

## СКРИНИНГ ОБРАЗОВАНИЯ БИОСУРФАКТАНТОВ ШТАММАМИ *YARROWIA LIPOLYTICA* И ОЦЕНКА ИХ АНТИБИОПЛЕНОЧНОЙ И АНТИАДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВ БИОПЛЕНОК *SALMONELLA ENTERICA* SER. ENTERITIDIS

© 2022 г. Ф. Шатила<sup>а</sup>, Е. Уйар<sup>б</sup>, Х. Т. Ялсин<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Университет Эге, факультет естественных наук, отделение биологии,  
кафедра общей и промышленной микробиологии, Измир, Турция

<sup>б</sup>Университет Харран, факультет искусств и наук, отделение биологии, Санлиурфа, Турция

\*e-mail: tanselozturk@hotmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2021 г.

После доработки 19.02.2021 г.

Принята к публикации 19.02.2021 г.

Проведен скрининг способности образовывать биосурфактанты у дрожжевого штамма (TY24), выделенного из образца пищи, и штамма, идентифицированного ранее как *Yarrowia lipolytica* TEM OS12. Результаты, полученные для обоих штаммов на агаре СТАВ-МВ, с помощью методов уплощения капли, вытеснения масла и с использованием Parafilm M, были положительными. Кроме того, как изолят TY24, так и *Y. lipolytica* TEM OS12 продуцировали липазы, обладали β-гемолитической активностью и снижали поверхностное натяжение с 57.5 до 33.5 и 35.5 мН м<sup>-1</sup> соответственно. Анализ последовательностей ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК позволил идентифицировать новый изолят как *Y. lipolytica* TY24. Совместная инкубация *Salmonella enterica* ser. Enteritidis с повышающимися объемами поверхностно-активных биосурфактантов из культур *Y. lipolytica* TEM OS12 и *Y. lipolytica* TY24 снижала образование биопленок на 89.42 и 88.09% соответственно. Бесклеточный супернатант исследованных дрожжевых культур эффективно тормозил развитие биопленок сальмонеллы.

**Ключевые слова:** *Yarrowia lipolytica*, скрининг, биосурфактант, биопленки сальмонелл, антибиопленочная активность

DOI: 10.31857/S0026365622010128

Грамположительная патогенная бактерия *Salmonella enterica* способна образовывать устойчивые прикрепленные сообщества (биопленки). Биопленки представляют собой агрегаты микробных клеток, окруженные экзополисахаридным матриксом, действующим в качестве структурного компонента и защитного барьера. Они проявляют повышенную устойчивость к стрессовым факторам, в том числе, к антимикробным агентам. Биопленки являются серьезной проблемой в здравоохранении и причиной значительных экономических потерь в медицине и промышленности (Peng, 2016).

Устойчивость таких прикрепленных сообществ на поверхности растений способствует переносу патогенов с сельскохозяйственных растений к людям (Barak, Liang, 2008; Teplitzki et al., 2009; Steenackers et al., 2012; Amrutha et al., 2017). Биопленки, формируемые некоторыми видами сальмонелл на поверхности эпителиальных клеток и камней в желчном пузыре человека, являются резервуаром бактерий, ответственных за хрониче-

ские и острые инфекции (Steenackers et al., 2012; Gunn et al., 2014). Биопленки, образуемые сальмонеллами на поверхности материалов, используемых на фермах, бойнях, в пищевой промышленности и в домашнем хозяйстве, также представляют собой важную проблему для пищевой промышленности. Они могут вызывать вспышки пищевых инфекций и экономические потери вследствие контаминации продукции и порчи оборудования (Giaouris et al., 2012; De Oliveira et al., 2014; Borges et al., 2018). Проблемы с биопленками сальмонелл усугубляются их повышенной устойчивостью к антибиотикам, вследствие чего разработка новых подходов к борьбе с биопленками является актуальной.

Биосурфактанты – это поверхностно-активные метаболиты, синтезируемые бактериями, дрожжами и грибами. Обладая амфифильной структурой, сурфактанты являются отличными эмульсифицирующими, диспергирующими и вспенивающими агентами. Их преимущества перед химически синтезируемыми сурфактантами включают

малую токсичность, восприимчивость к биодegradации, разнообразие применений и эффективность в экстремальных условиях (Pascua-Plascencia et al., 2011). Благодаря этим привлекательным чертам, биосурфактанты широко применяются во многих областях, включая фармакологическую, биомедицинскую и пищевую промышленность. Кроме того, они обладают антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами. Широкий спектр антибактериальной активности биосурфактантов связан с их способностью нарушать целостность клеточных мембран и клеточных стенок, а также ингибировать рост микроорганизмов (Plaza, Acha, 2020). Они также могут оказаться биодетергентами, полезными для целого ряда медицинских применений (Harshada, 2014). Кроме того, сообщалось об антиадгезивных и антибиопленочных свойствах сурфактантов (Naughton et al., 2019). Они могут влиять на характеристики поверхности и уменьшать их адгезивные свойства. Поэтому они считаются подходящими для покрытия поверхностей пищевого и биомедицинского назначения, включая стекло, силиконовую резину, хирургические имплантаты и катетеры, а также голосовые протезы (Sadekuzzman et al., 2015).

