skupiny fluorescenčních pseudomonád

Bioproces

Bioproces probíhal po dobu 5 dnů při teplotě 22 °C v 1 l skleněném bioreaktoru (Duran®, Německo). V této práci bylo jako kultivační médium použito standardní BSM a modifikované BSM. V průběhu bioproduktu byl glycerol přidáván do kultivačního média především jako zdroj uhlíku a energie. V rámci jednoho dne bylo do média přidáno 2,5 g·l⁻¹ tohoto substrátu. Médium bylo aerováno (průtok vzduchu byl nastaven na hodnotu 1 VVM) a mechanicky promícháváno (150 ot/min) tištěným plastovým míchadlem s plochými lopatkami (3D tiskárna – Prusa Research, Česká republika).

Downstream proces

Proces byl zahájen odběrem vzorku z kultivačního média. Následovala centrifugace (10 000 ot/min, 5 min) a filtrace (velikost pórů – 0,8 μm). Předupravený vzorek byl nanesen na kondicionovanou SPE kolonu se specifickou stacionární fází. Sorbované analyty byly uvolněny methanolem. Závěrečnými kroky této procedury bylo odpaření methanolu a přidání destilované vody. Takto zpracovaný vzorek byl podroben spektrofotometrické, fluorometrické nebo HPLC analýze. Celý postup je schematicky znázorněn na obrázku 1.



Obr 1. Základní schéma downstream procesu s popisem jednotlivých důležitých kroků

Sorpční účinnost SPE kolon

Studovaná bakterie pravděpodobně produkuje několik biologicky aktivních molekul, kterými jsou siderofory, antibiotika (2,4-diacetylfluoroglucinol (2,4-DAPG)), rhamnolipidy nebo pyocyanin. Tato predikce je založena na znalosti genetického materiálu. V rámci této studie byly otestovány dvě SPE kolony (LiChrolut[®] EN (40–120 µm) 200 mg 3 ml standard glass tube – stacionární fáze: ethylvinylbenzodivinylbenzen polymer a Strata[®] C18-E (55 µm, 70 Å) 200 mg / 6 ml – stacionární fáze: silikátová matrice s navázanými zbytky uhlovodíků C18), za účelem nalézt vhodnější kolonu z hlediska sorpční účinnosti vůči uvedeným metabolitům, které zde byly reprezentovány standardy: pyoverdin (Sigma-Aldrich), 2,4-DAPG (Apollo Scientific), pyocyanin (Sigma-Aldrich) a rhamnolipidy (Sigma-Aldrich). K otestování schopnosti detekovat desorbované látky (ze stac. fáze SPE kolony) byly použity dva HPLC systémy (HPLC s UV detekcí a dvěma různými kolonami: Watrex Nucleosil 100, C18 a Watrex Polymer IEX H). Konkrétně byly analyzovány tři frakce, které představovaly směsný vzorek standardů před a po průchodu kolonou a vzorek obsahující desorbované analyty. Tímto postupem bylo možné posoudit, zda analyty interagovaly se sorbentem SPE kolony či nikoliv. Tento krok byl nutný pro výběr vhodnějšího HPLC systému (chromatografické kolony) pro následující studium sorpční účinnosti použitých SPE kolon vůči jednotlivým standardům. Vzorky představující roztoky standardů (s výjimkou pyoverdinu (vysoká molekulová hmotnost)) před a po projití kolonou byly analyzovány za použití vhodnějšího HPLC systému (resp. vhodnější chromatografické kolony). Sorpční účinnost vůči pyoverdinu byla studována za použití spektrofotometrické analýzy (microplate reader INFINITE F200 – Tecan, Německo). Po vyhodnocení následoval výběr vhodnější SPE kolony využit v následných experimentech této studie.

Potvrzení produkce sideroforů u studovaného mikroorganismu

Pro potvrzení produkce sideroforů byl použit pevný agar, který obsahoval modrý pigment Chrom azurol S (CAS), v jehož struktuře byly navázány ionty železa (Louden a kol., 2011). Pozitivní odezva této analýzy byla reprezentována barevnou změnou, konkrétně z modré na oranžovou, kdy v okolí narostlých kolonií siderofory produkujících bakterií vznikaly oranžové „Halo“ zóny. Produkované siderofory interagovaly s ionty železa a způsobovaly jejich uvolňování ze struktury pigmentu. Důsledkem této reakce byla výše uvedená barevná změna.

Identifikace neznámého sideroforu

Zpracovaný vzorek obsahující neznámý siderofor byl analyzován spektrofotometricky a fluorometricky. Identifikace byla provedena porovnáním změřených absorpčních a emisních spekter neznámého sideroforu a standardu (pyoverdin).

Studium vlivu doby kultivace na produkci pyoverdinu

Vzorkování bylo provedeno 1., 4. a 5. den kultivace. Zpracované vzorky byly podrobeny spektrofotometrické analýze a vizuální analýze. Koncentrace pyoverdinu byla vypočtena ze vztahu mezi absorbancí a koncentrací standardu (pyoverdinu).

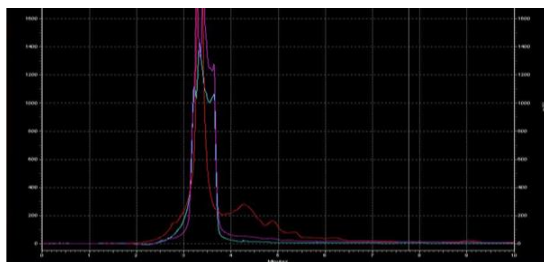
Studium vlivu složení média na produkci pyoverdinu

Pro tento experiment byla použita modifikovaná média. Konkrétně se jednalo o médium bez stopových prvků a obohacené o ionty železa, ionty mědi a kombinaci těchto iontů. Po pětidenní kultivaci byly vzorky zpracovány dle výše uvedeného postupu. Zpracované vzorky byly analyzovány spektrofotometricky. K nepřímému stanovení koncentrace pyoverdinu byl použit alternativní způsob založený na spektrofotometrickém měření vzorků obsahujících vyprodukovaný pyoverdin a CAS roztok (Schwyn a Neilands, 1987). Čím více pyoverdinu bylo ve vzorku přítomno, tím výraznější byla změna barvy (z CAS bylo uvolněno více iontů železa). Vyhodnocení bylo provedeno dle následující rovnice: procento uvolněných iontů železa = $[(A_{\text{ref. vzorek}} - A_{\text{vzorek}}) / A_{\text{ref. vzorek}}] \cdot 100$. Referenční vzorek byl reprezentován čerstvým, modifikovaným BSM s roztokem CAS (Chowdappa a kol., 2020).