Целью данной работы было выделить и идентифицировать штамм дрожжей, синтезирующий биосурфактанты. Полученный изолят, а также ранее выделенный штамм, исследовали на предмет способности синтезировать биосурфактанты; были изучены антиадгезивные и антибиопленочные свойства супернатантов, содержащих биосурфактанты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Микроорганизмы и выделение биосурфактант-продуцирующего штамма.** Образцы почвы, загрязненной сырой нефтью, были отобраны в промышленной зоне вблизи Измира, Турция. Навеску почвы (5 г) добавляли в колбу с 50 мл среды MSM следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1.8;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;  $\text{NaCl}$  – 0.1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 4. В качестве источника углерода использовали соевое масло (1%, об.). Колбы инкубировали в течение 7 сут на качалке (150 об./мин) при 27°C.

В данной работе способность к синтезу биосурфактантов была изучена для двух штаммов: нового изолята TY24 и штамма *Y. lipolytica* TEM OS12, выделенного и идентифицированного нами ранее (Yalçın et al., 2018). На следующей стадии супернатанты этих культур использовали в экспериментах по подавлению биопленкообразования.

Штамм сальмонеллы, выделенный нами ранее в птицеводческом хозяйстве, был идентифицирован как *Salmonella enterica* ser. Enteritidis TM6.

Этот изолят использовали в экспериментах по ингибированию биопленкообразования, поскольку ранее была показана его способность образовывать мощные биопленки (Shatila et al., 2020). Штамм был депонирован в Университете Эге, в лабораториях кафедры общей и промышленной микробиологии. Перед экспериментом культуру подращивали в течение ночи в среде Tryptic Soy Broth (TSB) при 37°C.

**Приготовление бесклеточных супернатантов (БКС).** Штаммы засеивали в 250-мл колбы Эрленмейера с 50 мл среды MSM и соевым маслом (1%, об.). Колбы инкубировали, как описано выше. Затем клетки отделяли центрифугированием в течение 25 мин при 3600 g. Далее супернатанты стерилизовали фильтрацией через 0.22-мкм мембраны ("Sartorius Minisart", Германия). Бесклеточные супернатанты исследовали на предмет наличия биосурфактантов.

**Гемолитическая активность.** Гемолитическую активность определяли на кровяном агаре с 5% (об.) свежей овечьей крови. БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре, сделанные стерильным пробочным сверлом. Чашки инкубировали 48 ч при 30°C. Прозрачные зоны вокруг лунок указывали на наличие гемолитической активности (Youssef et al., 2004).

**Липолитическая активность.** Продукцию липаз определяли на солодово-дрожжевом пептонном агаре (среда MYGPA) с 1% (об.) трибутирина. БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре, чашки инкубировали при 28°C в течение 48–72 ч. Зоны гало вокруг лунок, возникшие в результате гидролиза трибутирина, указывали на наличие липолитической активности.

**Метод со СТАВ агаром.** Метод с цетримониум бромидом-метиленовым синим (СТАВ-МВ) использовали для определения наличия внеклеточных анионных сурфактантов. В MSM агар добавляли 0.2 г/л СТАВ и 0.005 г/л метиленового синего (Siegmond, Wagner, 1991). БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре. Чашки инкубировали 48–72 ч при 30°C, а затем выдерживали 48 ч при 4°C для развития окрашивания. Образование темно-синего гало указывало на присутствие биосурфактантов гликолипидного типа.

**Вытеснение масла.** Тест проводили, как было описано ранее (Yalçın et al., 2018). Дистиллированную воду (40 мл) вносили в чашки Петри. Использованное моторное масло (3 мл) равномерно наносили поверх слоя воды. В центр масляного слоя вносили БКС исследуемых дрожжевых штаммов (0.5 мл) и измеряли диаметр образующейся прозрачной зоны. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду. Приведены средние результаты трех экспериментов в виде среднее  $\pm$   $\pm$  среднеквадратичное отклонение.

**Тест с парафилом М.** БКС (25 мкл) наносили на гидрофобную поверхность парафила М и через 60 с определяли размер и форму капель. Положительным считался результат, при котором капля была не сферической, а ее диаметр превышал 4 мм. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду.

**Метод уплощения капли.** Тест проводили как описано ранее (Youssef et al., 2004), с небольшими модификациями. Использованное машинное масло (2 мкл) вносили в ячейки стерильного планшета. Планшет оставляли на 24 ч при комнатной температуре, после чего вносили БКС (20 мкл) в каждую ячейку. Если капля растекалась по покрытой маслом поверхности, результат считали положительным.

**Поверхностное натяжение.** Поверхностное натяжение ( $\text{мН м}^{-1}$ ) определяли для БКС штаммов *Y. lipolytica* OS12 и TY24. Измерения проводили на тензиометре Krüss K6 (“KRÜSS GmbH”, Германия) по методу дю Нуи (отрыва кольца). Показаны средние результаты трех измерений при комнатной температуре. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду (Gudiña et al., 2010).

**Молекулярная идентификация штамма TY24.** ДНК выделяли, как описано ранее (Liu et al., 2000). Для амплификации ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 доменов 26S рРНК генов использовали праймеры ITS1-ITS4 и NL1-NL4 соответственно. Последовательности праймеров: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS4 (5'-TCC TCC CC GCT TAT TGA TATG C-3'), NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') и NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). Амплификацию проводили на устройстве Gradient Palm-Cycler model CGI-96 (“Corbett Life Science”) в течение 40 циклов при следующих условиях: денатурация – 1 мин при 95°C; отжиг – 1 мин при 58°C; элонгация – 2 мин при 72°C; и финальная элонгация – 10 мин при 72°C. ПЦР-продукты секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL (“Applied Biosystems”, США). Эволюционную историю полученных последовательностей определяли с использованием метода Neighbor Joining (Saitou, Nei, 1987). Филогенетические деревья строили с использованием программы Mega X (Kumar et al., 2018). Эволюционные расстояния вычисляли по методу Тамура–Ней (Tamura, Nei, 1993). Анализировали 11 и 12 нуклеотидов для ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК генов соответственно. Финальный набор данных для ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК генов включал 655 и 3138 позиций соответственно. Значения bootstrap-поддержки для 1000 деревьев указаны в узлах ветвле-

ния (Felsenstein, 1985). Последовательности всех типовых штаммов, использованных для построения филогенетического дерева, были получены из базы данных NCBI GenBank.

**Образование биопленок *Salmonella enterica* ser. Enteritidis.** Для штамма *Salmonella* Enteritidis, использованного в работе, было ранее показано активное образование биопленок. В ячейки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл среды LB без NaCl, инокулировали их штаммом сальмонеллы и инкубировали 24 ч в статических условиях при 37°C. Затем вносили кристаллический фиолетовый (CV) и определяли образование биопленок, как описано ранее (Shatila et al., 2020).

**Антиадгезивная и антибиопленочная активность БКС.** БКС из культур штаммов *Y. lipolytica* TY24 и TEM OS12 использовали для изучения ингибирования биопленок. Для исследования антиадгезивного эффекта БКС (200 мкл) вносили в каждую ячейку 96-луночного планшета. После 18-ч инкубации при 4°C, ячейки ополаскивали стерильным PBS. Ячейки инокулировали, и образование биопленок проходило в условиях, описанных выше. Через 24 ч вносили кристаллический фиолетовый для определения биопленкообразования, как описано выше.

Антибиопленочный эффект оценивали также по модифицированному методу, предложенному Khiralla et al. (2015). Различные объемы БКС (10, 20, 40, 60 и 80 мкл) инкубировали с 50 мкл суточной культурой сальмонеллы в ячейках, содержащих 100 мкл LB без NaCl. Объем в контрольных ячейках доводили до того же значения, что в эксперименте, добавляя стерильную среду вместо БКС. Контроль стерильности содержал неинокулированную среду. Через 24 ч вносили кристаллический фиолетовый для определения биопленкообразования, как описано выше. Значения оптической плотности в эксперименте сравнивали со значениями в контроле.

Процент ингибирования вычисляли согласно уравнению:

$$\text{Ингибирование (\%)} = \frac{OD(c) - OD(t)}{OD(c)} \times 100,$$

где  $OD(c)$  и  $OD(t)$  – значения  $OD_{590}$  в контроле и в опыте соответственно.

**Статистический анализ.** Данные анализировали, используя программный пакет GraphPad. Результаты представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Продукция биосурфактантов дрожжевыми штаммами.** Для определения способности изучаемых штаммов синтезировать биосурфактанты использовали несколько качественных и количественных ме-

**Таблица 1.** Образование биосурфактантов исследуемыми штаммами

Штамм/образец	HA	LA	СТАВ	DC	PM	ODD(см)/ODA(см <sup>2</sup> )	ST (мН м <sup>-1</sup> )
TY24	β-Гемолиз	+	+	+	+	6.0 ± 0.5/28.27	33.5 ± 1
TEM OS12	β-Гемолиз	+	+	+	+	5.0 ± 0.4/19.64	35.5 ± 1
SDS			+	+	+	7.0 ± 0.5/38.48	38 ± 1
MSM			–	–	–	0.8 ± 0.2/0.50	57.5 ± 1

Примечание. HA – гемолитическая активность; LA – липолитическая активность; СТАВ – рост на СТАВ-МВ агаре; DC – уплощение капли; PM – тест с Parafilm; ODD – вытеснение масла, см; ODA – площадь вытеснения масла, см<sup>2</sup>; ST – поверхностное натяжение, мН м<sup>-1</sup>; SDS – положительный контроль, 1% додецилсульфат натрия; MSM – отрицательный контроль, среда MSM.

тодов. Оба штамма обладали β-гемолитической и липолитической активностью. На СТАВ-МВ агаре вокруг их колоний образовывались темно-синие зоны. Капли БКС, нанесенные на поверхность масла или парафила М, имели больший диаметр, чем в контроле. БКС из культур штамма TY24 и *Y. lipolytica* TEM OS12 вытесняли масло на 6 и 5 см соответственно. Поверхностное натяжение снижалось с 57.5 до 33.5 и 35.5 мН м<sup>-1</sup> соответственно. Таким образом, БКС изученных штаммов понижали поверхностное натяжение на 41.7 и 38.3%, что выше значения для положительного контроля (33.91%). Эти результаты указывают на продукцию сурфактантов (табл. 1, рис. 1).