Výsledky

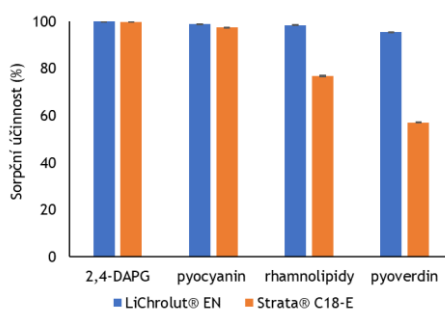
Sorpční účinnost SPE kolon

Předběžné testování schopnosti studovaných HPLC systémů detekovat desorbované analyty ze stac. fáze SPE kolony ukázalo, že systém HPLC s UV detekcí a s kolonou Watrex Nucleosil 100, C 18 byl lepším systémem pro detekci standardů (prokazatelná interakce mezi standardy a stac. fází SPE kolony). Toto tvrzení vyplynulo z porovnání naměřených chromatogramů (viz Obr. 2).



Obr 2. Porovnání chromatogramů tří frakcí analyzovaných systémem HPLC s UV detekcí a s kolonou Watrex Nucleosil 100, C 18: fialový – směsný vzorek standardů (před nanesením na SPE kolonu), zelený – vzorek prošlý SPE kolonou a červený – vzorek obsahující desorbované standardy (schopnost detekovat desorbované analyty – vhodnější HPLC systém pro následné analýzy)

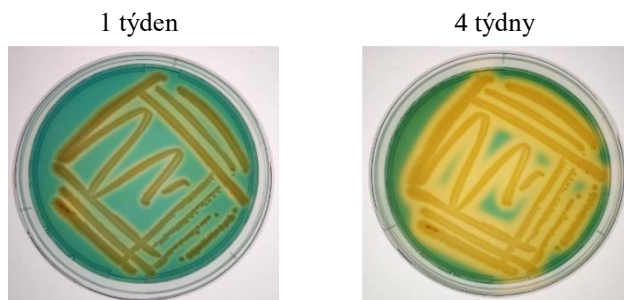
Účinnost sorpce obou SPE kolon vůči jednotlivým standardům byla studována pouze za pomoci HPLC systému s UV detekcí a kolonou Watrex Nucleosil 100, C 18. Naměřené a zpracované hodnoty jsou graficky znázorněny na obrázku 3. Kolona LiChrolut® měla vyšší sorpční účinnost vůči pyoverdinu a rhamnolipidům proti koloně Strata®. Na druhou stranu, obě kolony měly velmi podobnou afinitu vůči 2,4-DAPG a pyocyainu. Na základě těchto zjištění byla kolona LiChrolut® použita pro zpracování vzorků v následných experimentech.



Obr 3. Porovnání sorpční účinnosti SPE kolon LiChrolut® a Strata® vůči jednotlivým standardům

Potvrzení produkce sideroforů u studovaného mikroorganismu

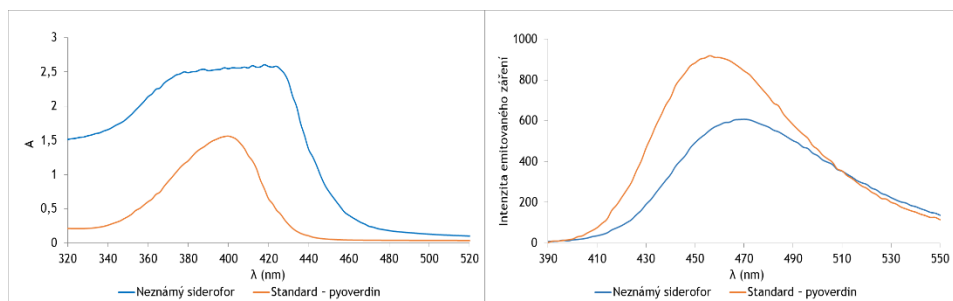
V okolí narostlých kolonií byly pozorovány oranžové „Halo“ zóny, díky čemuž byla produkce sideroforů u studovaného mikroorganismu potvrzena (viz Obr. 4).



Obr 4. Potvrzení produkce sideroforů pomocí CAS agaru na základě pozorování oranžových „Halo“ zón v okolí kolonií – časově závislá produkce sideroforů

Identifikace neznámého sideroforu

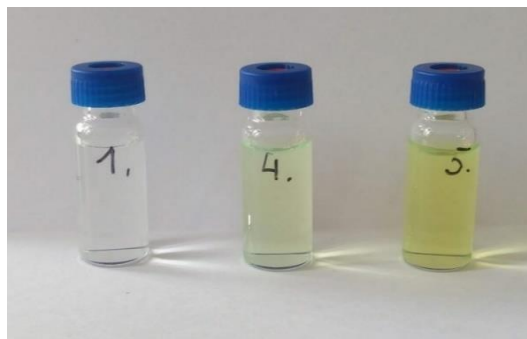
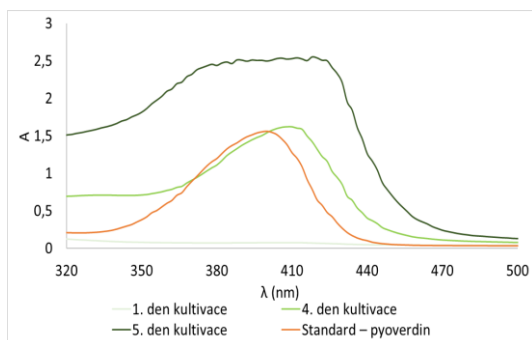
Na základě překryvu absorpčních a emisních spekter bylo možno identifikovat neznámý siderofor. Jednalo se o pyoverdin. Jeho absorpční maximum bylo naměřeno při $\lambda_{\max} = 406 \text{ nm}$ a maximální intenzita emitovaného záření při 460 nm (viz Obr. 5).



Obr 5. Identifikace neznámého sideroforu na základě překrytí absorpčních a emisních spekter sideroforu a standardu

Studium vlivu doby kultivace na produkci pyoverdinu

Bylo zjištěno, že produkce pyoverdinu je přímo úměrná době kultivace (viz Obr. 6). Toto tvrzení vyplynulo z vizuální analýzy zabarvení zpracovaných vzorků a z naměřených absorpčních spekter. Koncentrace pyoverdinu ve zpracovaných vzorcích byla $0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (1. den), $138 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (2. den) a $294 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (3. den).

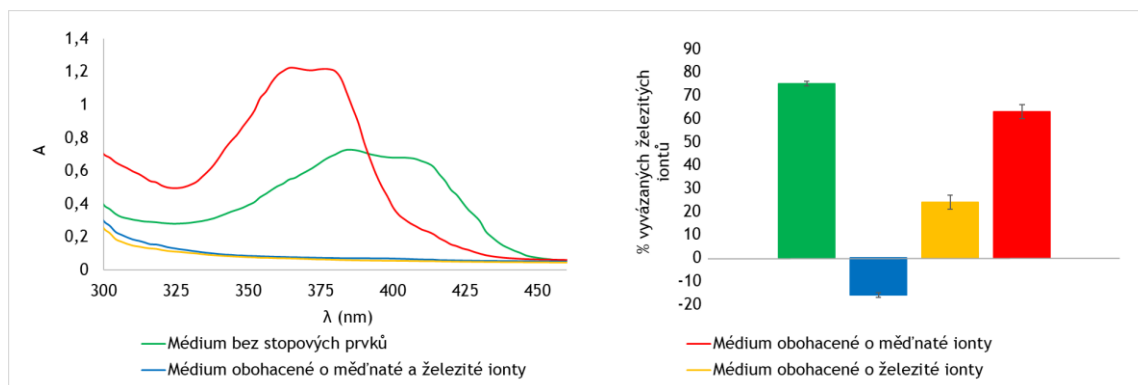


Obr 6. Časově závislá produkce pyoverdinu

Studium vlivu složení média na produkci pyoverdinu

Složení média významně ovlivnilo produkci pyoverdinu. Absence stopových prvků a přítomnost iontů mědi měla pozitivní vliv na produkci. V médiu bez stopových prvků byla naměřena hodnota $75 \pm 1 \%$ uvolněných iontů železa a v případě přítomnosti iontů mědi byla tato hodnota $63 \pm 3 \%$. Ionty mědi indukovaly syntézu pyoverdinu a následně s ním vytvořily komplex. Absorpční maximum tohoto komplexu (červený chromatogram) bylo posunuto proti maximu „volného“ pyoverdinu (zelený chromatogram). Na druhou stranu, v případě iontů

železa byl pozorován negativní vliv na produkci. Kombinace iontů železa a mědi způsobila pokles hodnoty procenta uvolněných iontů do záporných hodnot (viz Obr. 7). Tento jev by mohl být způsoben současnou přítomností obou iontů nebo interakcí těchto iontů s pyoverdinem či enzymatickým aparátem buňky.



Obr 7. Absorpční spektra vzorků představujících jednotlivá modifikovaná média (po dokončení kultivačního procesu) a nepřímá kvantifikace množství pyoverdinu (procento uvolněných iontů železa ze struktury CAS)

Závěr

Studovaný mikroorganismus produkoval siderofory. Identifikace byla provedena za základě překryvu absorpčního a emisního spektra neznámého sideroforu a standardu. Jednalo se o pyoverdin. Produkce byla přímo úměrná době kultivace a složení média mělo významný vliv na jeho produkci. Vysoká produktivita byla pozorována v případě absence stopových prvků a v přítomnosti iontů mědi. Naopak nízká produktivita byla pozorována v přítomnosti iontů železa a v případě kombinace iontů železa a mědi. Znalosti kultivačních parametrů a složení média budou důležité pro optimalizaci kultivačního procesu s cílem maximalizovat produkci pyoverdinu při co nejnižších možných finančních nákladech. HPLC systém s UV detekcí a kolonou Watrex Nucleosil 100, C 18 byl vhodnější z hlediska detekce desorbovaných nízkomolekulárních analytů (2,4-DAPG, pyocyanin a rhamnolipidy). Kolona LiChrolut® měla vyšší sorpční účinnost vůči pyoverdinu a rhamnolipidům ve srovnání s kolonou Strata®. Před registrací (a uvedením na trh) potenciálního preparátu bude nutné provést sérii testů, aby byla zajištěna jeho zdravotní nezávadnost a ekologická šetrnost. Po dokončení schvalovacího postupu by produkt mohl být oficiálně aplikován na hospodářsky významné plodiny.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou Vysoké školy chemicko-technologické – číslo projektu: A2_FPBT_2022_040

Reference

- Behnsen J., Raffatellu M.** (2016) Siderophores: More than stealing iron. *mBio*, 7, str. 1-6.
- Bradbury S. L., Jakoby W. B.** (1972) Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: Effects on aldehyde dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69, str. 2373-2376.
- Chowdappa S., Jagannath S., Konappa N., Udayashankar A. C., Jogaiah S.** (2020) Detection and characterization of antibacterial siderophores secreted by endophytic fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules*, 10, str. 1-18.
- Liu X., Cao A., Yan D., Ouyang C., Wang Q., Li Y.** (2021) Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *International Journal of Pest Management*, 67, str. 65-72.
- Louden B. C., Haarmann D., Lynne A. M.** (2011) Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education*, 12, str. 51-53.
- Schwyn B., Neilands J. B.** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, str. 47-56.
- Singh G., Bhalla A., Bhatti J., Chandel S., Rajput A., Abdullah A., Andrabi S., Kaur P.** (2013) Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3, str. 27-32.
- Vindeirinho J. M., Soares H., Soares E. V.** (2021) Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. *Appl Biochem Biotechnol*, 193, str. 607-618.
- Volcão L. M., Halicki P. C. B., Christ-Ribeiro A., Ramos D. F., Badiale-Furlong E., Andreazza R., Bernardi E., da Silva Júnior F. M. R.** (2022) Mushroom extract of *Lactarius deliciosus* (L.) Sf. Gray as biopesticide: Antifungal activity and toxicological analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85, str. 43-55.

Charakterizace extraktů *Vitis vinifera* a jejich vliv na zástupce mikroorganismů trávicího traktu

Characterization of *Vitis vinifera* extracts and their effect on representatives of microorganisms of the digestive tract

M. Ottová, Z. Barešová, O. Maťátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Náplní této práce bylo sledování vlivu laboratorně připravených extraktů z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* na suspenzní růst dvou probiotických bakterií z rodu *Lactobacillus*. Cílem práce bylo studium potenciálu těchto extraktů s vysokým obsahem biologicky aktivních látek – polyfenolů stimulovat růst zástupců probiotických mikroorganismů gastrointestinálního traktu. V této práci se podařilo prokázat stimulační účinek polyfenolových sloučenin z extraktů *Vitis vinifera* na suspenzní růst probiotických bakterií z rodu *Lactobacillus*. Extrakt z letorostů *Vitis vinifera* byl identifikován jako extrakt s největším potenciálem využití jako součást doplňků stravy zaměřených na polyfenolové látky, které podporují růst probiotických bakterií. Nejvyšší stimulace růstu bylo dosaženo u extraktu z letorostů a jeho vlivu na *Lactobacillus casei* Lafti L-26 a to při koncentraci 100 mg_{GA}/l.

Abstract

This study deals with the effect of laboratory-prepared extracts from *Vitis vinifera* pomace, stems and canes on the suspension growth of two probiotic bacteria from the genus *Lactobacillus*. The aim of the work was to investigate the potential of these extracts with a high content of biologically active substances - polyphenols to stimulate the growth of representatives of probiotic microorganisms of the gastrointestinal tract. In this work, it was possible to demonstrate the stimulating effect of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* extracts on the suspension growth of probiotic bacteria from the *Lactobacillus* genus. *Vitis vinifera* extract has been identified as the extract with the greatest potential for use as part of dietary supplements focused on polyphenolic substances, which support the growth of probiotic bacteria. The highest growth stimulation was achieved with the extract from canes and its effect on *Lactobacillus casei* Lafti L-26 at a concentration of 100 mg_{GA}/l.