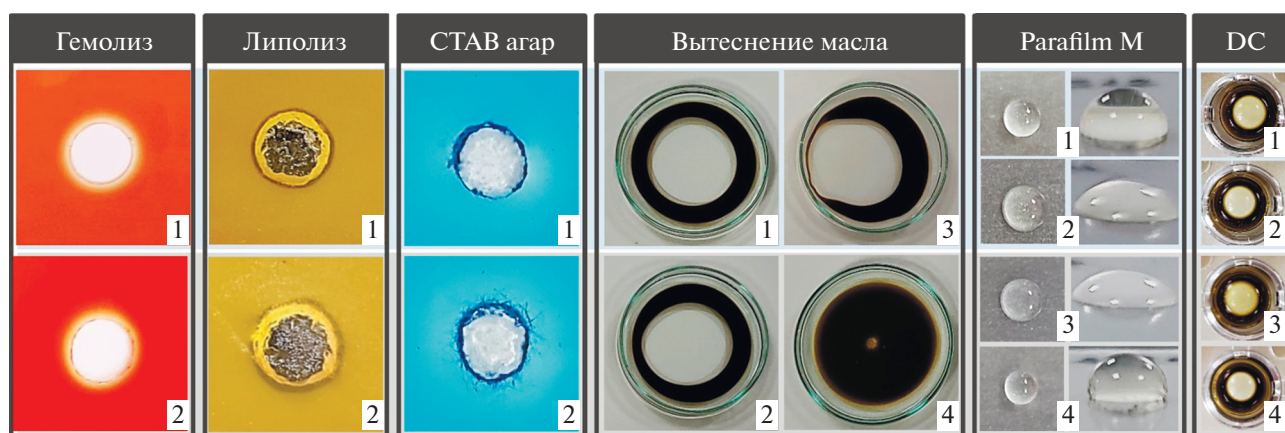
**Молекулярный анализ штаммов-продуцентов биосурфактантов.** В результате ПЦР амплификации ITS1-5.8S-ITS2 и 26S рРНК регионов штамма TY24 были получены ампликоны длиной 350 и 565 пн. После сравнения с последовательностями, доступными в базе данных GenBank с помощью BLASTN, они были депонированы в базу данных NCBI. Была показана принадлежность исследуемого изолята к виду *Yarrowia lipolytica* с гомологией свыше 99.50% (табл. 2). Филогенетический анализ ITS1-5.8S рРНК-ITS2 (рис. 2а) и

домена D1/D2 26S рРНК (рис. 2б) показал также близкое родство двух исследуемых штаммов и других штаммов, доступных в базе данных NCBI.

**Антибиопленочная и антиадгезивная активность штаммов *Y. lipolytica*.** Было изучено ингибирование формирования биопленок *Salmonella Enteritidis* в присутствии супернатантов культур двух штаммов *Y. lipolytica*. Хотя антиадгезивный эффект не был отмечен, при инкубации бактерий с различными объемами БКС образование биопленок тормозилось. Антибиопленочный эффект проявлялся сильнее при большем объеме внесенного супернатанта. При увеличении объема супернатанта *Y. lipolytica* TEM OS12 с 10 до 80 мкл, ингибирование биопленкообразования возрастало с 86 до 89.42% (рис. 3а). В случае *Y. lipolytica* TY24, аналогичное увеличение объема БКС (с 10 до 80 мкл) приводило к увеличению антибиопленочной активности с 13.34 до 88.09% (рис. 3б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Низкая эффективность существующих методов борьбы с биопленками, а также возрастающая устойчивость биопленкообразующих бактерий к



**Рис. 1.** Продукция биосурфактантов исследованными штаммами: *Y. lipolytica* OS12 (1); штамм TY24 (2); SDS (3); MSM (4); DC – уплощение капли.

**Таблица 2.** Молекулярная идентификация исследованных дрожжевых штаммов

Изолят	ITS1-5.8S-ITS2 rRNA регион			D1/D2 домен 26S рРНК регион			Вид
	размер ПЦР продукта, пн	гомология, %	№ в GenBank	размер ПЦР продукта, пн	гомология, %	№ в GenBank	
TY24	350	99.64	KC148193.1	565	99.60	KC148201.1	<i>Y. lipolytica</i>
TEM OS12	285	100	KY275473.1	457	100	KY275493.1	<i>Y. lipolytica</i>

антибиотикам вынуждают исследователей искать новые, более эффективные подходы. С другой стороны, различные группы биосурфактантов известны своими антибиопленочными свойствами, в частности, липопептиды, псевдофактин и гликолипиды. Интерес к биосурфактантам дрожжевого происхождения поддерживается отнесением ряда видов родов *Candida*, *Yarrowia* и *Pseudozyma* к группе GRAS (Generally Regarded As Safe, в общем полагаемые безопасными) (Amaral et al., 2010).

Способность дрожжей *Yarrowia lipolytica* (ранее *Candida lipolytica*) синтезировать ряд ценных метаболитов, включая липазы и биосурфактанты, хорошо известна (Janek et al., 2020; Radha et al., 2020). Целью данной работы была оценка продукции биосурфактантов новым изолятом (идентифицированным нами как *Y. lipolytica* TY24) и ранее описанным штаммом (*Y. lipolytica* TEM OS12) (Yalçın et al., 2018).