Klíčová slova česky

Rostlinný extrakt, probiotika, polyfenoly, *Vitis vinifera*

Klíčová slova anglicky

Plant extract, probiotics, polyphenols, *Vitis vinifera*

Úvod

Mikroorganismy gastrointestinálního traktu bezprostředně souvisí se zdravím člověka, jejich profil a zastoupení jsou však významně ovlivněny řadou faktorů, včetně složek potravy (Hemarajata a Versalovic, 2013). Střevní mikrobiom má kromě metabolické role také roli trofickou a protektivní, které zahrnují podílení se na maturaci imunitního systému hostitele a zabránění infekci patogeny osídlením střevního prostředí. V současné době je věnována velká pozornost studiu léčebných účinků spojených s rostlinami či rostlinnými extrakty. Využívají se extrakty z rostlin i extrakty z jednotlivých rostlinných částí.

Vinná réva je světově nejvíce pěstovanou ovocnou plodinu a s jejím zpracováním je spjata velké množství odpadu, například právě ve formě matolin, třapin a letorostů vzniklých při výrobě vína. Pro tyto odpady je snaha najít alternativní využití kromě tradičního kompostování. Jednou z možností je izolace biologicky aktivních látek obsažených v odpadech a jejich aplikace ve farmaceutickém průmyslu ve formě doplňků stravy. Biologická aktivita extraktů z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* je spjata především s vysokým obsahem polyfenolů (Baydar a kol., 2006; Selma a kol., 2009). Polyfenoly mohou být potenciálně zdravotně prospěšné, a to díky jejich antioxidačním, antibakteriálním a protizánětlivým vlastnostem (Tsao, 2010).

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

V rámci experimentální práce byly použity dvě probiotické bakterie z rodu *Lactobacillus*. *Lactobacillus rhamnosus* GG byla zakoupena z CCM (Czech Collection of Microorganisms) sbírky a *Lactobacillus casei* Lafti L-26 pochází ze sbírky Ústavu mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha. Před kultivací byly mikroorganismy uloženy v hlubokomrazicím boxu v podobě kryokonzerv v 50% glycerolu při teplotě -70 °C.

Složení kultivačních médií a roztoků

Složení kultivačního MRS média pro probiotické bakterie v 1 litru destilované vody: D-glukóza bezvodá 20 g, bakteriální pepton 10 g, masový extrakt 10 g, kvasničný extrakt 5 g, octan sodný 5 g, dihydrogenfosforečnan draselný 2 g, citrát amonný 2 g, heptahydrát síranu hořečnatého 0,2 g, monohydrát síranu manganatého 0,05 g, Tween 80 1 ml.

MRS médium bylo upraveno na hodnotu pH = 6,5; bylo doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem a následně sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,5 kPa po dobu 20 minut. Po sterilaci byl do MRS média dodatečně přidán roztok glukózy (sterilovaný odděleně), tak aby její výsledná koncentrace v MRS médiu činila 20 g/l.

Roztoky extraktů z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* byly připraveny v laboratoři Aplikované biologie na Ústavu biotechnologie, VŠCHT Praha. Roztoky všech tří extraktů *Vitis vinifera* byly připraveny sušením, extrakcí a následným rozpuštěním ve 40% ethanolu (Rollová a kol., 2020). Matoliny, třapiny a zimní letorosty *Vitis vinifera* byly poskytnuty vinicí Grébovka na Praze 2 a Kutná Hora. Matoliny a třapiny pochází z odrůdy *Vitis vinifera* Rulandské šedé, letorosty pochází ze zimních řezů Ryzlinku rýnského. Vlivy extraktů byly vztaženy na jejich celkový obsah polyfenolů (TPC), Výsledné hodnoty jsou uváděny v jednotkách odpovídajících ekvivalentu kyseliny gallové vztažené na 1 litr extraktu *Vitis vinifera* (mg_{GA}/ l).

Kultivace

Pro pre-kultivaci byly kryokultury bakterií zaočkovány do 250 ml Erlenmeyerových baněk se 100 ml sterilního média. Obě probiotické bakterie z rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Lafti L-26) byly zaočkovány z kryokonzervy do 100 ml sterilního MRS média. Pre-kultivace bakterií probíhala na orbitální třepačce při otáčkách 75 min⁻¹ a teplotě 37 °C po dobu 24 h.

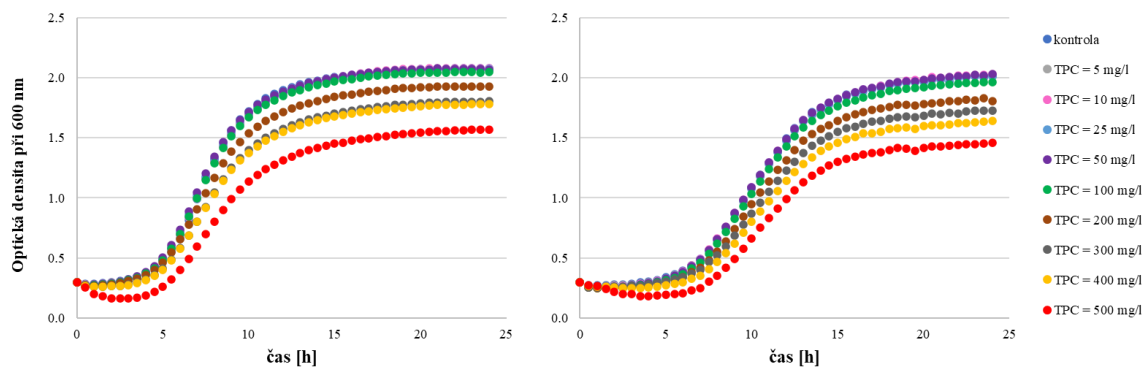
Sledování suspenzního růstu v přítomnosti extraktů *Vitis vinifera* a stanovení nárůstu buněk v porovnání s kontrolou (rel. %)

Po 24hodinové kultivaci mikroorganismů bylo inokulum odstředěno (10 min, 10 °C, 9000 g) a následně byla pomocí komplexního média upravena jeho optická densita (OD) na hodnotu OD₆₀₀ = 0,100 ± 0,015. Do každé jamky mikrotitrační destičky (Honeycomb, UK) bylo pipetováno 30 µl takto upravené suspenze inokula. Roztoky extraktů *Vitis vinifera* byly přidávány v takovém množství, aby v jednotlivých jamkách byl dosažen požadovaný obsah celkových polyfenolů. Výsledné koncentrace TPC pro jednotlivé extrakty *Vitis vinifera* určené