Для скрининга поверхностно-активных агентов было разработано несколько качественных и количественных методов. Тем не менее, ограничения каждого метода делают необходимым применение нескольких подходов для точного и успешного скрининга (Walter et al., 2010; Sidkey et al., 2016). Поэтому в данной работе был использован ряд качественных и количественных тестов для определения способности изучаемых штаммов производить биосурфактанты. Наши результаты аналогичны представленным ранее (Pendse, Aruna, 2018; Yalçın et al., 2018, Eldin et al., 2019).

В первую очередь была изучена гемолитическая активность штаммов. Это предварительный качественный тест, основанный на визуальном наблюдении гемолиза, возможно, указывающего на повреждение мембран в присутствии поверхностно-активных молекул (Youssef et al., 2004; Satpute et al., 2010; Eldin et al., 2019). В работе Sidkey et al. (2016) в качестве потенциальных продуцентов биосурфактантов отбирали только штаммы, вызывающие полный гемолиз на кровяном агаре ( $\beta$ -гемолитические штаммы). Поскольку штаммы, исследованные в данной работе, были способны вызывать тотальный гемолиз, они были классифицированы как потенциальные продуценты биосурфактантов.

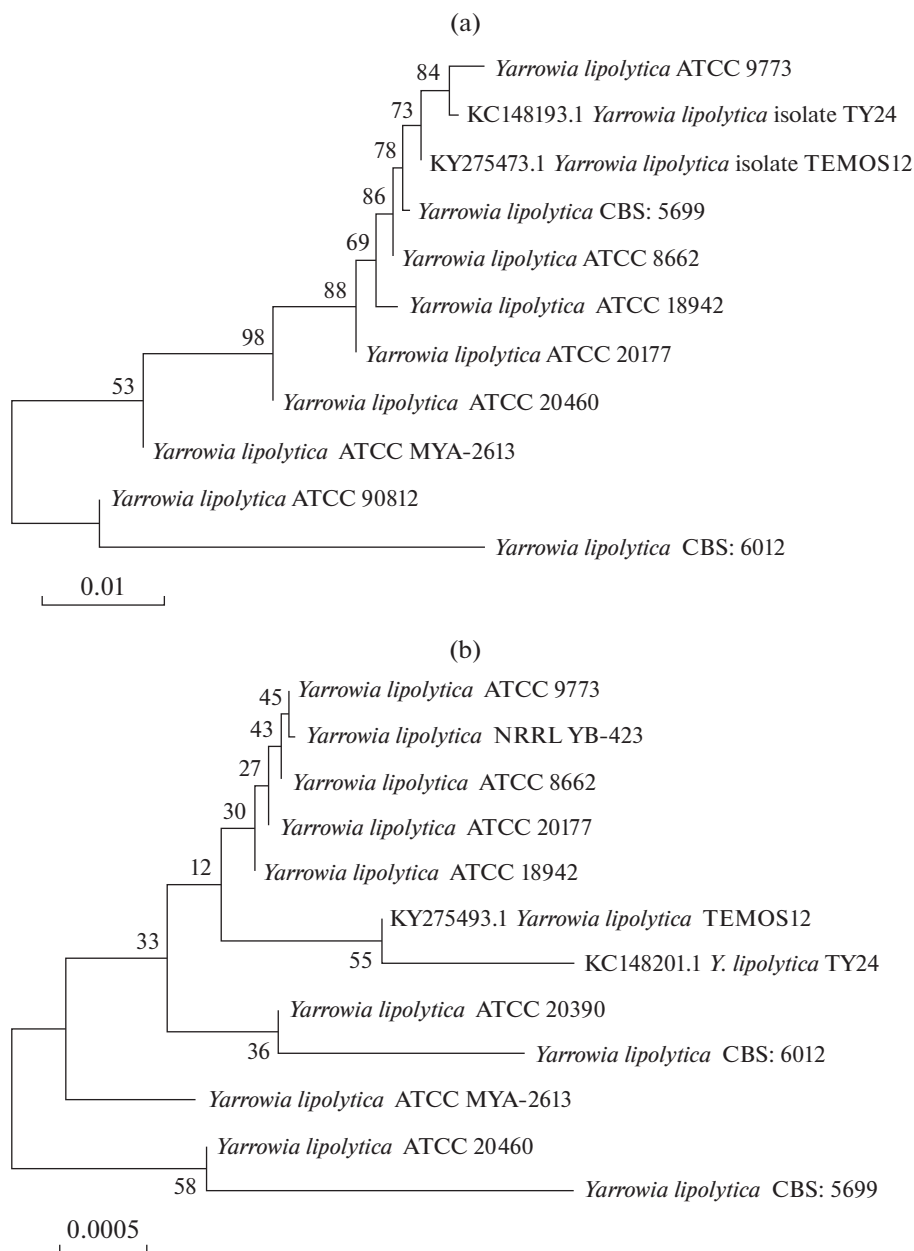
Затем был исследован рост штаммов на СТАВ-МВ агаре. Положительный результат этого теста

подтвердил наличие внеклеточных анионных биосурфактантов. Образование синей зоны было вызвано образованием нерастворимых соединений с СТАВ (катион) и метиленовым синим (Walter et al., 2010; Sidkey et al., 2016; Pendse, Aruna, 2018; Eldin et al., 2019).