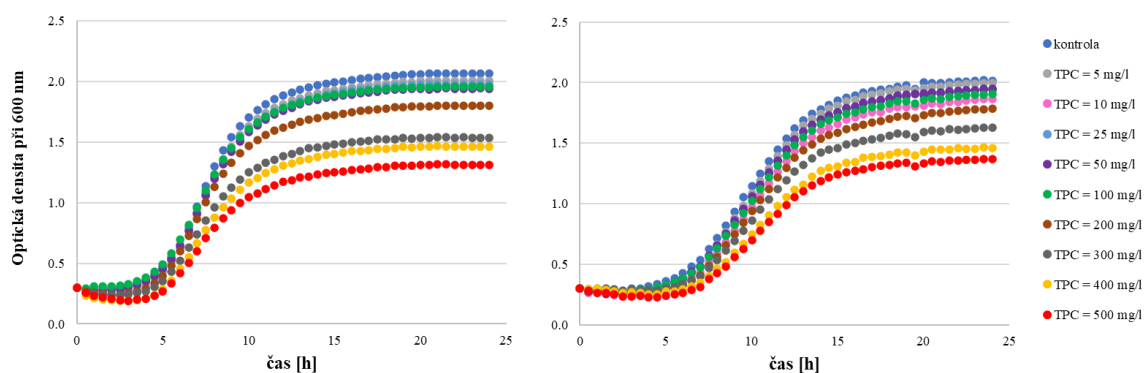
pro stanovení nárůstu suspenzních buněk vůči kontrole byly 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 a 500 mg_{GA}/l. Rozpouštědlo (40% ethanol) v jamce přitom nesmělo překročit obsah 3 %, aby nedošlo k ovlivnění růstu buněk (inhibici) samotným rozpouštědlem. Daný maximální obsah rozpouštědla byl pro oba mikroorganismy součástí kontrolních experimentů a při jeho aplikaci nebylo pozorováno ovlivnění růstu. Jamky byly poté sterilním MRS médiem doplněny na požadovaný finální objem 320 µl. Všechny experimenty probíhaly v deseti paralelách. Kultivace za účelem stanovení suspenzního růstu pro obě bakterie z rodu *Lactobacillus* probíhala v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Získané výsledky byly znázorněny graficky jako závislosti hodnoty optické density OD600 na čase, vyjadřující růstové křivky mikroorganismů. V porovnání s kontrolním vzorkem, neobsahujícím sledované biologicky aktivní látky, byla určena relativní procenta nárůstu suspenzních buněk.

Výsledky

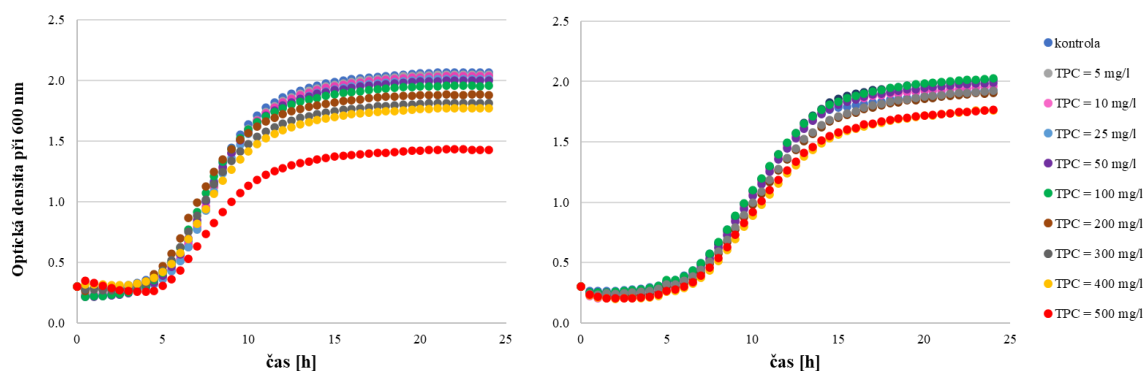
V této práci byl pomocí mikrokultivačního zařízení Bioscreen C sledován účinek extraktů z matolin (Obr. 1), třapin (Obr. 2) a letorostů *Vitis vinifera* (Obr. 3) s TPC v koncentračním rozmezí 5-500 mg_{GA}/l na suspenzní růst dvou probiotických zástupců bakterií – *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Lactobacillus casei* Lafti L-26. Suspenzní růst sledovaného probiotika *Lactobacillus casei* Lafti L-26 nebyl významně inhibován ani při aplikaci extraktů *Vitis vinifera* v nejvyšší sledované koncentraci TPC = 500 mg_{GA}/l. V případě vlivu extraktu z letorostů na růst *Lactobacillus casei* Lafti L-26 (Obr. 3) se podařilo sledovat stimulaci růstu, a to při koncentracích TPC 5 - 100 mg_{GA}/l. Nejvyšší stimulace suspenzního růstu *Lactobacillus casei* Lafti L-26 bylo dosaženo při použití extraktu z letorostů v koncentraci TPC 100 mg_{GA}/l. Při aplikaci extraktů *Vitis vinifera* na *Lactobacillus rhamnosus* GG byla se stoupající koncentrací TPC sledována vyšší citlivost na růst tohoto probiotika. V případě vlivu extraktu z matolin na růst *Lactobacillus rhamnosus* GG (Obr. 1) se podařilo sledovat stimulaci růstu a to při koncentracích TPC 5, 10 a 25 mg_{GA}/l. Nejvyšší stimulace suspenzního růstu *Lactobacillus rhamnosus* GG bylo dosaženo při použití extraktů z matolin v koncentraci TPC 10 mg_{GA}/l.



Obr. 1 Vliv extraktu z matolin *Vitis Vinifera* na suspenzní růst *Lactobacillus rhamnosus* GG (vlevo) a *Lactobacillus casei* Lafti L-26 (vpravo); kultivace po dobu 24 hodin, při 37 °C, 75 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C



Obr. 2 Vliv extraktu z třapin *Vitis Vinifera* na suspenzní růst *Lactobacillus rhamnosus* GG (vlevo) a *Lactobacillus casei* Lafti L-26 (vpravo); kultivace po dobu 24 hodin, při 37 °C, 75 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C



Obr. 3 Vliv extraktu ze zimních letorostů *Vitis Vinifera* na suspenzní růst *Lactobacillus rhamnosus* GG (vlevo) a *Lactobacillus casei* Lafti L-26 (vpravo); kultivace po dobu 24 hodin, při 37 °C, 75 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C

Závěr

V této studii bylo prokázáno, že laboratorně připravené extrakty *Vitis vinifera* mohou účinně stimulovat suspenzní růst probiotických bakteriálních kmenů z rodu *Lactobacillus* (*L. casei* Lafti L-26 a *L. rhamnosus* GG). Nejvyšší stimulace suspenzního růstu *Lactobacillus casei* Lafti L-26 bylo dosaženo při použití extraktu z letorostů v koncentraci 100 mg_{GA}/l.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2021_048.

Literatura

- Baydar N. G., Sagdic O., Ozkan G., Cetin S. (2006) Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, str. 799-804.
- Hemarajata P., Versalovic J. (2013) Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6, str. 39-51.
- Rollová M., Gharwalová L., Krmela A., Schulzová V., Hajšlová J., Jaroš P., Kolouchová I., Mařátková O. Grapevine extracts and their effect on selected gut-associated microbiota: In vitro study. *Czech Journal of Food Sciences*, 38, 2020, str. 137-143.
- Selma M. V., Espín J. C. a Tomás-Barberán F. A. (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), str. 6485-6501.
- Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 (12), str. 1231-1246.