Капли БКС из культур обоих изученных штаммов уплощались и распространялись по поверхности гидрофобного масла или парафила М. Оба эти теста являются качественными и зависят от способности сурфактанта дестабилизировать капли жидкости, которую связывают со способностью биосурфактантов понижать межфазовое натяжение между каплей и гидрофобной поверхностью (Youssef et al., 2004; Pendse, Aruna, 2018).

Для оценки продукции биосурфактантов был также использован метод вытеснения масла. Площадь, с которой вытесняется масло, зависит от количества биосурфактантов и их эффективности (Walter et al., 2010; Eldin et al., 2019). В данной работе было показано, что супернатанты из культур штаммов *Y. lipolytica* TY24 и TEM OS12 вытесняли масло на 6 и 5 см соответственно. На следующей стадии после этих предварительных тестов определяли поверхностную активность БКС. Поверхностное натяжение – это мера межфазовой или поверхностной активности жидкостей. Культура считается перспективной, если при добавлении БКС поверхностное натяжение жидкости снижается до 40 или ниже либо более чем на  $20 \text{ мН м}^{-1}$  (Walter et al., 2010). В данной работе супернатанты изученных культур понижали поверхностное натяжение с 57.5 до 33.5 и 35.5  $\text{мН м}^{-1}$  соответственно. В соответствии с требованиями, описанными выше, исследованные штаммы можно считать перспективными либо хорошими продуцентами биосурфактантов.

После того, как было показано наличие биосурфактантов в БКС исследованных штаммов *Y. lipolytica*, провели исследование ингибирования биопленкообразования штаммом *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Применение бесклеточных супернатантов привлекательно тем, что позволяет снизить стоимость производства (Pontes et al., 2016). Однако применение биосурфактантов дрожжевого происхождения в исследованиях биопленок ограничено. Rufino et al. (2011) вносили в ячейки планшета различные концентрации биосурфак-



**Рис. 2.** Филогенетические деревья исследованных штаммов *Yarrowia lipolytica*, основанные на последовательностях ITS1-5.8S-ITS2 регионов (а) и домена D1/D2 26S рДНК (б).

танта Rufisan, полученного из *Candida lipolytica* UCP 0988. Подавление биопленок, сформированных различными штаммами *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, зависело от концентрации неочищенного биосурфактанта. В некоторых случаях уровень ингибирования достигал 99%. Luna et al. (2011) сообщали о способности неочищенного биосурфактанта из культуры *Candida sphaerica* подавлять на 80–92% образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus sanguis* 12. De Rienzo et al. (2015) сообщали

о способности софоролипидов, выделенных из *Candida bombicola* ATCC 22214 (5%, об.), разрушать зрелые биопленки, образованные *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 и *B. subtilis* ВВК006. Очищенные софоролипиды, выделенные из *Starmerella bombicola* MTCC1910, также ингибировали формирование биопленок *Candida albicans*, снижали их жизнеспособность и влияли на их архитектуру и на морфологию включенных в биопленку клеток (Haque et al., 2015). Haque et al. (2017) также подтвердили роль софоролипидов как агентов доставки сочетания софоролипид-амфотерицин В против

био пленок *Candida*. В данной работе также сообщается о подавлении био пленок, образуемых *Salmonella* Enteritidis, на 86–89.42 и 13.34–88.09% при совместной инкубации с возрастающими объемами содержащих биосурфактанты супернатантов из культур *Y. lipolytica* TEM OS12 и *Y. lipolytica* TY24. Ранее также сообщалось, что повышенный объем БКС вызывал более выраженное подавление бактериальных био пленок (Khiralla et al., 2015; Koohestani et al., 2018).

Одновременный синтез биосурфактантов и липазы позволяет микроорганизмам утилизировать водонерастворимые субстраты и улучшает ассимиляцию нефти (Hu et al., 2018; Singh et al., 2018). Кроме того, Pendse и Aruna (2018) сообщали, что продуценты липазы могут быть также продуцентами биосурфактантов, поэтому мы также исследовали наличие липазной активности на трибутириновом агаре. Этот тест был предложен как удобный метод обнаружения микроорганизмов – продуцентов биосурфактантов (Balan et al., 2017). В данной работе мы также сообщаем о способности изученных штаммов *Y. lipolytica* синтезировать липазу, что, возможно, также влияло на способность подавлять био пленки *Salmonella* Enteritidis. Роль липаз как антибио пленочных агентов отмечалась ранее (Kiran et al., 2014; Aykin et al., 2019).

В данной работе в ячейках, покрытых содержащим биосурфактант БКС, не наблюдалась антиадгезивная активность. Это может объясняться низкой концентрацией биосурфактанта в супернатанте. Альтернативное объяснение – неспособность активного ингредиента в супернатанте влиять на свойства поверхности таким образом, чтобы ингибировать образование био пленок (Abu Sayem et al., 2011).