Metody zelené syntézy nanočástic kovů

Green synthesis methods of metal nanoparticles

M. Šivel, J. Michailidu, O. Mařátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nanočástice kovů získané s využitím metod biologických syntéz jsou často diskutovaným tématem díky jejich jedinečným vlastnostem a širokému potenciálu možností přípravy i aplikace. Jejich uplatnění lze předpokládat například v elektrotechnice, v textilním průmyslu nebo v medicíně.

Mezi možnosti metod zelené syntézy nanočástic patří využití jak celých organismů tak jejich komponent či individuálních biologicky aktivních látek. Jsou zkoumány možnosti využití bakterií, kvasinek, mikromycet, řas, rostlin či jejich extraktů.

V tomto příspěvku práci je uveden přehled metod řazených mezi zelenou syntézu u nichž byl zjištěn potenciál pro syntézu nanočástic kovů, zvláště zlata a stříbra.

Abstract

Metal nanoparticles obtained using biological synthesis methods are a frequently studied topic due to their unique properties and a wide potential of preparation and application possibilities. Their application can be proposed in electrical engineering, in the textile industry or in medicine.

The possibilities of green nanoparticle synthesis methods include the use of both whole organisms and their components or individual biologically active substances. The possibilities of using bacteria, yeast, micromycetes, algae, plants or their extracts are investigated.

In this work, an overview of the methods classified as green synthesis is presented, in which the potential for the synthesis of metal nanoparticles, especially gold and silver, has been identified.

Klíčová slova: nanočástice stříbra; zelená syntéza; rostlinná syntéza

Klíčová slova anglicky: silver nanoparticles; green synthesis; plant synthesis

Zelená syntéza

Do zelené syntézy řadíme široké spektrum biologických metod vedoucích k tvorbě stabilních nanostruktur. Zelená syntéza je velmi aktuálním tématem, jelikož se jedná o méně ekologicky a ekonomicky náročnou alternativu k fyzikálním či chemickým postupům syntézy. Narozdíl od chemických metod se při biologické syntéze nepoužívají toxická činidla, která jsou nebezpečná pro životní prostředí. Mimo jiné fyzikální metody vyžadují k chodu samotné reakce často velké množství energie, což vede také ke znatelnému zvýšení nákladů. Ve všech těchto aspektech zelená syntéza nanočástic tyto metody překonává, jelikož příprava nanočástic tímto způsobem probíhá často za laboratorní teploty a reakčním agens je kromě prekursoru kovu pouze daný biologický činitel (Ahmed a kol., 2016, Thakkar a kol., 2010, Yadi a kol., 2018).

Zelená syntéza nanočástic jsou metody fungující na principu redukce a následné stabilizace nanočástic pomocí přírodních látek. Výhoda zelené syntézy je produkce vysoce stabilních nanočástic za výrazně nízkých ekonomických nákladů a minimálních negativních dopadů na životní prostředí. V metodice syntézy jsou aplikovány celé živé rostliny, části rostlin nebo rostlinné extrakty. Jako příklad biomolekul, které se podílí na syntéze, lze jmenovat bílkoviny, aminokyseliny, polysacharidy, alkaloidy, taniny, fenoly, saponiny, terpenoidy či vitaminy. Charakter biologicky aktivních látek podílejících se na syntéze a jejich koncentrační zastoupení výrazně ovlivňuje konečné vlastnosti syntetizovaných nanočástic. Další možný postup biologické syntézy je příprava nanočástic pomocí mikroorganismů. Biosyntéza nanočástic byla mnoha studiemi pozorována u bakterií, kvasinek, řas a u mikromycet. U tohoto typu biosyntézy jsou nanočástice produkovány jako intracelulární nebo extracelulární produkt (Ahmed, Ahmad, Swami and Ikram, 2016, Chintamani a kol., 2018, Thakkar, Mhatre and Parikh, 2010, Yadi, Mostafavi, Saleh, Davaran, Aliyeva, Khalilov, Nikzamir, Nikzamir, Akbarzadeh, Panahi and Milani, 2018).

Biosyntéza nanočástic pomocí bakterií

Díky svému širokému uplatnění je biologická syntéza pomocí bakterií často zkoumanou metodou. Hlavními výhodami jsou snadná kultivace a možný scale-up celého procesu. Mechanismus tvorby nanočástic je zprostředkován redukčními enzymy a stabilizačními proteiny, které jsou produkovány bakteriální buňkou. Exaktní mechanismus biosyntézy však dosud nebyl přesně popsán. Podle umístění redukce kovových iontů můžeme celý proces rozdělit na extracelulární či intracelulární syntézu. Výhoda extracelulární syntézy je jednodušší

separace produktu. Po intracelulární biosyntéze je vyžadováno použití fyzikálních (ultrasonifikace, sterilace) či chemických (detergenty, enzymy) metod pro rozpad buňky a následnou separaci produktu od buněčného lyzátu. Výsledné vlastnosti produkovaných nanočástic závisí na kultivačních podmínkách a produkčním bakteriálním kmenu (Rana a kol., 2020, Thakkar, Mhatre and Parikh, 2010).

Skupina výzkumníků Singh a kol. popisuje ve své studii intracelulární biosyntézu stříbrných nanočástic pomocí bakterie *Weissella oryzae* DC6. Buňky byly kultivovány v TSB (tryptic soy broth) médiu po dobu 24 hodin, při 120 rpm a 37 °C. Následně byla kultura izolována centrifugací, po které byl buněčný koncentrát kultivován 24 hodin za přítomnosti AgNO₃ o koncentraci 1 mmol/l při podmínkách 200 rpm a 25 °C. Dalším krokem byla opakovaná ultrasonikace a následná centrifugace při 20 000 rpm po dobu 10 minut pro konečnou izolaci stříbrných nanočástic. Přítomnost nanočástic byla prokázána technikami UV-Vis spektrofotometrií, TEM, energiově disperzní spektrometrií (EDS) a rentgenovou strukturní analýzou (XRD).

Biosyntéza nanočástic pomocí kvasinek

Kvasinky jsou hojně využívány při fermentačních procesech zejména v potravinářství. Jedná se o nejpodrobněji prozkoumaný mikroorganismus z hlediska biotechnologie. Syntéza nanočástic pomocí kvasinkových kultur byla popsána mnoha studiemi. Nebylo však dosud popsáno přímé zapojení kovových nanočástic do metabolismu kvasinky. Jedná se tedy pravděpodobně o obranný mechanismus před buněčným stresem. Přítomnost iontů kovu spouští metabolickou kaskádu vedoucí k syntéze sloučenin eliminujících tento buněčný stres. Jako příklad takových látek, o nichž je známo, že se podílí na syntéze nanočástic, lze uvést fytochelatin, metalothioneiny a glutathion. Další mechanismus tvorby nanočástic je zprostředkován pomocí oxidoreduktáz, které jsou aktivovány zvýšením hladiny pH, což je zapříčiněno navázáním kovových iontů na cytoplazmatickou membránu (Rana, Yadav and Jagadevan, 2020, Thakkar, Mhatre and Parikh, 2010).

Biosyntézu stříbrných nanočástic pomocí *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 popsala studie Apte a kol. Výsledné nanostruktury byly charakterizovány pomocí UV-Vis spektrofotometrie, skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) a infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR). Kultivace byla provedena v kultivačním médiu YNB (yeast nitrogen base) při 20 °C, 130 rpm po dobu 48 hodin. Po kultivaci byla biomasa odstředěna a pelety byly několikrát promyty destilovanou vodou. Následně byla kultura resuspendována v 1 mM

roztoku AgNO_3 a kultivována dalších 120 hodin při podmínkách 20 °C a 130 rpm. Konečná suspenze byla znovu odstředěna a supernatant s precipitátem byly podrobeny analýze, při níž byla potvrzena úspěšná syntéza stříbrných nanočástic sférického tvaru o velikosti 15 nm (Apte a kol., 2013). Studie Waghmare a kol. popisuje biosyntézu stříbrných nanočástic pomocí *Candida utilis* (NCIM 3469). Nanočástice byly poté analyzovány technikami UV-Vis spektrofotometrie a SEM.

Biosyntéza nanočástic pomocí mikromycét

Zájem výzkumníků o syntézu kovových nanočástic pomocí vláknitých hub vzrostl kvůli možnosti produkce vysoce stabilních nanočástic, které jsou chráněny před molekulární agregací i při delším skladování, což je způsobeno mikrobiálními produkty s biologickou aktivitou. Naopak nevýhodou použití eukaryotického organismu jsou složitější genové manipulace pro zvýšení exprese enzymů, které se na syntéze nanočástic podílejí. Byly popsány biosyntézy, které probíhaly intracelulárně, extracelulárně nebo kombinovaně. Jedním z možných mechanismů extracelulární syntézy nanočástic začíná elektrostatickou interakcí mezi kladně nabitými kovovými ionty a záporně nabitou karboxylovou skupinou lysinu v buněčných stěnách mycelia. Tato interakce posléze vede k extracelulární redukci kovových iontů na nanočástice pomocí NADPH-dependentních enzymů. Vznikající nanočástice jsou stabilizovány pomocí funkčních skupin membránových proteinů nebo pomocí peptidů a proteinů, které jsou produkovány extracelulárně. Příkladem peptidu podílejícího se na stabilizaci nanostruktury je fytochelatin. Intracelulární syntéza nastává, když ionty kovů difundují buněčnými membránami a redukují se na nanočástice kovů (Rana, Yadav and Jagadevan, 2020, Thakkar, Mhatre and Parikh, 2010). Studie Devi a Joshi popisuje biosyntézu nanočástic stříbra pomocí *Aspergillus tamarii* PFL2, *Aspergillus niger* PFR6 a *Penicillium ochrochloron* PFR8. Syntetizované nanočástice byly charakterizovány pomocí UV-Vis spektrofotometrie, TEM, SEM a EDS. Buňky byly kultivovány v PDB (potato dextrose broth) médiu 96 hodin při 120 rpm a 25 °C. Biomasa byla poté filtrována přes filtrační papír a několikrát promyta destilovanou vodou. Dále byly buňky opět kultivovány ve sterilované destilované vodě při 25 °C a 120 rpm po dobu 48 hodin. Následně byla buněčná suspenze filtrována přes mikrofiltr. Filtrát bez buněčné kultury byl smíchán s roztokem AgNO_3 , přičemž výsledná koncentrace byla 1 mmol/l. Reakční směs byla ponechána 72 hodin v temnu při laboratorní teplotě. Nanočástice biosyntetizované pomocí *A. tamarii* PFL2 byly sférického tvaru a velikosti $3,5 \pm 3,0$ nm.

Biosyntéza nanočástic pomocí řas

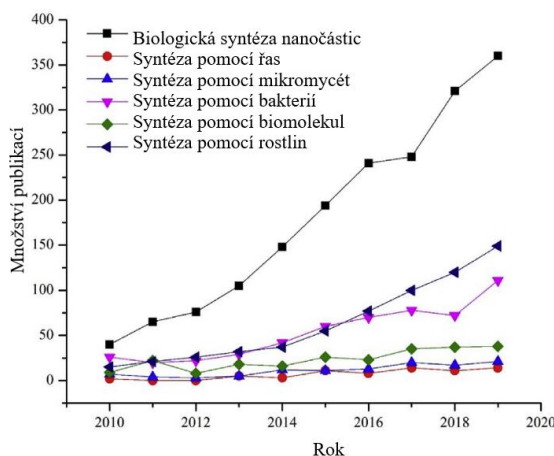
Řasy jsou eukaryotické organismy, které mají do budoucna potenciál uplatnění v biotechnologiích, a nalézají využití také v nanotechnologiích pro svou schopnost bioakumulace a následné redukce iontů kovů. Biomolekuly (polysacharidy, peptidy a pigmenty) přítomné v řasách obsahující karboxylové, thiolové, hydroxylové a aminové funkční skupiny jsou klíčové pro redukcí kovových iontů a stabilizaci nově vytvořených nanočástic. Biologická cesta pro syntézu nanočástic je zde iniciována adsorpcí iontů kovů na povrch buněk řas. Na základě umístění redukční reakce se syntéza opět dělí na extracelulární a intracelulární. Studie provedená Dahoumaneem a kol. odhalila, že k biologické redukci došlo v thylakoidních membránách *Cosmarium impressulum*. Redukované formy kovových atomů byly poté ve shlucích transportovány z buňky v obalech, jejichž složení se podobá struktuře buněčné stěny (Ahmad a kol., 2022, Dahoumane a kol., 2014, Rana, Yadav and Jagadevan, 2020, Thakkar, Mhatre and Parikh, 2010).

Studii Kathiraven a kol. byla popsána biosyntéza stříbrných nanočástic pomocí *Caulerpa racemosa*. Vzniklé nanočástice byly analyzovány UV-Vis spektrofotometrií, TEM, FTIR a XRD. Řasa byla po ukončení kultivace promyta sterilovanou vodou, nakrájena a usušena. Suchá biomasa byla rozemleta na prášek, přičemž 1 g biomasy sloužil k inokulaci 250 ml kónické baňky se 100 ml sterilované vody. Takto připravená biomasa byla kultivována po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po kultivaci byla suspenze filtrována přes mikrofiltr k získání bezbuněčného extraktu. Pro biosyntézu byl extrakt smíchán v poměru 1:9 s 1 mM roztokem AgNO₃. Reakční směs byla 24 hodin ponechána v laboratorní teplotě. Byly syntetizovány stříbrné nanočástice sférického a triangulárního tvaru o velikostech od 5 do 25 nm.