Помимо этого, в настоящей работе была изучена способность двух штаммов *Yarrowia lipolytica* продуцировать биосурфактанты, а также их антибио пленочная и антиадгезивная активность против био пленок, образуемых штаммом *Salmonella* Enteritidis. Насколько нам известно, это первое сообщение об антибио пленочной и антиадгезивной активности супернатантов из культур штаммов *Yarrowia* против био пленок, сформированных *Salmonella* spp. Антибио пленочный эффект, наблюдавшийся нами, вероятно, связан с наличием биосурфактантов, поэтому дальнейшие исследования будут сконцентрированы на применении неочищенных и/или очищенных биосурфактантов. Кроме того, не исключен анализ различных компонентов бесклеточного супернатанта с целью выявления других антибио пленочных агентов.

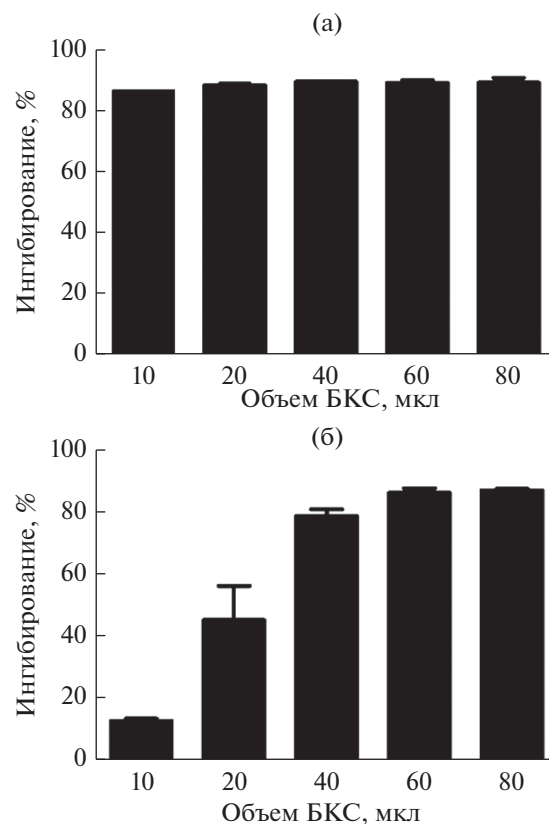


Рис. 3. Процент ингибирования био пленок *Salmonella* Enteritidis в присутствии различных объемов бесклеточных супернатантов культур *Y. lipolytica* TEM OS12 (а) и *Y. lipolytica* TY24 (б).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны профессору İhsan Yaşa за предоставление штамма *Salmonella* Enteritidis strain.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abu Sayem S.M., Manzo E., Ciavatta L., Ramice A., Cordone A., Zandardino A., De Felice M., Varcamonti M. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis* // Microb. Cell. Fact. 2011. V. 10. Art. 74.
- Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M.J., Coutinho J.A.P. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application // Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology / Ed. Sen R. New York: Springer, 2010. P. 236–249.

- Amrutha B., Sundar K., Halady P.S. Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables // J. Food. Sci. Technol. 2017. V. 54. P. 1091–1097.
- Aykin E., Omuzbuken B., Kacar A. Microfouling bacteria and the use of enzymes in eco-friendly antifouling technology // J. Coat. Technol. Res. 2019. V. 16. P. 847–856.
- Balan S.S., Kumar C.G., Jayalakshmi S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation // Microbiol. Res. 2017. V. 194. P. 1–9.
- Barak J.D., Liang A.S. Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants // PLoS One. 2008. V. 3. Art. 1657.
- Borges K.A., Furian T.Q., Souza S.N., Menezes R., Tondo E.C., Salle C.T.P., Morales H.L.S., Nascimento V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions // Pesqui. Vet. Bras. 2018. V. 38. P. 71–76.
- De Rienzo M.A.D., Banat I.M., Dolman B., Winterburn J., Martin P.J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agents // N. Biotechnol. 2015. V. 32. P. 720–726.
- De Oliveira D.C., Fernandes J.A., Kaneno R., Silva M.G., Araujo J.J.P., Silva N.C., Rall V.L. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material // Foodborne Pathog. Dis. 2014. V. 11. P. 478–483.
- Eldin A.M., Kamel Z., Hossam N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods // Microchem. J. 2019. V. 146. P. 309–314.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Giaouris E., Chorianopoulos N., Skandamis P., Nychas G.J. Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments // *Salmonella – a Dangerous Foodborne Pathogen* / Ed. Barakat S.M.M. Croati: InTech, 2012. P. 157–180.
- Gudiña E.J., Rocha V., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. A20 // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 50. P. 419–424.
- Gunn J.S., Marshall J.M., Baker S., Dongol S., Charles R.C., Ryan E.T. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 648–655.
- Haque F., Alfatah M.D., Ganesan K., Bhattacharyya M.S. Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth // Sci. Rep. 2015. V. 6. v23575.
- Haque F., Sajid M., Singh S.C., Batacharyya S. Anti-biofilm activity of a sophorolipid- amphotericin B niosomal formulation against *Candida albicans* // Biofouling. 2017. V. 33. P. 768–779.
- Harshada K. Biosurfactant: A potent antimicrobial agent // J. Microbiol. Exp. 2014. V. 1. P. 173–177.
- Hu X., Cheng T., Liu J. A novel *Serratia* sp. ZS6 isolate derived from petroleum sludge secretes biosurfactant and lipase in medium with olive oil as sole carbon source // AMB Express. 2018. V. 8. 165.
- Janek T., Mirończuk A., Rymowicz W., Dobrowolski A. High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: a biophysical approach // Arch. Biochem. Biophys. 2020. V. 689. Art. 108475.
- Khiralla G.M., Mohamed E.A.H., Farag A.G., Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus planatum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens // J. Biotech. Res. 2015. V. 6. P. 86–95.
- Kiran G.S., Lipton A.N., Kennedy J., Dobson A.D.W., Selvin J. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms // Bioengineered. 2014. V. 5. P. 305–318.
- Koohestani M., Moradi M., Tajik J., Badali A. Effects of cell free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus* // Vet. Res. Forum. 2018. V. 9. P. 301–306.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Liu D., Coloe S., Braid R., Pedersen J. Rapid mini preparation of fungal DNA for PCR // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 471.
- Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., De Campos-Takaki G.M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995 // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. P. 1527–1534.
- Naughton P.J., Marchant R., Naughton V., Banat I.M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 127. P. 12–28.
- Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 633–654.
- Pendse A., Aruna K. Use of various screening methods for isolation of potential biosurfactant producing microorganism from oil-contaminated soil samples // J. Pharm. Res. 2018. V. 12. P. 599–605.
- Peng D. Biofilm formation of *Salmonella* // *Microbial Biofilms – Importance and Applications* / Eds. Dhanasekaran D., Thajuddin N. UK: Intech Open, 2016. P 21.
- Plaza G., Achal V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. Art. 2152.
- Pontes C., Alves M., Sanos C., Ribeiro M.H., Gonçalves L., Bettencourt A.F., Ribeiro I.A.C. Can sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? // Int. J. Pharm. 2016. V. 513. P. 697–708.
- Radha P., Prabhu K., Jayakumar A., Abilash Karthik S., Ramani K. Biochemical and kinetic evaluation of lipase and biosurfactant assisted *ex novo* synthesis of microbial oil for biodiesel production by *Yarrowia lipolytica* utilizing chicken tallow // Process Biochem. 2020. V. 95. P. 17–29.
- Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and antiadhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // Colloids Sur. 2011. V. 84. P. 1–5.



- Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D.* Current and recent advanced strategies for combating biofilms // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015. V. 14. P. 492–509.
- Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
- Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. V. 30. P. 127–144.
- Shatila F., Yaşa I., Yalçın H.T.* Inhibition of *Salmonella enteritidis* biofilms by *Salmonella* invasion protein-targeting aptamer // *Biotechnol. Lett.* 2020. V. 42. P. 1963–1974.
- Sidkey N.M., Mohamed H.F., Elkhoully H.* Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples grown on industrial olive oil processing waste // *Br. Microbiol. Res. J.* 2016. V. 17. P. 1–19.
- Siegmund I., Wagner F.* New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar // *Biotechnol. Tech.* 1991. V. 5. P. 265–268.
- Singh P., Patil Y., Rale V.* Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 126. P. 2–13.
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J.* *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication // *Food. Res. Int.* 2012. V. 45. P. 502–531.
- Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* 1993. V. 10. P. 512–526.
- Teplitski M., Barak J.D., Schneider K.R.* Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. V. 20. P. 166–171.
- Walter V., Syldatk C., Hausman R.* Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 672. P. 1–13.
- Yalçın H.T., Ergin-Tepebaşı G., Uyar E.* Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives // *J. Basic. Microbiol.* 2018. V. 58. P. 782–792.
- Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms // *J. Microbiol. Methods.* 2004. V. 56. P. 339–347.

## Screening of Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica* Strains and Evaluation of Their Antibiofilm and Anti-Adhesive Activities against *Salmonella enterica* ser. Enteritidis Biofilms

F. Shatila<sup>1</sup>, E. Uyar<sup>2</sup>, and H. T. Yalçın<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Ege University, Faculty of Science, Biology Department, Basic and Industrial Microbiology Section, Izmir, Turkey

<sup>2</sup>Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Molecular Biology Section, Sanliurfa, Turkey

\*e-mail: tanselozturk@hotmail.com

Received January 20, 2021; revised February 19, 2021; accepted February 19, 2021

**Abstract**—A yeast strain (TY24) isolated from a soil sample, and a previously characterized *Y. lipolytica* TEM OS12 strain were screened for their ability to produce biosurfactants. Positive results were revealed for both strains on CTAB-MB agar plates, by the drop collapse method, parafilm M Test, and oil displacement method. The yeast isolate TY24 and *Y. lipolytica* TEM OS12 also produced lipases, demonstrated  $\beta$ -hemolytic activity, and decreased the surface tension from 57.5 to 33.5 and 35.5 (mN m<sup>-1</sup>), respectively. The newly isolated strain was identified as *Y. lipolytica* TY24 using ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and D1/D2 domain of 26S rRNA regions. Co-incubation of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis with increasing volumes of biosurfactant-containing supernatants from the cultures of *Y. lipolytica* TEM OS12 and *Y. lipolytica* TY24 prevented biofilm formation by 89.42 and 88.09%, respectively. The biosurfactant-containing CFS produced by the tested yeast strains inhibited *S. Enteritidis* biofilms efficiently.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, screening, biosurfactant, *Salmonella* biofilms, antibiofilm activity