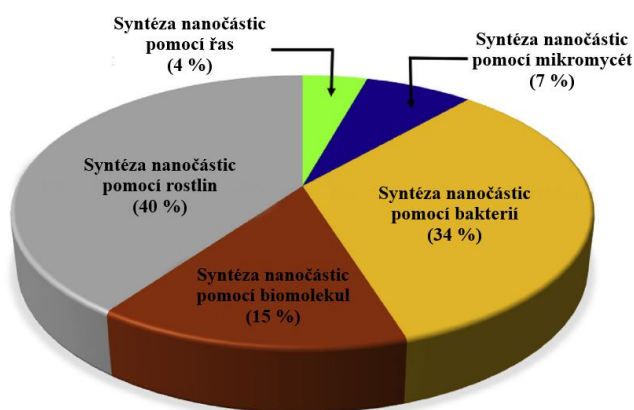
Biosyntéza nanočástic pomocí rostlin

Většina dnešních studií, které se zabývají syntézou kovových nanočástic biologickou cestou, souvisí s uplatněním rostlin. Důvodem velkého zájmu o tento druh syntézy jsou její jednoduchost a malá ekonomická náročnost. V samotné syntéze nanočástic jsou v metodice používány rostlinná pletiva nebo extrakty z různých částí rostliny. Je známo, že rostliny produkují širokou škálu antioxidantů a sekundárních metabolitů, které se uplatňují v mnoha rozličných mechanismech bránících oxidativnímu poškození buněk. Podobný mechanismus pak může být uplatněn při tvorbě kovových nanočástic z kovových iontů. Jako příklady látek,

které se účastní biosyntézy, lze uvést polyfenoly, flavonoidy, steroly, triterpeny, alkaloidy, saponiny, vitaminy, aminokyseliny, polysacharidy či enzymy. Přesný mechanismus syntézy nanočástic nebyl dosud popsán. Důležitým faktorem ovlivňujícím charakteristiku vznikajících nanočástic je škála přítomných biologicky aktivních látek a jejich koncentrace. Použití různých druhů rostlin tudíž vede k syntéze nanočástic s odlišnými vlastnostmi (Chintamani, Salunkhe and Chavan, 2018, Rana, Yadav and Jagadevan, 2020, Vanlalveni a kol., 2021). Technologie syntézy využívající rostlinné extrakty je v porovnání s metodami využívající živé rostliny méně časově náročná a také méně komplikovaná. Proto je syntéza pomocí extraktů častěji diskutovaným tématem pro svůj potenciál v budoucnu nahradit fyzikální a chemické metody v průmyslovém měřítku (Iravani, 2011).



Obr 1: Množství publikací zabývajících se zelenou syntézou, převzato Rana a kol. 2020



Obr 2: Charakteristika zastoupení jednotlivých druhů biologických syntéz v publikacích, převzato Rana a kol. 2020

Syntézu zlatých nanočástic popisuje studie Gardea-Torresdey a kol. pomocí rostliny *Medicago sativa*. Před biosyntézou byla semínka dekontaminována 3 % roztokem formaldehydu a poté promyty destilovanou vodou. Následně byly asepticky umístěny do nádob se specificky navrženou živnou půdou, která byla bohatá na AuCl_4^- . Kultivace probíhala ve vegetační komoře s 12hodinovou fotoperiodou v teplotách o rozmezí od 18 do 25 °C. Vzniklé nanočástice byly charakterizovány pomocí TEM a EDS. Analytickými technikami byly popsány biosyntetizované nanočástice o velikostech 4 až 10 nm (Gardea-Torresdey a kol., 2002). Studie Bali a kol. píše o biosyntéze kovových nanočástic pomocí *Medicago sativa*, *Brassica juncea* a *Helianthus annuus*. Všechny rostliny byly pěstovány hydroponicky v demineralizované vodě 3 až 4 týdny pod umělým světlem. Poté byly kultivovány na Petriho miskách se živnou půdou, která byla obohacena Ag, Ni, Zn, Co nebo Cu ionty. V rámci experimentu byly regulovány podmínky kultivace, mezi které lze zařadit různé koncentrace iontů kovu a variabilní dobu kultivace. Nakonec byly vzorky usušeny a upraveny pro analytické účely. Data ukázala, že nejlepší bioakumulační vlastnosti z testovaných subjektů má *Brassica juncea*. Z testovaných iontů byly akumulovány nejvíce Ag^+ a Co^{2+} nejméně. Pomocí TEM byly pozorovány sférické nanočástice, přičemž velikost nanočástic ve studii nebyla uvedena. V případě syntézy stříbrných nanočástic bylo u testovaných rostlin dosaženo akumulace vedoucí až k hmotnostnímu zlomku 0,092 v sušině biomasy (Bali a kol., 2006).

Literatura

- Ahmad A., Banat F., Alsafar H., Hasan S. W. (2022) Algae biotechnology for industrial wastewater treatment, bioenergy production, and high-value bioproducts. *Sci. Total Environ.*, 806, str. 21.
- Ahmed S., Ahmad M., Swami B. L., Ikram S. (2016) A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J. Adv. Res.*, 7 (1), str. 17-28.
- Apte M., Sambre D., Gaikawad S., Joshi S., Bankar A., Kumar A. R., Zinjarde S. (2013) Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin. *AMB Express*, 3, str. 8.
- Bali R., Razak N., Lumb A., Harris A. T., Ilee In *The synthesis of metallic nanoparticles inside live plants*, International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, Brisbane, AUSTRALIA, Jul 03-07; Ilee: Brisbane, AUSTRALIA, 2006; pp 224-227.
- Dahoumane S. A., Yepremian C., Djediat C., Coute A., Fievet F., Coradin T., Brayner R. (2014) A global approach of the mechanism involved in the biosynthesis of gold colloids using micro-algae. *J. Nanopart. Res.*, 16 (10), str. 12.
- Gardea-Torresdey J. L., Parsons J. G., Gomez E., Peralta-Videa J., Troiani H. E., Santiago P., Yacaman M. J. (2002) Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett.*, 2 (4), str. 397-401.
- Chintamani R. B., Salunkhe K. S., Chavan M. J. (2018) EMERGING USE OF GREEN SYNTHESIS SILVER NANOPARTICLE: AN UPDATED REVIEW. *Int. J. Pharm. I Sci. Res.*, 9 (10), str. 4029-4055.

- Iravani S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, 13 (10), str. 2638-2650.
- Rana A., Yadav K., Jagadevan S. (2020) A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *J. Clean Prod.*, 272, str. 25.
- Thakkar K. N., Mhatre S. S., Parikh R. Y. (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol*, 6 (2), str. 257-262.
- Vanlalveni C., Lallianrawna S., Biswas A., Selvaraj M., Changmai B., Rokhum S. L. (2021) Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. *RSC Adv.*, 11 (5), str. 2804-2837.
- Yadi M., Mostafavi E., Saleh B., Davaran S., Aliyeva I., Khalilov R., Nikzamir M., Nikzamir N., Akbarzadeh A., Panahi Y., Milani M. (2018) Current developments in green synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts: a review. *Artif. Cell. Nanomed. Biotechnol.*, 46, str. 336-343.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2022**

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Editor: Olga Mařátková

Rok vydání: 2022

Počet stran: 50

ISBN: 978-80-7592-136-9

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF.