

Quarterly

Volume 62

Issue 3/4•2023

JULY – DECEMBER

CODEN:

PMKMAV 62 (3/4)

2023

POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS
POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Advancements of Microbiology

formerly Postępy Mikrobiologii

Impact Factor = 0,800 (2023)

MNiSW Score = 40,00 (2023)

<http://am-online.org/>

EDITORIAL BOARD / RADA REDAKCYJNA

MONIKA BRZYCHCZY-WŁOCH (Kraków, Poland), PAWEŁ CIBOROWSKI (Omaha, USA),
JERZY DŁUGOŃSKI (Łódź, Poland), BARBARA DOŁĘGOWSKA (Szczecin, Poland),
KATARZYNA DZIERŻANOWSKA-FANGRAT (Warszawa, Poland), LUKÁŠ HLEBA (Nitra, Slovakia),
WALERIA HRYNIEWICZ (Warszawa, Poland), ANNA MALM (Lublin, Poland),
JACEK MIĘDZOBRODZKI (Kraków, Poland), ELŻBIETA ANNA TRAFNY (Warszawa, Poland),
ARTUR SABAT (Groningen, The Netherlands), KRZYSZTOF TRZCIŃSKI (Utrecht, The Netherlands),
PIOTR ZIELENKIEWICZ (Warszawa, Poland)

EDITOR-IN-CHIEF / REDAKTOR NACZELNA

Eligia M. Szewczyk

ASSISTANT EDITOR / SEKRETARZ

Anna Białeczka

JOURNAL ADDRESS / ADRES REDAKCJI

Sławkowska 17, 31-016 Kraków, Polska
e-mail: editorial.office@am-online.org
phone: (+48) 885 191 121

EDITORS / REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Warszawa, Poland),
KATARZYNA GRUDLEWSKA-BUDA (Bydgoszcz, Poland),
ANNA KĘDZIORA (Wrocław, Poland), AGNIESZKA KWIATEK (Warszawa, Poland)
EDYTA PODSIADŁY (Warszawa, Poland), KRZYSZTOF SKOWRON (Bydgoszcz, Poland)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Information about the cover photo / Informacja o zdjęciu na okładce:

***Staphylococcus carnosus* coated with gold nanoparticles / *Staphylococcus carnosus* opłaszczony nanocząstkami złota**

Preparation and imaging / Preparatyka i obrazowanie:

Dorota Ochońska, MSc, Department of Molecular Medical Microbiology; Chair of Microbiology, Faculty of Medicine UJCM;
Wojciech Pajerski PhD, Materials and Surface Chemistry Group, Department of Inorganic Chemistry,
Faculty of Chemistry, Jagiellonian University;
Cwiklik's lab, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, The Czech Academy of Sciences,
Olga Woźnicka, Department of Cell Biology and Imaging, Faculty of Biology, Jagiellonian University

P O L I S H S O C I E T Y O F M I C R O B I O L O G I S T S
P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

EXPLORING BACTERIAL DIVERSITY: HOW FAR HAVE WE REACHED?

Himani Pandey¹ and Devi Lal^{2*}

¹Redcliffe Labs, Electronic City, Noida, Uttar Pradesh 201301, India.

²Ramjas College, University of Delhi, Delhi-110007, India.

Submitted in October 2022, accepted in January 2023

Abstract: Many methods have been developed for studying and comparing bacterial diversity. These methods suffer from a number of drawbacks. Culture-dependent methods have a drawback that only a small number of bacteria can be cultured. Although many modifications in the traditional cultivation approach have been made, such as the use of gellan instead of agar and high throughput dilution to extinction culturing, but a large fraction of microbes still remain uncultured. Culture-independent methods were developed to explore uncultured bacterial diversity but they have their own drawbacks. PCR-based methods have biases during DNA extraction and the removal of substances that may inhibit polymerase activity during PCR and digestion with restriction enzymes. “Omics” approach, i.e., metagenomics, metatranscriptomics, and metaproteomics, aim to link bacterial community structure with function. Different combinations of methods can be used to know more precisely about the bacterial diversity. To date, no known method can reveal the exact bacterial diversity of different environments. This lacuna needs to be filled and newer methods must be developed that can help in exploring the immense bacterial diversity created by nature.

1. Introduction. 2. Culture-dependent methods. 2.1. Plate counts. 2.2. Community level physiological profiles (CLPP) and sole carbon source utilization (SCSU) patterns. 2.3. Other approaches for isolation. 3. Culture-independent methods. 3.1. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis. 3.2. GC content. 3.3. Nucleic acid reassociation and hybridization. 3.4. DNA microarrays. 4. PCR-based methods. 4.1. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). 4.2. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). 4.3. Single strand conformation polymorphism (SSCP). 4.4. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), 4.5. Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA)/ automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), 5. Direct e-DNA sequencing: Metagenomics, 6. From who is there to what are they doing? 7. Summary

Keywords: bacterial diversity, culture-dependent methods, metagenomics, metaproteomics, metatranscriptomics, T-RFLP

1. Introduction

It was in the year 1663, more than three centuries ago, when Antonie van Leeuwenhoek first observed bacterial cells using his own microscope. This was the beginning of a new field of study called “microbiology”. For many years, the study of microbes remained dependent on the use of microscopes. Microbiologists, such as Ferdinand Cohn, Louis Pasteur, and Robert Koch, established microbiology as one of the important disciplines. Koch, in particular, developed solidified media using agar and, for the first time, the microbiological world understood the concept of pure cultures. Later on, it became mandatory to study bacteria in pure cultures. The majority of earlier microbiological work focused on isolating and studying bacteria

in pure cultures. However, it was still not known that the majority of the bacterial population was beyond the reach of microbiologists as it was not possible to culture them using standard laboratory procedures. The evidence that a majority of the bacterial population is uncultured came from the discrepancy between the size of the population estimated through serial dilution plating and microscopy, commonly referred to as the “great plate count anomaly” (Staley and Konopka 1985). Marine ecosystems are a well-studied example of this phenomenon where only 0.01 to 0.1% of marine bacterial cells produce colonies by standard plating techniques (Kogure *et al.* 1979). The unculturable microorganisms have been described as the “microbial dark matter” (Bernard *et al.* 2018, Bowman 2018). In the twentieth century, microbiologists started to realize that

* Corresponding Author: Devi Lal, Ramjas College, University of Delhi, Delhi-110007, India. devilal@ramjas.du.ac.in

© 2023 Himani Pandey, Devi Lal

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Exploring bacterial diversity: how far have we reached?, Himani Pandey and Devi Lal, ADV MICROBIOL-NY, 2023, 62, 3/4, <https://doi.org/10.2478/am-2023-0011>

bacteria are important creatures, providing enzymes, antibiotics, and other chemical compounds of use. As it was already documented that only a small fraction of bacteria could be cultivated, it was realized that an enormous wealth of compounds produced by these bacteria might be unexplored because there were no methods to trap the majority of this bacterial population. The inability of traditional microbiological methods to isolate bacteria was not the only problem. The difficulty faced by microbiologists was also at the level of bacterial species definition. Bacterial taxonomists agreed to define a genospecies based on DNA-DNA similarities of more than 70% (Schleifer and Stackebrandt 1983, Wayne *et al.* 1987). It is difficult to estimate the exact number of bacterial species, as the number is enormous (Dykhuisen 1998). Using DNA-DNA reassociation studies, Torsvik (Torsvik *et al.* 1990a, 1990b) estimated that 1 g of soil contains 4000 different bacterial genomic units.

The methods that have been developed to explore bacterial diversity are broadly classified into culture-dependent and culture-independent methods. Culture-dependent methods are the classical methods that require bacterial growth or activity, e.g., colony morphology from plate counts and community level physiological profiling (CLPP) using Biolog™ plates. Culture-independent methods were developed subsequently because of drawbacks in the traditional cultivation methods (Table I).

2. Culture-dependent methods

2.1. Plate counts

The diversity of bacterial communities has been investigated using methods based on isolating and culturing bacteria. These techniques are selective and do not reflect the actual diversity of the bacterial community. Only a small fraction of cells can be cultured on the media known so far (Overmann *et al.* 2017, Steen *et al.* 2019). However, the paradigm that only 0.1–1%

of bacteria are culturable does not hold true now (Martiny 2019). It is also not known whether the culturable bacteria are representative of the bacterial population (Torsvik *et al.* 1998). One of the limitations in culturing environmental bacteria is the difficulty in replicating the environmental conditions in the laboratory that certain bacteria require (Stewart 2012). Another limitation is that any departure from the original environmental parameters during cultivation can alter the community structure due to new selective conditions (Dunbar *et al.* 1997). Despite drawbacks, plate count is still the method of choice for isolating and studying bacteria from different habitats (Chiang *et al.* 2022, Djuuna *et al.* 2022, Schumacher *et al.* 2022, Zhou *et al.* 2022).

2.2. Community level physiological profiles (CLPP) and sole carbon source utilization (SCSU) patterns

These assays are useful for studying physiological diversity and are performed using Biolog™ plates (96-well microtiter plates) that contain different carbon sources (Garland and Mills 1991). Differences in utilization of different carbon sources yield different profiles that reflect the potential utilization of different carbon sources and help in differentiating bacterial communities. Although simple, such techniques suffer from many drawbacks. They help in assessing the metabolic diversity of only culturable bacteria and favor fast-growing bacteria. These technique have been used recently to study: microbial diversity in soil sown with six cultivars of rapeseed (Jeziarska-Tys *et al.* 2021), effects of burning season and vegetation coverage on Mediterranean mixed-mesogean pine forest soils (Moya *et al.* 2021), bacterial community variation in *Sorghum* rhizosphere (Kumar *et al.* 2021), microbial communities contaminated with mine solid wastes (Martínez-Toledo *et al.* 2021), two fire-affected sclerophyll forests in the Mediterranean climate zone of Central Chile (Aponte *et al.* 2022), impact of eight widely consumed antibiotics on natural

Table I.
Pros and cons of culture-dependent and culture-independent approaches for exploring bacterial diversity.

	Pros	Cons
Culture-dependent approaches	<ol style="list-style-type: none"> 1. Provides knowledge about physiological or functional properties of bacteria. 2. Inexpensive. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Only culturable bacteria can be studied. 2. Favours fast growing bacteria.
Culture-independent approaches	<ol style="list-style-type: none"> 1. Non-cultivable bacteria can be detected. 2. Many samples can be analyzed simultaneously. 3. Help in linking bacterial community structure and function. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Differences in DNA extraction efficiency. 2. Bias due to differential amplification of 16S rRNA gene. 3. Interpretation of bands/peaks difficult and time consuming. 4. Problems during sequence assembly and interpretations. 5. Expensive

soil microbial communities (Pino-Otín *et al.* 2022), and changes in the bacterial structure in bottom sediments in Cardinal Pond, Poland (Wolińska *et al.* 2022).

2.3. Other approaches for isolation

Many different approaches have been used for isolating previously uncultured bacteria. One such approach is the use of gellan as a solidifying reagent. Gellan gum is a linear polysaccharide produced by *Pseudomonas elodii*. It consists of glucuronic acid, rhamnose, and glucose and is more stable than agar. Gellan may serve as an energy source itself, leading to an increase in the colony count. Many studies have shown that the use of gellan gum increases the number of visible bacterial colonies (Delavat *et al.* 2012, Rygaard *et al.* 2017, Stott *et al.* 2008, Tamaki *et al.* 2005, 2009). Tamaki *et al.* (2005) showed that under aerobic conditions, the use of gellan gum increases the viable counts by nearly 2.2 to 12.6 times as compared to agar. Stott *et al.* (2008) used gellan gum to study bacterial diversity of three geothermal soils in the Taupo Volcanic Zone of New Zealand. They could isolate previously uncultured species, genera, classes, and even a new phylum of bacteria. Rygaard *et al.* (2017) found that the use of gellan gum increased viable counts by 3- to 40-fold.

A high throughput dilution to extinction culturing (HTC) method was developed by Connon and Giovannoni (2002). In this technique, a small inoculum is added to a sterile medium in a 96-well plate, resulting in a small number of cells. Incubation is done and the plates are screened using a fluorescent stain, such as SYBR Green1. Using HTC, Connon and Giovannoni could isolate various novel microbial isolates. Four isolates could be assigned to previously uncultured marine Proteobacteria clades and were related to the clades SAR11 (α -subclass), OM43 (β -subclass), SAR92 (γ -subclass), and OM60/OM241 (γ -subclass).

Rappe *et al.* (2002) used HTC using pristine sea water as a medium to isolate novel SAR11 strains. Transmission electron microscopy-based size estimation of one of the isolates suggested that it was one of the smallest free-living and replicating pure cultures of bacteria known. Stingl *et al.* (2007) used a modified HTC method to isolate 17 new SAR11 strains from the Oregon coast (12 isolates) and Sargasso Sea (5 isolates). A number of previously uncultured organisms were also isolated from the Oregon coast, including the SAR116 group, the OCS14 clade, 2 groups of Verrucomicrobia, Bacteroidetes and uncultivated sulfur-oxidizing symbionts related to γ -proteobacteria. A recently developed method, called the ichip device, involves the cultivation of microorganisms by incubating the chips *in situ* (Berdi *et al.* 2017).

3. Culture-independent methods

Culture-independent methods have been developed to study the uncultivated bacterial population. These include biochemical and molecular methods. Molecular methods generally rely on PCR amplification of the 16S rRNA gene or direct sequencing of environmental DNA (e-DNA). These methods have rapidly replaced cultivation-based methods to investigate bacterial community diversity.

3.1. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis

FAME analysis is based on the grouping of fatty acids for studying bacterial communities. It is based on the fact that signature fatty acids can differentiate between major taxonomic groups. Fatty acids are extracted directly from the environment, methylated, and analyzed through gas chromatography. Comparison of different soil types can be done using multivariate statistical analysis. This method has a number of drawbacks. Fatty acid composition is affected by factors such as temperature and nutrition. Moreover, fatty acids cannot be species-specific as the same fatty acid can be found in other species. This method has been used recently to study microbial communities in the nepheloid layers and hypoxic zones of the canary current upwelling system (Thiele *et al.* 2019), gut microbiome and metabolome in *Helicobacter pylori* patients (White *et al.* 2021), and the effect of residual organochlorine pesticides on microbial community (Wang *et al.* 2022).

3.2. GC content

GC content can be used along with culture-independent molecular methods for comparing bacterial community structure (Nusslein and Tiedje 1999). It is based on the fact that microorganisms differ in their GC content and taxonomically related groups differ by only 3–5% or may have the same GC content (Tiedje *et al.* 1999). Different taxonomic groups may have the same or nearly the same GC content. Although not a reliable method, it can be used to indicate changes in the bacterial community structure.

3.3 Nucleic acid reassociation and hybridization

DNA reassociation has been used for estimating bacterial diversity (Torsvik *et al.* 1990a, 1990b, 1996). For reassociation or hybridization, e-DNA is isolated, denatured, and reannealed. Annealing depends on the similarity between the sequences. If sequences are diverged, the rate of DNA reassociation decreases (Theron and Cloete 2000). By determining the rate of DNA reassociation, the heterogeneity in a community can be

estimated. The degree of DNA similarity between the two communities can be used to draw similarity between them (Griffiths *et al.* 1998). Hybridization using specific probes is also used to study bacterial communities. Hybridization can be done on nucleic acids extracted directly from the environment. Dot blot hybridization is used to measure the relative abundance of certain groups of bacteria. The probes used for hybridization are generally radiolabeled, but fluorescent labeled probes are now more commonly used. Fluorescence in situ hybridization (FISH) uses fluorescent probes for detection of specific bacterial groups and has been used successfully to study the distribution of bacteria on biofilms (Schramm *et al.* 1996, Thurnheer *et al.* 2004).

3.4. DNA microarrays

A single DNA microarray contains thousands of DNA sequences that can be specific target genes (for functional diversity) or fragments that represent different species (Greene and Voordouw 2003). DNA microarrays have been used along with DNA-DNA hybridization to identify bacterial species (Cho and Tiedje 2001). A similar technique, reverse sample genome probing (RSGP), uses genome arrays to analyze microbial community structure (Voordouw *et al.* 1991). In this technique, labeled e-DNA is hybridized to arrays in which genomes of known microorganisms are spotted on a solid matrix. RSGP has been used to identify sulfate-reducing bacteria in oil fields (Voordouw *et al.* 1992), to analyze the effect of toluene and dicyclopentadiene on community composition (Shen *et al.* 1998), to analyze the microbial communities in soil samples that were incubated with 10% toluene (Hubert *et al.* 1999), and to analyze the community composition of the enriched soil samples contaminated with benzene, dicyclopentadiene, cyclopentadiene, toluene, styrene, xylenes, and naphthalene (Greene *et al.* 2000). DNA microarrays have been used to study microbial communities of a Gulf of Mexico coastal salt marsh (Beazley *et al.* 2012) and to detect pathogens in intracranial bacterial and fungal infections (Cao *et al.* 2018). Ballarini *et al.* (2013) used an oligonucleotide microarray called BactoChip for culture-independent identification of bacteria in complex communities.

4. PCR-based methods

PCR-based methods involve isolating e-DNA followed by amplification of the 16S rRNA gene. The PCR products are usually cloned to construct libraries (Fig. 1), which are sequenced to identify the native bacteria in environmental samples (Lal *et al.* 2015). PCR-based methods have certain limitations and biases

that appear at the stage of sampling and storage before extraction of nucleic acids (Thies 2007). Improper soil storage can result in a change in bacterial diversity. It has been proposed that soil samples should be stored at -20°C for short-term and -80°C for long-term storage (Thies 2007). Problems are also encountered during the extraction of nucleic acids (Sipos *et al.* 2010, Thies 2007), including the reproducible lysis of all bacterial cells, extraction of unfragmented nucleic acids, and removal of substances such as humic acids, bacterial exopolysaccharides, and proteins that may inhibit enzyme activity during PCR and restriction digestion (Cullen and Hirsch 1998, Gelsomino *et al.* 1999, van Elsas *et al.* 1997). The lysis efficiency of bacterial cells varies with the group. If a gentle method of lysis is used, Gram-positive cells are not lysed. Harsh methods, such as bead beating can lead to shearing of DNA (Wintzingerode *et al.* 1997). PCR-based methods have a major drawback in that they can only detect the most abundant species present in the environmental samples (Rincon-Florez *et al.* 2013), mainly due to differential amplification of the 16S rRNA gene (Al-Awadhi *et al.* 2013).

4.1. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE is a convenient technique for analyzing the diversity of complex natural microbial populations. It is a molecular fingerprinting method that separates PCR-generated DNA products. DGGE was first described by Muyzer *et al.* in 1993. This technique provides information about sequence variations in a mixture of PCR fragments of identical length based on differential mobility in the acrylamide gel matrix of increasing denaturant concentration. Like other fingerprinting techniques, it also involves the isolation of e-DNA followed by PCR amplification of the 16S rRNA gene using primers with a GC clamp (a stretch of GC-rich sequences). PCR of e-DNA generates products with varying DNA sequences, but conventional separation by agarose gel electrophoresis results only in a single DNA band, which is largely non-descriptive. This limitation is overcome by DGGE as it separates PCR products based on sequence differences that result in differential denaturing characteristics of the DNA. During DGGE, PCR products encounter increasing concentrations of denaturant as they migrate through a polyacrylamide gel. In practice, the denaturants used are a fixed ratio of formamide (0–40%) and urea (0–7 M). 100% denaturing acrylamide contains 7M urea with 40% formamide (Myers *et al.* 1987). Another denaturant used is a constant temperature of 60°C . This technique is commonly known as TGGE (temperature gradient gel electrophoresis). However, both the techniques, TGGE and DGGE, are interchangeable and give comparable fingerprints of microbial communities (Heuer and Smalla 1997).

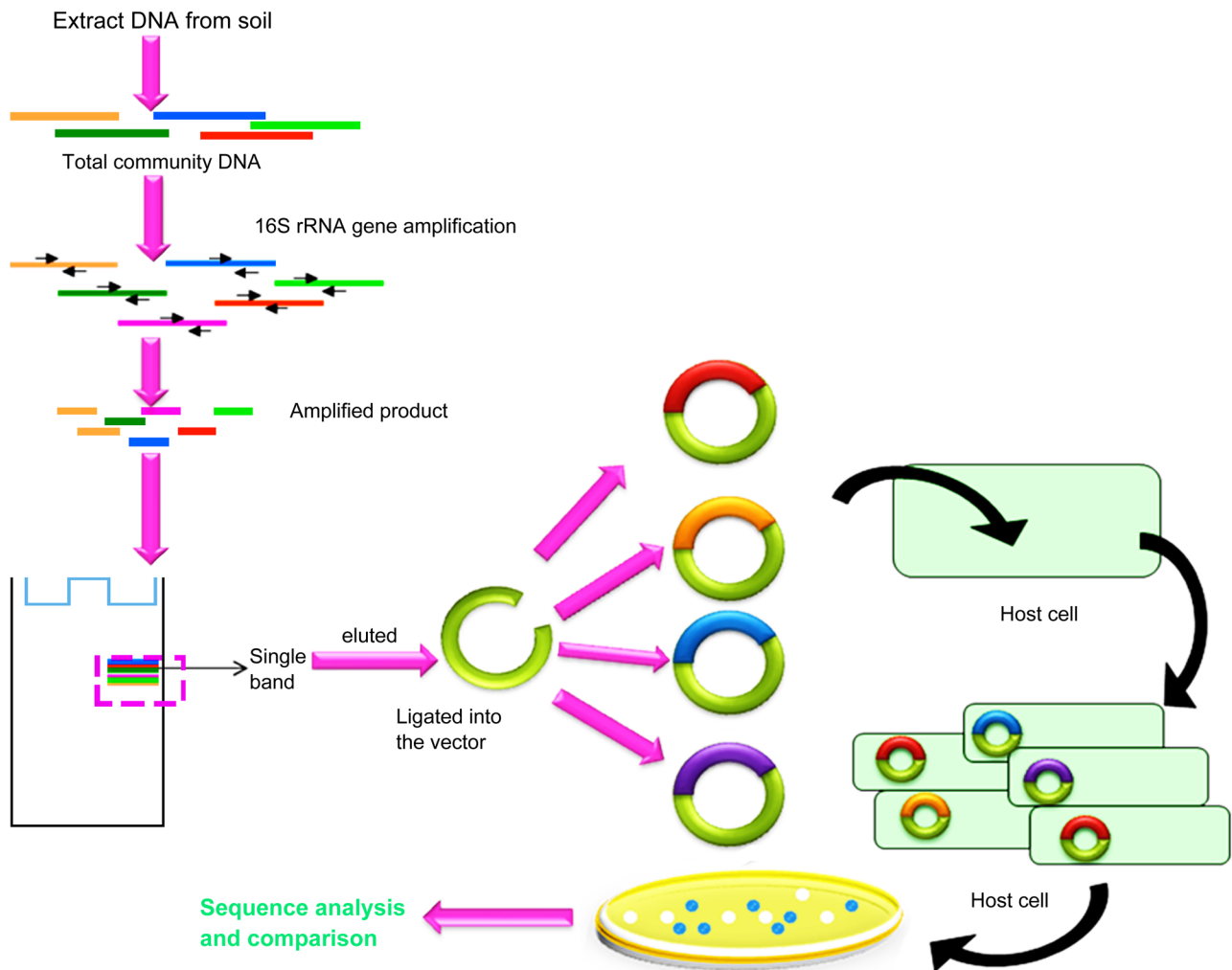


Fig. 1. Systematic representation of 16S rRNA clone library construction and subsequent screening and sequencing clones.

When a PCR product is electrophoresed into a gradient of increasing denaturing conditions, it partially melts and undergoes a sharp reduction in mobility on reaching a threshold denaturant concentration. The position in the gradient where a DNA fragment melts and nearly stops migrating depends on the nucleotide sequence and the GC content. Hence, DNA with different sequences in a PCR product denatures at different denaturant concentrations, resulting in a pattern of bands (Fig. 2). The banding pattern represents the major constituents of the analyzed bacterial community (Heuer *et al.* 1997). Each band theoretically represents a different bacterial population present in the community. DGGE patterns can be compared with the migration of reference clones of known sequence; the major bands can be excised, reamplified, and sequenced to know their identities (Muyzer *et al.* 1995, Teske *et al.* 1996). The patterns of DGGE are more useful for direct comparison of structural diversity between different microbial communities.

The importance of DGGE can be understood by the fact that many recent studies have used this technique to study bacterial diversity. It has recently been

to study: microbial communities in vertical flow treatment wetlands (Silveira *et al.* 2021), bacterial community diversity from lesional and non-lesional skin of leprosy patients (Bayal *et al.* 2021), bacterial community composition in marine sediments from Palk Bay and Gulf of Mannar (Aravindraja *et al.* 2022), airborne bacterial community associated with $PM_{2.5}$ under different air quality indices (Acuña *et al.* 2022), and diversity of cyanobacteria that colonize the roots of leafless orchids (Tsavkelova *et al.* 2022). DGGE has recently been used to compare the bacterial diversity in the oral cavity of people with multiple sclerosis and healthy subjects (Zangeneh *et al.* 2021) and microbial community structure and function in the soil rhizosphere between bacterial wilt resistant and susceptible mulberry genotypes (Dong *et al.* 2021). DGGE has also been used recently to study the effect of: fertilizers on soil nitrogen fixing bacteria community in a rice paddy field (Tang *et al.* 2021), colonization of the red imported fire ant on soil microbial communities (Travanty *et al.* 2022), and *Asparagus racemosus* starter-based rice fermented foods on intestinal microbiota (Hor *et al.* 2022).

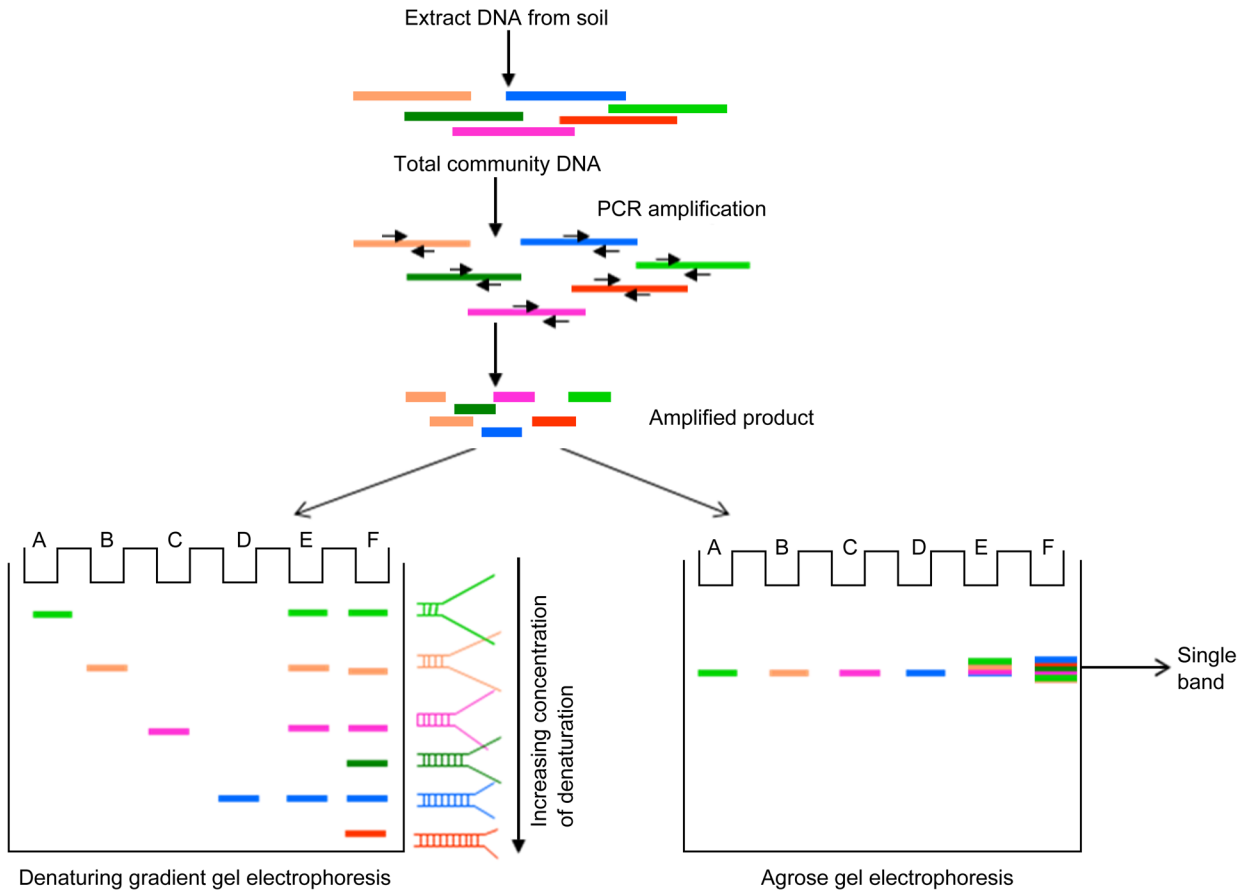


Fig. 2. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. The figure shows 16S rRNA gene amplification from community DNA followed by gel electrophoresis. Wells A to D contain amplified products from individual bacterial species, well E contains a mixture of amplified products from A to D, well F contains amplified product from the soil community. The conventional agarose gel electrophoresis results in a single non-descriptive band but separation on denaturing acrylamide gels results in multiple bands, each representing the dominant member of the community.

4.2. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

ARDRA is another molecular technique based on PCR amplification of the 16S rRNA gene. The most important step in this technique is the selection of restriction enzymes (RE). Generally, tetracutter RE are used. The selection of the number of RE is also important. After restriction digestion of the amplified 16S rRNA gene, the restriction pattern is visualized and combined by pattern recognition and analysis software. Similarities in ARDRA patterns allow the grouping, based on numerical analysis. ARDRA fingerprints also allow the construction of a database for identification purposes. Banding patterns in diverse communities may become complex to analyze as a single species can have four to six restriction fragments (Tiedje *et al.* 1999). Six base cutters can be used to increase the resolution of this technique. Heyndrickx *et al.* (1996) gave a standardized method for ARDRA using five RE, *HaeIII*, *DpnII*, *RsaI*, *BfaI*, and *Tru9I*. Nicomrat and colleagues (2008) used four RE, *HaeIII*, *HhaI*, *MspI*, and

TaqI, to explore bacterial diversity from a constructed wetland system that treats acid coal mine drainage.

ARDRA has been used recently to characterize the diversity of lactic acid bacteria from major Meekeri production areas in Sri Lanka (Adikari *et al.* 2021), cyanobacterial diversity from two geothermal environments of Northern Costa Rica (Brenes-Guillén *et al.* 2021), plant growth-promoting endophytic bacteria from *Pisum sativum* and *Cicer arietinum* (Maheshwari *et al.* 2022), halophilic bacteria from a former salt mine (Nosalova *et al.* 2022) and endophytic halotolerant bacterial isolates from haloalkaliphytes (Enquahone *et al.* 2022).

4.3. Single strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP was primarily developed and used for the detection of known or novel polymorphisms and mutations in human genes (Orita *et al.* 1989a, 1989b). In the absence of denaturing conditions, single-stranded DNA has a folded structure, determined by intramolecular interactions and its nucleotide sequence. The electrophoretic mobility of DNA in a gel depends on length,

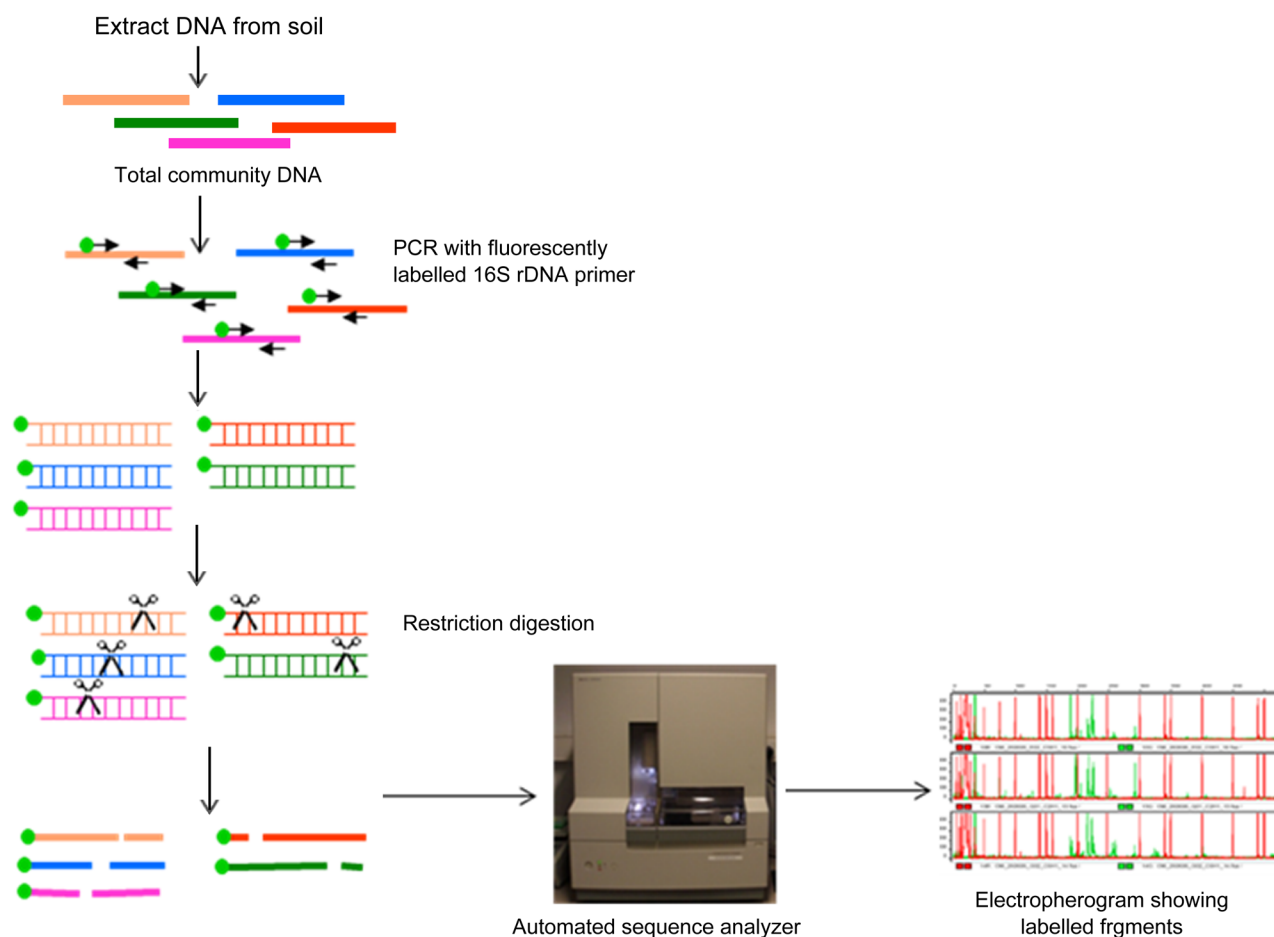


Fig. 3. Terminal restriction fragment length polymorphism. The capillary electrophoresis system of an automated DNA sequencer to separate the digested product is used to obtain T-RFs shown as an electropherogram.

molecular weight, and shape. Single-stranded DNA fragments with the same size but different sequences can be separated into different bands on a polyacrylamide gel based on differences in mobility caused by their folded secondary structure (Hayashi 1991).

It is a simple and effective method for detecting minor sequence changes in PCR-amplified DNA (Sheffield *et al.* 1993). Many factors, such as gel matrix, temperature, fragment size, and sequence, can affect its sensitivity (Liu and Sommer 1994). This technique has several advantages. It is less laborious and does not require radioactive substrates. Reamplification and sequencing of separate bands provide useful information regarding community structure.

SSCP has been used to study bacterial communities from different environments, such as the rhizosphere (Bharathkumar *et al.* 2008, Schmalenberger and Tebbe 2003), anaerobic digester (Zumstein *et al.* 2000), river (Ortega-Retuerta *et al.* 2013), colon mucosa (Ott *et al.* 2004), rumen (Boguhn *et al.* 2008), and traditional Turkish ezine cheese (Sofu and Ekinçi 2016).

A variation of SSCP, called capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism (CE-SSCP)

fingerprinting, has been developed and used by several workers (Jernigan and Hestekin 2015, Rossmann *et al.* 2012).

4.4. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

T-RFLP is a method for analyzing variations in the length of terminal restriction fragments (T-RFs) of the 16S rRNA gene generated after restriction digestion (Dubey *et al.* 2014, Gupta *et al.* 2013, Lal *et al.* 2015). T-RFLP is based on variations in restriction patterns of 16S rRNA that generate a characteristic pattern of T-RFs after restriction digestion and capillary electrophoresis (Fig. 3). Methods to obtain T-RF patterns for the assessment of community structure and dynamics are more or less similar with some modifications (Blackwood *et al.* 2003, Dunbar *et al.* 2001). It involves extraction of e-DNA, PCR amplification of 16S rRNA gene using either only 5' end labeled or both 5' and 3' end labeled universal or near universal primer(s), purification of PCR product, restriction digestion of purified amplicon using single or more than one RE,

and finally separation of T-RFs by capillary electrophoresis using automated DNA sequencer equipped with data collection and analysis software. Digestion of amplified products is done by one or more than one, common and readily available RE. It needs a careful selection of RE to digest the amplified products that can give better resolution (Castro *et al.* 2005). Since different enzymes produce different community fingerprints, it is important to use at least two to four different RE to increase the accuracy.

TRFLP is a favorable technique to analyze bacterial communities and has been used in many recent investigations. It has been used to study: the impact of daily application of *Lactobacillus reuteri* on the indigenous skin bacterial community diversity (Frerejacques *et al.* 2020), variations in ammonia-oxidizing communities in a subtropical river of China (Ginawi *et al.* 2020), total petroleum hydrocarbons-degrading microbial community (Chen *et al.* 2020), changes in bacterial community structure in response to increasing concentrations of diclofenac in fed-batch reactors (Kraigher and Mandic-Mulec 2020), oral microbial flora in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (Takahashi *et al.* 2020), duodenal microbiota of patients with pancreaticobiliary cancer (Sugimoto *et al.* 2021), and microbial community distribution within two boreholes located in the source area of perchloroethene (Herrero *et al.* 2022). T-RFLP has also been used recently to study the effects of: rifaximin on gut commensal microbiota in mice (Ferrer *et al.* 2021), proton pump inhibitors on the intestinal flora of low-dose aspirin users (Tsujiyamoto *et al.* 2021), *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaeibacillus paracasei* on the microbial community in children with celiac disease autoimmunity (Oscarsson *et al.* 2021), and banana leaf and plastic wraps on the lactic acid bacteria quantity and community composition of tempeh (Erdiansyah *et al.* 2022).

4.5. Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA)/automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

RISA is similar to T-RFLP but involves PCR amplification of the 16S-23S ribosomal intergenic spacer region rather than the 16S rRNA followed by separation on a polyacrylamide gel under denaturing conditions. It exploits the heterogeneity in length, which varies between 150 and 1500 bp, as well as nucleotide sequence (Fisher and Triplett 1999). In RISA, the sequence polymorphism is detected using silver stain, while in ARISA, the forward primer is fluorescently labeled and is detected automatically. RISA requires large quantities of DNA, is time-consuming, and has low resolution. ARISA is more sensitive and reduces the time of the assay. RISA has been used to analyze bac-

terial communities from soil (Borneman and Triplett 1997, Koroleva *et al.* 2021, Ranjard *et al.* 2000, Sigler *et al.* 2002), agronomic products (Ikeda *et al.* 2005), oral cavities (Mukherjee and Leys 2021), biofilms (De Luca *et al.* 2021), and outer ear (Burton *et al.* 2022).

5. Direct e-DNA sequencing: Metagenomics

New sequencing technologies are emerging at a fast pace, and now it is possible to direct sequence e-DNA (metagenome), giving rise to a new field called “metagenomics”. The classical examples of whole metagenome sequencing are acid mine drainage and the Sargasso Sea. Acid mine drainage represents one of the most extreme environments, with drainage water reaching a pH of 0–1. The microbial community forms a pink biofilm that floats on the surface of highly acidic drainage water. The biofilm is dominated by *Leptospirillum* species and contains *F. acidarmanus* at a relatively low abundance. Tyson and coworkers (2004) first constructed a 16S rRNA gene clone library and end sequenced 384 clones. The most abundant clones belonged to *Leptospirillum* group II. They found that 94% of the *Leptospirillum* group II clones were identical, and 17 minor variants were detected. Groups related to *Leptospirillum* group III, *Sulfobacillus*, and *Ferroplasma*, were also detected. They then cloned DNA from acid mine drainage and sequenced it with very high coverage. They were able to reconstruct nearly complete genomes of *Leptospirillum* group II and *Ferroplasma* type II. Metagenome sequencing of such an extreme environment not only deciphered the community structure but the load sharing in the community.

In another landmark metagenome sequencing project, Venter and co-workers (2004) sequenced the metagenome of a highly complex ecosystem—the Sargasso Sea. In this project, they claimed to have discovered many new genes. Six putative plasmids larger than 100 kbp in length, two plasmids of 70 to 80 kbp, and two plasmids under 10 kbp were also reconstructed. An important outcome of this project was the finding that rhodopsins are also present outside proteobacteria where they had previously been discovered. In another classical work, DeLong and co-workers (2006) used metagenome sequencing-based analysis of stratification of planktonic microbial communities in the North Pacific Subtropical Gyre. Samples were collected at different depths and a fosmid library was constructed for each depth. A vertical zonation of taxonomic groups, functional genes, and metabolic potential was found in this study.

Metagenome sequencing projects have also resulted in the reconstruction of whole genomes of uncultured organisms. *Buchnera aphidicola* is one such intracellular

symbiont of the aphid *Baizongia pistacea* whose complete genome has been assembled from metagenome data (van Ham *et al.* 2003). Insights into the genome of this symbiont suggest a reduced genome due to symbiotic life with 544 putative genes and nine pseudogenes. In a similar attempt, Woyke and colleagues (2009) sequenced the genomes of two uncultured marine flavobacteria from the Gulf of Maine. They employed fluorescence-activated cell sorting and multiple displacement to isolate genomic DNA from flavobacterium for sequencing. Shotgun sequencing yielded 1.9 Mbp in 17 contigs and 1.5 Mbp in 21 contigs with estimated genome recoveries of about 91% and 78%, respectively.

Metagenomics is a recent field and has been used in many recent investigations to study bacterial communities. It has been used to study the role of microbial community in bioelectrokinetic remediation of tannery contaminated soil (Prakash *et al.* 2021), microbial diversity on the US dollars and Chinese Renminbis (Lin *et al.* 2021), hexabromocyclododecane degradation by soil microbial community (Li *et al.* 2022), sediment microbial biodiversity associated with fishing exposure (Bruce *et al.* 2022), antibiotic resistance genes diversity in Taihu Lake, China (Bai *et al.* 2022), antimicrobial resistance and virulence factor genes in an Arctic permafrost region (Kim *et al.* 2022), antimicrobial resistance in patients with lower respiratory tract infections (Serpa *et al.* 2022), microbes associated with traditional Brazilian artisanal cheeses (Kothe *et al.* 2022), microbial community from a municipal landfill site (Gupta *et al.* 2022), and microbial community responsible for bioremediation of poly-contaminated groundwater (Hauptfeld *et al.* 2022). Metagenomics has also been used to study the effect of Bt cotton on the soil bacterial community (Lv *et al.* 2022) and the different environmental conditions of soda lakes on bacterial communities (Pellegrinetti *et al.* 2022). Metagenomics has also been used to reconstruct genomes from Siberian permafrost. Liang *et al.* (2021) used metagenomics to reconstruct genomes of fossil and living microorganisms, while Sipes *et al.* (Sipes *et al.* 2021) used metagenomics to assemble eight genomes from ancient Siberian permafrost.

6. From who is there to what are they doing?

With advances in molecular techniques, there is a change in ecologists' perspective. From their earlier approach to study bacterial community structure, the newer approach is to find out community function. Metagenome sequencing of acid mine drainage provides one classical example of linking community structure with function. Functionality of a bacterial community can also be characterized by the analy-

sis of transcripts (metatranscriptomics) or proteins (metaproteomics) (Rodriguez-Valera 2004).

Metatranscriptomics involves isolating mRNA from environmental samples and its reverse transcription to form cDNA, followed by cloning and sequencing. Metatranscriptomics has been used for different habitats, such as aquatic (Poretsky *et al.* 2005), marine (Frias-Lopez *et al.* 2008, Sun *et al.* 2021), soil (Urich *et al.* 2008), human respiratory tract (Ren *et al.* 2021), human lungs (Han *et al.* 2022), human breast cancer (Hadzega *et al.* 2021), human feces (Tanaka *et al.* 2022), and wood (Nerva *et al.* 2022). Metatranscriptomics has been used in many recent investigations to study: the effect of bioaugmentation on microbial community and function in a continuous anaerobic process treating cow manure (Li *et al.* 2021), the association of human respiratory microbiota with mortality in COVID-19 (Ren *et al.* 2021), microbial composition in human breast cancer primary tumour tissue (Hadzega *et al.* 2021), iron and carbon metabolism by diverse communities in Southern Ocean (Sun *et al.* 2021), changes in the lung microbiota due to SARS-CoV-2 infection (Han *et al.* 2022), microbial communities associated with the wood of 20-year-old grapevine plants (Nerva *et al.* 2022), and composition of the fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome (Tanaka *et al.* 2022). Many recent investigations have used a combination of metagenomics and metatranscriptomics to: get insights into the in situ microbial communities of Challenger Deep, a hadal trench (Zhou *et al.* 2022), identify antimicrobial resistance gene reservoirs present in poultry, ruminant, swine GI tracts and soil (Lawther *et al.* 2022); study changes in microbiota in patients with chronic obstructive pulmonary disease (Yang *et al.* 2022), and get insight into the functional ecology of the vaginal microbiota (France *et al.* 2022).

Metatranscriptomics suffers from a number of drawbacks, such as difficulty in isolating RNA, short half-life of RNA, and low correlation between RNA levels and corresponding proteins, as all the RNAs do not necessarily translate into proteins due to translational repression. So, directly assessing the protein product seems to have better prospects. Though proteomics as a field emerged in the middle of the 1970s (O' Farrell 1975), the term "metaproteomics" was proposed by Wilmes and Bond (2004). Metaproteomics involves isolation and purification of the environmental proteome and its separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Highly expressed protein spots are excised and identified by MALDI-TOF with peptide sequencing. Many protocols have been developed to isolate proteins from the environment. Singleton *et al.* (2003) found the snap-freeze protein extraction technique (using liquid nitrogen) to be the most efficient in extracting proteins from soil samples as compared

to the bead beating method. Wilmes and Bond (2004) devised a method for isolating proteome from a laboratory-scale activated sludge system optimized for enhanced biological phosphorus removal. Benndorf and colleagues (2007) used a modified method of lysis and protein separation from the soil matrix using 0.1 M NaOH and phenol.

In a classical study, Ram and colleagues (2005) used metaproteomics to characterize microbial biofilm from acid mine drainage. They detected 2033 proteins from the five most abundant species in the biofilm, which included 48% of the predicted proteins from the dominant biofilm organism, *Leptospirillum* group II. This study confirmed the earlier study by Tyson and coworkers (2004). Metaproteomics has been used in many recent investigations to study: functional aspects of anaerobic methanogenic microbiomes that deconstruct and utilize lignocellulose (Chirania *et al.* 2022), structure and function of microbial community with benzene-mineralizing, nitrate-reducing potential (Eziuzor *et al.* 2022), the composition of black extrinsic tooth stain in children (Hirtz *et al.* 2022), gut microbiota in children with autism spectrum disorder (Levi Mortera *et al.* 2022), and 30,000 year old fossilized woolly mammoths (Cucina *et al.* 2022). Many recent investigations have used a combination of metagenomics and metaproteomics to study: microbial structure and function of pre-denitrification biofilter in an urban wastewater treatment plant in China (Tian and Wang 2021) and the gut microbial community and gut barrier function in COVID-19 patients (Sun *et al.* 2022).

A multi-omics approach, including metagenomics, metatranscriptomics and metaproteomics, has now been used to get a deeper insight into bacterial community structure and function. Such a multi-omics approach has been used recently to discover bioactive microbial gene products in inflammatory bowel disease (Zhang *et al.* 2022) and to identify arsenic-methylating microorganisms in anoxic soil-derived microbial cultures (Viacava *et al.* 2022).

7. Summary

Studying microbial diversity has been the key aim of environmental microbiologists and ecologists. For this, various methods have been developed, which are classified as culture-dependent and culture-independent methods. The most promising culture independent method is whole metagenome sequencing. With tremendous growth in sequencing technologies and an increase in data output, it is now possible to get gigabases of data in a few days. This has increased the depth of sequence coverage, allowing more access to uncultivable bacterial diversity. Further improvements

in sequencing technologies and multi-omics approach will surely help explore a larger fraction of previously uncultured diversity.

References

1. Acuña J.J., Ruiz-Gil T., Marileo L., Carrazana E., Rilling J., Campos M., Correa-Araneda F., Fujiyoshi S., Jorquera M.A.: Airborne bacterial community associated with fine particulate matter (PM_{2.5}) under different air quality indices in Temuco city, Southern Chile. *Arch. Microbiol.* **204**, 148 (2022)
2. Adikari A.M.M.U., Priyashantha H., Disanayaka J.N.K., Jayatileka D.V., Kodithuwakku S.P., Jayatilake J.A.M.S., Vidanarachchi, J.K.: Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* species diversity from Meekiri: traditional fermented buffalo milk gels in Sri Lanka. *Heliyon*, **7**, e08136 (2021)
3. Al-Awadhi H., Dashti N., Khanafer M., Al-Maillem D., Ali N., Radwan S.: Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. *SpringerPlus*, **2**, 369 (2013)
4. Aponte H., Galindo-Castañeda T., Yáñez C., Hartmann M., Rojas, C.: Microbial community-level physiological profiles and genetic prokaryotic structure of burned soils under Mediterranean sclerophyll forests in Central Chile. *Front. Microbiol.* **13**, 824813 (2022)
5. Aravindraja C., Viszwapriya D., Valliammai A., Pandian S.K.: Community-based 16S rDNA fingerprinting analysis of geographically distinct marine sediments of unexplored coastal regions of Palk Bay and Gulf of Mannar. *Curr. Microbiol.* **79**, 60 (2022)
6. Bai Y., Ruan X., Li R., Zhang Y., Wang Z.: Metagenomics-based antibiotic resistance genes diversity and prevalence risk revealed by pathogenic bacterial host in Taihu Lake, China. *Environ. Geochem. Health*, **44**, 2531–2543 (2022)
7. Ballarini A., Segata N., Huttenhower C., Jousson O.: Simultaneous quantification of multiple bacteria by the BactoChip microarray designed to target species-specific marker genes. *PLoS One*, **8**, e55764 (2013)
8. Bayal N., Nagpal S., Haque M.M., Patole M.S., Shouche Y., Mande S.C., Mande S.S.: Structural aspects of lesional and non-lesional skin microbiota reveal key community changes in leprosy patients from India. *Sci. Rep.* **11**, 3294 (2021)
9. Beazley M.J., Sobecky P.A. et al.: Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the Deepwater Horizon oil spill. *PLoS One*, **7**, e41305 (2012)
10. Benndorf D., Balcke G.U., Harms H., von Bergen M.: Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J.* **1**, 224–234 (2007)
11. Berdi B., Spoering A.L., Ling L.L., Epstein S.S.: In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip. *Nat. Protoc.* **12**, 2232–2242 (2017)
12. Bernard G., Pathmanathan J.S., Lannes R., Lopez P., Bapteste E.: Microbial dark matter investigations: how microbial studies transform biological knowledge and empirically sketch a logic of scientific discovery. *Genome Biol. Evol.* **10**, 707–715 (2018)
13. Bharathkumar S., RameshKumar N., Paul D., Prabavathy V.R., Nair S.: Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism (SSCP). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 387–394 (2008)
14. Blackwood C.B., Marsh T., Sang-Hoon K., Paul E.A.: Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 926–932 (2003)

15. Boguhn J, Strobel E., Witzig M., Tebbe C.C., Rodehutschord M.: Description of the structural diversity of rumen microbial communities in vitro using single-strand conformation polymorphism profiles. *Arch. Anim. Nutr.* **62**, 454–467 (2008)
16. Borneman, J., Triplett, E.: Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2647–2653 (1997)
17. Bowman J.S.: Identification of microbial dark matter in antarctic environments. *Front. Microbiol.* **9**, 3165 (2018)
18. Brenes-Guillén L., Vidaurre-Barahona D., Morales S., Mora-López M., Sittenfeld A., Uribe-Lorío L.: Novel cyanobacterial diversity found in Costa Rican thermal springs associated with Rincon de la Vieja and Miravalles Volcanoes: a polyphasic approach. *J. Phycol.* **57**, 183–198 (2021)
19. Bruce S.A., Aytur S.A., Andam C.P., Bucci J.P.: Metagenomics to characterize sediment microbial biodiversity associated with fishing exposure within the Stellwagen Bank National Marine Sanctuary. *Sci. Rep.* **12**, 9499 (2022)
20. Burton M., Krumbeck J.A., Wu G., Tang S., Prem A., Gupta A.K., Dawson T.L. Jr.: The adult microbiome of healthy and otitis patients: Definition of the core healthy and diseased ear microbiomes. *PLoS One*, **17**, e0262806 (2022)
21. Cao J, Gao S, Chen J, Zhu B, Min R, Wang P: The preparation and clinical application of diagnostic DNA microarray for the detection of pathogens in intracranial bacterial and fungal infections. *Exp. Ther. Med.* **16**, 1304–1310 (2018)
22. Castro H., Newman S., Reddy K.R., Ogram A.: Distribution and stability of sulphate reducing prokaryotic and hydrogenotrophic methanogenic assemblages in nutrient-impacted regions of the Florida everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2695–2704 (2005)
23. Chen Y.A., Grace Liu P.W., Whang L.M., Wu Y.J., Cheng S.S.: Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. *J. Biosci. Bioeng.* **129**, 603–612 (2020)
24. Chiang E.L.C., Lee S., Medriano C.A., Li L., Bae S.: Assessment of physiological responses of bacteria to chlorine and UV disinfection using a plate count method, flow cytometry and viability PCR. *J. Appl. Microbiol.* **132**, 1788–1801 (2022)
25. Chirania P, Holwerda E.K., Giannone R.J., Liang X., Poudel S., Ellis J.C., Bomble Y.J., Hettich R.L., Lynd L.R.: Metaproteomics reveals enzymatic strategies deployed by anaerobic microbiomes to maintain lignocellulose deconstruction at high solids. *Nat. Commun.* **13**, 3870 (2022)
26. Cho J.C., Tiedje J.M.: Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3677–3682 (2001)
27. Connon S.A., Giovannoni S.J.: High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3878–3885 (2002)
28. Cucina A., Cunsolo V. et al.: Meta-proteomic analysis of two mammoth's trunks by EVA technology and high-resolution mass spectrometry for an indirect picture of their habitat and the characterization of the collagen type I, alpha-1 and alpha-2 sequence. *Amino Acids*, **54**, 935–954 (2022)
29. Cullen D.W., Hirsch P.R.: Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 983–993 (1998)
30. De Luca D., Caputo P., Perfetto T., Cennamo P.: Characterization of environmental biofilms colonising wall paintings of the Fornelle cave in the archaeological site of Cales. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**, 8048 (2021)
31. Delavat F., Lett M.C., Lièvreumont D.: Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biol. Direct*, **7**, 28 (2012)
32. DeLong E.F., Karl D.M. et al.: Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science*, **311**, 496–503 (2006)
33. Djuuna I.A.F., Prabawardani S., Massora M.: Population distribution of phosphate-solubilizing microorganisms in agricultural soil. *Microbes Environ.* **37**, ME21041 (2022)
34. Dong Z., Guo Y., Yu C., Zhixian Z., Rongli M., Deng W., Li Y., Hu X.: The dynamics in rhizosphere microbial communities under bacterial wilt resistance by mulberry genotypes. *Arch. Microbiol.* **203**, 1107–1121 (2021)
35. Dubey M., Yadav G., Kapuria A., Ghosh A., Muralidharan M., Lal D., Lal R., Dhanaraj P.S. Verma, M.: Exploring bacterial diversity from contaminated soil samples from river Yamuna. *Microbiology*, **83**, 585–588 (2014)
36. Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R.: Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 190–197 (2001)
37. Dunbar J., White S., Forney L.J.: Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1326–1331 (1997)
38. Dykhuizen D.E.: Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Anton. van Leeuwenhoek*, **73**, 25–33 (1998)
39. Enquahone S., van Marle G., Simachew A.: Plant growth-promoting characteristics of halotolerant endophytic bacteria isolated from *Sporobolus specatus* (Vahr) Kunth and *Cyperus laevigatus* L. of Ethiopian rift valley lakes. *Arch. Microbiol.* **204**, 403 (2022)
40. Erdiansyah M., Meryandini A., Wijaya M., Suwanto A.: Microbiological quality of tempeh with different wraps: banana leaf versus plastic. *J. Food Sci. Technol.* **59**, 300–307 (2022)
41. Eziuzor S.C., Corrêa F.B., Peng S., Schultz J., Kleinstuber S., da Rocha U.N., Adrian L., Vogt C.: Structure and functional capacity of a benzene-mineralizing, nitrate-reducing microbial community. *J. Appl. Microbiol.* **132**, 2795–2811 (2022)
42. Ferrer M., Aguilera M., Martinez V.: Effects of rifaximin on luminal and wall-adhered gut commensal microbiota in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 500 (2021)
43. Fisher M.M., Triplett E.W.: Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4630–4636 (1999)
44. France M.T., Fu L., Rutt L., Yang H., Humphrys M.S., Narina S., Gajer P.M., Ma B., Forney L.J., Ravel J.: Insight into the ecology of vaginal bacteria through integrative analyses of metagenomic and metatranscriptomic data. *Genome Biol.* **23**, 66 (2022)
45. Frerejacques M., Rousselle C., Gauthier L., Cottet-Emard S., Derobert L., Roynette A., Lerch T.Z., Changey F.: Human skin bacterial community response to probiotic (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938) introduction. *Microorganisms*, **8**, 1223 (2020)
46. Frias-Lopez J., Shi Y., Tyson G.W., Coleman M.L., Schuster S.C., Chisholm S.W., Delong E.F.: From the cover: microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3805–3810 (2008)
47. Garland J.L., Mills A.L.: Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351–2359 (1991)
48. Gelsomino A., Keyzer-Wolters A.C., Cacco G., van Elsas J.D.: Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, **38**, 1–15 (1999)
49. Ginawi A., Wang L., Wang H., Yu B., Yunjun Y.: Effects of environmental variables on abundance of ammonia-oxidizing communities in sediments of Luotian River, China. *PeerJ*, **8**, e8256 (2020)

50. Greene E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G., Voordouw G.: Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5282–5289 (2000)
51. Greene E.A., Voordouw G.: Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 211–219 (2003)
52. Griffiths B.S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G.: Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 145–153 (1998)
53. Gupta J., Rathour R., Dupont C., Mishra A., Thakur I.S.: Biogeochemical profiling and taxonomic characterization of municipal landfill site by metagenomic sequencing. *Bioresour. Technol.* **351**, 126936 (2022)
54. Gupta S.K., Lal D., Lata P., Sangwan N., Garg N., Holliger C., Lal R.: Changes in the bacterial community and *lin* genes diversity during biostimulation of indigenous bacterial community of hexachlorocyclohexane (HCH) dumpsite soil. *Microbiology*, **82**, 234–240 (2013)
55. Hadzega D., Mego M. et al.: Uncovering microbial composition in human breast cancer primary tumour tissue using transcriptomic RNA-seq. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9058 (2021)
56. Han Y., Jia Z., Shi J., Wang W., He K.: The active lung microbiota landscape of COVID-19 patients through the metatranscriptome data analysis. *Bioimpacts*, **12**, 139–146 (2022)
57. Hauptfeld E., Dutilh B.E. et al.: A metagenomic portrait of the microbial community responsible for two decades of bioremediation of poly-contaminated groundwater. *Water Res.* **221**, 118767 (2022)
58. Hayashi, K.: PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutation in genomic DNA. *PCR Methods Applic.* **1**, 34–38 (1991)
59. Herrero J., Puigserver D., Nijenhuis I., Kuntze K., Carmona J.M.: Key factors controlling microbial distribution on a DNAPL source area. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **29**, 1508–1520 (2022)
60. Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–3241 (1997)
61. Heuer H., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial community. In: van Elsas J.D., Wellington E.M.H., Trevors J.T. (ed.) *Modern Soil Microbiol.*, Marcel Dekker, Inc., New York, 353–373 (1997)
62. Heyndrickx M., Vauterin L., Vandamme P., Kersters K., De Vos P.: Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods*, **26**, 247–259 (1996)
63. Hirtz C., Vialaret J. et al.: Deciphering black extrinsic tooth stain composition in children using metaproteomics. *ACS Omega*, **7**, 8258–8267 (2022)
64. Hor P.K., Mondal K.C. et al.: Antiobesity, antihyperglycemic, and antidepressive potentialities of rice fermented food through modulation of intestinal microbiota. *Front. Microbiol.* **13**, 794503 (2022)
65. Hubert C., Shen Y., Voordouw G.: Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3064–3070 (1999)
66. Ikeda S., Fujimura T., Ytow N.: Potential application of ribosomal intergenic spacer analysis to the microbial community analysis of agronomic products. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5604–5611 (2005)
67. Jernigan A., Hestekin C.: Capillary electrophoresis single-strand conformational polymorphisms as a method to differentiate algal species. *J. Anal. Methods Chem.* **2015**, 272964 (2015)
68. Jezierska-Tys S., Joniec J., Mocek-Plóćiniak A., Gałazka A., Bednarz J., Furtak K.: Microbial activity and community level physiological profiles (CLPP) of soil under the cultivation of spring rape with the Roundup 360 SL herbicide. *J. Environ. Health Sci. Eng.* **19**, 2013–2026 (2021)
69. Kim H., Kim M., Kim S., Lee Y.M., Shin S.C.: Characterization of antimicrobial resistance genes and virulence factor genes in an Arctic permafrost region revealed by metagenomics. *Environ. Pollut.* **294**, 118634 (2022)
70. Kogure K., Simidu U., Taga N.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415–420 (1979)
71. Koroleva E., Mqulwa A.Z., Norris-Jones S., Reed S., Tambe Z., Visagie A., Jacobs K.: Impact of cigarette butts on bacterial community structure in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **28**, 33030–33040 (2021)
72. Kothe C.I., Mohellibi N., Renault P.: Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Res. Int.* **157**, 111265 (2022)
73. Kraigher B., Mandic-Mulec I.: Influence of diclofenac on activated sludge bacterial communities in fed-batch reactors. *Food Technol. Biotechnol.* **58**, 402–410 (2020)
74. Kumar A., Dubey A., Malla M.A., Dames J.: Pyrosequencing and phenotypic microarray to decipher bacterial community variation in *Sorghum bicolor* (L.) Moench rhizosphere. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2**, 100025 (2021)
75. Lal D., Jindal S., Kumari H., Jit S., Nigam A., Sharma P., Kumari K., Lal R.: Bacterial diversity and real-time PCR based assessment of *linA* and *linB* gene distribution at hexachlorocyclohexane contaminated sites. *J. Basic Microbiol.* **55**, 363–73 (2015)
76. Lawther K., Santos F.G., Oyama L.B., Rubino F., Morrison S., Creevey C.J., McGrath J.W., Huws S.A.: Resistome analysis of global livestock and soil microbiomes. *Front. Microbiol.* **13**, 897905 (2022)
77. Levi Mortera S., Putignani L. et al.: A metaproteomic-based gut microbiota profiling in children affected by autism spectrum disorders. *J. Proteomics*, **251**, 104407 (2022)
78. Li Y., Zhao J., Zhang Z.: Implementing metatranscriptomics to unveil the mechanism of bioaugmentation adopted in a continuous anaerobic process treating cow manure. *Bioresour. Technol.* **330**, 124962 (2021)
79. Li Y.J., Chuang C.H., Cheng W.C., Chen S.H., Chen W.L., Lin Y.J., Lin C.Y., Shih Y.H.: A metagenomics study of hexabromocyclododecane degradation with a soil microbial community. *J. Hazard. Mater.* **430**, 128465 (2022)
80. Liang R., Onstott T.C. et al.: Genomic reconstruction of fossil and living microorganisms in ancient Siberian permafrost. *Microbiome*, **9**, 110 (2021)
81. Lin J., Jiang W., Chen L., Zhang H., Shi Y., Liu X., Cai, W.: Metagenomic sequencing revealed the potential of banknotes as a repository of microbial genes. *BMC Genomics*, **22**, 173 (2021)
82. Liu Q., Sommer S.S.: Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *PCR Methods Applic.* **4**, 97–108 (1994)
83. Lv N., Liu Y., Guo T., Liang P., Li R., Liang P., Gao X.: The influence of Bt cotton cultivation on the structure and functions of the soil bacterial community by soil metagenomics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **236**, 113452 (2022)
84. Maheshwari R., Kumar P., Bhutani N., Suneja P.: Exploration of plant growth-promoting endophytic bacteria from *Pisum sativum* and *Cicer arietinum* from South-West Haryana. *J. Basic Microbiol.* **62**, 857–874 (2022)
85. Martínez-Toledo Á., González-Mille D.J., García-Arreola M.E., Cruz-Santiago O., Trejo-Acevedo A., Ilizaliturri-Hernández C.A.: Patterns in utilization of carbon sources in soil microbial

- communities contaminated with mine solid wastes from San Luis Potosi, Mexico. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **208**, 111493 (2021)
86. Martiny A.C.: High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *ISME J.* **13**, 2125–2128 (2019)
 87. Moya D., Fonturbel M.T., Lucas-Borja M.E., Peña E., Alfaro-Sanchez R., Plaza-Álvarez P.A., González-Romero J., de Las Heras J.: Burning season and vegetation coverage influenced the community-level physiological profile of Mediterranean mixed-Mesogean pine forest soils. *J. Environ. Manag.* **277**, 111405 (2021)
 88. Mukherjee C., Leys E.J.: Strain-level profiling of oral microbiota with targeted sequencing. *Methods Mol. Biol.* **2327**, 239–252 (2021)
 89. Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–400 (1993)
 90. Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W.: Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**, 165–172 (1995)
 91. Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S.: Detection and localization of single base changes by denaturing gradient electrophoresis. *Methods Enzymol.* **155**, 501–527 (1987)
 92. Nerva L., Chitarra W. et al.: The hidden world within plants: metatranscriptomics unveils the complexity of wood microbiomes. *J. Exp. Bot.* **73**, 2682–2697 (2022)
 93. Nicomrat D., Dick W.A., Dopson M., Tuovinen O.H.: Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 312–321 (2008)
 94. Nosalova L., Píková M., Bonova K., Pristas P.: Deep subsurface hypersaline environment as a source of novel species of halophilic sulfur-oxidizing bacteria. *Microorganisms*, **10**, 995 (2022)
 95. Nusslein K., Tiedje J.M.: Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3622–3626 (1999)
 96. O' Farrell P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975)
 97. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766–2770 (1989a)
 98. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.: A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**, 874–879 (1989b)
 99. Ortega-Retuerta E., Joux F., Jeffrey W.H., Ghiglione J.F.: Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). *Biogeosciences*, **10**, 2747–2759 (2013)
 100. Oscarsson E., Håkansson Å., Andrén Aronsson C., Molin G., Agardh D.: Effects of probiotic bacteria Lactobacillaceae on the gut microbiota in children with celiac disease autoimmunity: a placebo-controlled and randomized clinical trial. *Front. Nutr.* **8**, 680771 (2021)
 101. Ott S.J., Musfeldt M., Wenderoth D.F., Hampe J., Brant O., Fölsch U.R., Timmis K.N., Schreiber S.: Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 685–693 (2004)
 102. Overmann J., Abt B., Sikorski J.: Present and future of culturing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 711–730 (2017)
 103. Pellegrinetti T.A., Cotta S.R., Sarmiento H., Costa J.S., Delbaje E., Montes C.R., Camargo P.B., Barbiero L., Rezende-Filho A.T., Fiore M.F.: Bacterial communities along environmental gradients in tropical soda lakes. *Microb. Ecol.* (2022)
 104. Pino-Otín M.R., Ferrando N., Ballesteros D., Langa E., Roig F.J., Terrado E.M.: Impact of eight widely consumed antibiotics on the growth and physiological profile of natural soil microbial communities. *Chemosphere*, **305**, 135473 (2022)
 105. Poretsky R.S., Bano N., Buchan A., LeClerc G., Kleikemper J., Pickering M., Pate W.M., Moran M.A., Hollibaugh J.T.: Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4121–4126 (2005)
 106. Prakash A.A., Rajasekar A., Sarankumar R.K., AlSalhi M.S., Devanesan S., Aljaafreh M.J., Govarthanan M., Sayed S.R.M.: Metagenomic analysis of microbial community and its role in bioelectrokinetic remediation of tannery contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* **412**, 125133 (2021)
 107. Ram R.J., VerBerkmoes N.C., Thelen M.P., Tyson G.W., Baker B.J., Blake R.C. II, Shah M., Hettich R.L., Banfield J.F.: Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, **308**, 1915–1920 (2005)
 108. Ranjard L., Brothier E., Nazaret S.: Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5334–5339 (2000)
 109. Rappe M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Giovannoni S.J.: Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, **418**, 630–633 (2002)
 110. Ren L., Li M. et al.: Dynamics of the upper respiratory tract microbiota and its association with mortality in COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **204**, 1379–1390 (2021)
 111. Rincon-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M.: Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity*, **5**, 581–612 (2013)
 112. Rodriguez-Valera F.: Environmental genomics, the big picture. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 153–158 (2004)
 113. Rossmann B., Müller H., Smalla K., Mpiira S., Tumuhairwe J.B., Staver C., Berg G.: Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4933–4941 (2012)
 114. Rygaard A.M., Thøgersen M.S., Nielsen K.F., Gram L., Bentzon-Tilia, M.: Effects of gelling agent and extracellular signaling molecules on the culturability of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00243–17 (2017)
 115. Schleifer K.H., Stackebrandt E.: Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 143–187 (1983)
 116. Schmalenberger A., Tebbe C.C.: Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol. Ecol.* **12**, 251–262 (2003)
 117. Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R., Schleifer K.H.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4641–4647 (1996)
 118. Schumacher A.J., Lingle C.K., Silbernagel K.M., Thompson-Strehlow L.: Validation of the 3M™ Petrifilm™ coliform count plate for enumeration of coliforms in bottled water: AOAC performance tested methodSM 082101. *J. AOAC Int.* **105**, 866–875 (2022)
 119. Serpa P.H., Langelier C.R. et al.: Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections. *Genome Med.* **14**, 74 (2022)
 120. Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.M.: The sensitivity of single stranded conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomics*, **16**, 325–332 (1993)
 121. Shen Y., Stehmeier L.G., Voordouw G.: Identification of hydrocarbon-degrading bacteria in soil by reverse sample genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 637–645 (1998)

122. Sigler W.V., Crivii S., Zeyer J.: Bacterial succession in glacial forefield soils characterized by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. *Microb. Ecol.* **44**, 306–316 (2002)
123. Silveira D.D., Filho P.B., Philippi L.S., Cantão M.E., Foulquier A., Bayle S., Delforno T.P., Molle P.: In-depth assessment of microbial communities in the full-scale vertical flow treatment wetlands fed with raw domestic wastewater. *Environ. Technol.* **42**, 3106–3121 (2021)
124. Singleton I., Merrington G., Colvan S., Delahunty J.S.: The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Appl. Soil Ecol.* **23**, 25–32 (2003)
125. Sipes K., Almatari A., Eddie A., Williams D., Spirina E., Rivkina E., Liang R., Onstott T.C., Vishnivetskaya T.A., Lloyd K.G.: Eight metagenome-assembled genomes provide evidence for microbial adaptation in 20,000- to 1,000,000-year-old Siberian permafrost. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, e0097221 (2021)
126. Sipos R., Szekeley A., Revesz S., Marialigeti K.: Addressing PCR biases in environmental microbiology studies. In: *Methods in Molecular Biology*, 37–58 (2010)
127. Sofu A., Ekinci F.Y.: Bacterial diversity dynamics of traditional Turkish Ezine cheese as evaluated by PCR-DGGE and SSCP analysis. *Int. J. Dairy Tech.* **69**, 592–600 (2016)
128. Staley J.T., Konopka A.: Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985)
129. Steen A.D., Crits-Christoph A., Carini P., DeAngelis K.M., Fierer N., Lloyd K.G., Cameron Thrash J.: High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *ISME J.* **13**, 3126–3130 (2019)
130. Stewart E.J.: Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* **194**, 4151–4160 (2012)
131. Stingl U., Tripp H.J., Giovannoni S.J.: Improvements of high-throughput culturing yielded novel SAR11 strains and other abundant marine bacteria from the Oregon coast and the Bermuda Atlantic Time Series study site. *ISME J.* **1**, 361–371 (2007)
132. Stott M.B., Crowe M.A., Mountain B.W., Smirnova A.V., Hou S., Alam M., Dunfield P.F.: Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ. Microbiol.* **10**, 2030–2041 (2008)
133. Sugimoto M., Ohira H. et al.: Dysbiosis of the duodenal microbiota as a diagnostic marker for pancreaticobiliary cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* **13**, 2088–2100 (2021)
134. Sun Y., Debeljak P., Obernosterer I.: Microbial iron and carbon metabolism as revealed by taxonomy-specific functional diversity in the Southern Ocean. *ISME J.* **15**, 2933–2946 (2021)
135. Sun Z., Chen Y.M. et al.: Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med.* **20**, 24 (2022)
136. Takahashi M., Toyosaki M., Matsui K., Machida S., Kikkawa E., Ota Y., Kaneko A., Ogawa Y., Ando K., Onizuka M.: An analysis of oral microbial flora by T-RFLP in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.* **112**, 690–696 (2020)
137. Tamaki H., Hanada S., Sekiguchi Y., Tanaka Y., Kamagata Y.: Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.* **11**, 1827–1834 (2009)
138. Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nomura N., Matsumura M., Kamagata Y.: Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2162–2169 (2005)
139. Tanaka Y., Fukudo S. et al.: Omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptom exacerbation. *J. Gastroenterol.* **57**, 748–760 (2022)
140. Tang H., Li C., Shi L., Xiao X., Cheng K., Wen L., Li W.: Effect of different long-term fertilizer managements on soil nitrogen fixing bacteria community in a double-cropping rice paddy field of Southern China. *PLoS One*, **16**, e0256754 (2021)
141. Teske A., Sigalevich P., Cohen Y., Muyzer G.: Molecular identification of bacteria from coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4210–4215 (1996)
142. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57 (2000)
143. Thiele S., Basse A., Becker J.W., Lipski A., Iversen M.H., Mollenhauer G.: Microbial communities in the nepheloid layers and hypoxic zones of the Canary Current upwelling system. *Microbiologyopen*, **8**, e00705 (2019)
144. Thies J.: Molecular methods for studying soil ecology. In: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Elsevier, 85–118 (2007)
145. Thurnheer T., Gmur R., Guggenheim B.: Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J. Microbiol. Methods*, **56**, 37–47 (2004)
146. Tian L., Wang L.: Multi-omics analysis reveals structure and function of biofilm microbial communities in a pre-denitrification biofilter. *Sci. Total Environ.* **757**, 143908 (2021)
147. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
148. Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A., Øvreås L.: Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**, 53–62 (1998)
149. Torsvik V., Goksoyr J., Daane F.L.: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782–787 (1990a)
150. Torsvik V., Salte K., Soerheim R., Goksoyr J.: Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 776–781 (1990b)
151. Torsvik V., Sorheim R., Goksoyr J.: Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170–178 (1996)
152. Travanty N.V., Vargo E.L., Apperson C.S., Ponnusamy L.: Colonization by the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, modifies soil bacterial communities. *Microb. Ecol.* **84**, 240–256 (2022)
153. Tsavkelova E.A., Glukhareva I.D., Volynchikova E.A., Egorova M.A., Leontieva M.R., Malakhova D.V., Kolomeitseva G.L., Netrusov A.I.: Cyanobacterial root associations of leafless epiphytic orchids. *Microorganisms*, **10**, 1006 (2022)
154. Tsujimoto H., Higuchi K. et al.: Effect of a proton-pump inhibitor on intestinal microbiota in patients taking low-dose aspirin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **77**, 1639–1648 (2021)
155. Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.F.: Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, **428**, 37–43 (2004)
156. Urich T., Lanzen A., Qi J., Huson D.H., Schleper C., Schuster S.C.: Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One*, **3**, e2527 (2008)
157. van Elsas J.D., Mantynen V., Wolters A.: Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fert. Soils*, **24**, 188–195 (1997)
158. van Ham R.C.H.J., Moya A. et al.: Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 581–586 (2003)

159. Venter J.C., Smith H.O. et al.: Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, **304**, 66–74 (2004)
160. Viacava K., Qiao J., Janowczyk A., Poudel S., Jacquemin N., Meibom K.L., Shrestha H.K., Reid M.C., Hettich R.L., Bernier-Latmani R.: Meta-omics-aided isolation of an elusive anaerobic arsenic-methylating soil bacterium. *ISME J.* **16**, 1740–1749 (2022)
161. Voordouw G., Voordouw J.K., Jack T.R., Foght J., Fedorak P.M., Westlake D.W.S.: Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3542–3552 (1992)
162. Voordouw G., Voordouw J.K., Karkhoff-Schweizer R.R., Fedorak P.M., Westlake D.W.S.: Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3070–3078 (1991)
163. Wang Y., Liu T., Tang J., Xiong Z., Song L., Ma T.: Vertical distribution and effect of historical residual organochlorine pesticides on microbial community structure in sediment cores from an abandoned oxidation pond after dredging for 15 years. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **29**, 8306–8322 (2022)
164. Wayne L.G., Truper H.G. et al.: Report of the ad-hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**, 463–464 (1987)
165. White B., Sterrett J.D., Grigoryan Z., Lally L., Heinze J.D., Alikhan H., Lowry C.A., Perez L.J., DeSipio J., Phadtare S.: Characterization of gut microbiome and metabolome in *Helicobacter pylori* patients in an underprivileged community in the United States. *World J. Gastroenterol.* **27**, 5575–5594 (2021)
166. Wilmes P., Bond P.L.: The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ. Microbiol.* **6**, 911–920 (2004)
167. Wintzingerode F.V., Gobel U.B., Satackebrandt E.: Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfall of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 213–229 (1997)
168. Wolińska A., Kruczyńska A., Grządziel J., Gałązka A., Marzec-Grządziel A., Szałaj K., Kuźniar A.: Functional and seasonal changes in the structure of microbiome inhabiting bottom sediments of a pond intended for ecological king carp farming. *Biology*, **11**, 913 (2022)
169. Woyke T., Stepanauskas R. et al.: Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One*, **4**, e5299 (2009)
170. Yang J., Zhang Q., Zhang J., Ouyang Y., Sun Z., Liu X., Qiao F., Xu L.Q., Niu Y., Li J.: Exploring the change of host and microorganism in chronic obstructive pulmonary disease patients based on metagenomic and metatranscriptomic sequencing. *Front. Microbiol.* **13**, 818281 (2022)
171. Zangeneh Z., Abdi-Ali A., Khamooshian K., Alvandi A., Abiri R.: Bacterial variation in the oral microbiota in multiple sclerosis patients. *PLoS One*, **16**, e0260384 (2021)
172. Zhang, Y., Franzosa E.A. et al.: Discovery of bioactive microbial gene products in inflammatory bowel disease. *Nature*, **606**, 754–760 (2022)
173. Zhou B., Fan X., Song J., Wu J., Pan L., Tu K., Peng J., Dong Q., Xu J., Wu J.: Growth simulation of *Pseudomonas fluorescens* in pork using hyperspectral imaging. *Meat Sci.* **188**, 108767 (2022)
174. Zhou Y.L., Mara P., Cui G.J., Edgcomb V.P., Wang Y.: Microbiomes in the Challenger Deep slope and bottom-axis sediments. *Nat. Commun.* **13**, 1515 (2022)
175. Zumstein E., Moletta R., Godon J.J.: Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2**, 69–78 (2000)

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA – ZNACZENIE KLINICZNE, LECZENIE ZAKAŻEŃ

Joanna Nowicka^{1*}, Adriana Janczura¹, Martyna Lełonekiewicz²

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski

² Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów, działające przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski

Wpłynęło w marcu 2022 r., zaakceptowano w sierpniu 2023 r.

Streszczenie: *Stenotrophomonas maltophilia* to istotny czynnik etiologiczny zakażeń u pacjentów z zaburzonym funkcjonowaniem układu immunologicznego, poddanych inwazyjnym zabiegom diagnostycznym i terapeutycznym, z chorobą nowotworową czy mukowiscydozą. Stanowi zagrożenie przede wszystkim dla pacjentów hospitalizowanych. Ze względu na szeroką oporność naturalną, jak i narastającą oporność nabytą terapia zakażeń powodowanych przez ten mikroorganizm stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. W pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat ogólnej charakterystyki, znaczenia klinicznego i najważniejszych czynników chorobotwórczości pałeczek *S. maltophilia*. Omówiono możliwości terapeutyczne, również te alternatywne, przy zakażeniach wywołanych przez te drobnoustroje.

1. Wprowadzenie – ogólna charakterystyka i znaczenie kliniczne *Stenotrophomonas maltophilia*. 2. Postacie kliniczne zakażeń. 3. Czynniki predysponujące do zakażeń. 4. Najważniejsze czynniki chorobotwórczości *Stenotrophomonas maltophilia*. 5. Leczenie zakażeń wywołanych przez *S. maltophilia*. 5.1. Nowe opcje terapeutyczne. 6. Podsumowanie

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA – CLINICAL SIGNIFICANCE, TREATMENT OF INFECTIONS

Abstract: *Stenotrophomonas maltophilia* is an important etiological factor of infections in patients with compromised immune systems, undergoing invasive diagnostic and therapeutic procedures, as well as in those suffering from cancer or cystic fibrosis. It poses a threat primarily to hospitalized patients. Due to its broad natural resistance and increasing acquired resistance, the therapy of infections caused by this pathogen is a challenge for modern medicine. The paper presents the current knowledge about the general characteristics, clinical significance and the most important pathogenicity factors of *S. maltophilia*. It also discusses therapeutic possibilities, including alternative ones, in infections caused by these microorganisms.

1. Background – general characteristics and clinical significance of *Stenotrophomonas maltophilia*. 2. Clinical forms of infections. 3. Factors predisposing to infections. 4. Most important pathogenicity factors of *Stenotrophomonas maltophilia*. 5. Treatment of infections caused by *S. maltophilia*. 5.1. New therapeutic options. 6. Summary

Słowa kluczowe: infekcje oportunistyczne, MDR, pacjenci z obniżoną odpornością, *S. maltophilia*

Keywords: opportunistic infections, MDR, immunocompromised patients, *S. maltophilia*

1. Wprowadzenie – ogólna charakterystyka i znaczenie kliniczne *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia to Gram-ujemna pałeczka niefermentująca, wykazująca zdolność poruszania się (Insuwanno *et al.* 2020). Po raz pierwszy została wyizolowana w 1943 roku. Początkowo klasyfikowana jako *Bacterium bookeri*, później *Pseudomonas maltophilia* i *Xanthomonas maltophilia*. Dopiero

w 1993 roku Palleroni i Brandbury wykazali różnicę pomiędzy rodzajem *Xanthomonas* i należącym do niego *X. maltophilia* i zaproponowali powstanie nowego rodzaju *Stenotrophomonas*. Obecnie rodzaj ten obejmuje kilkanaście gatunków, wśród których największe znaczenie kliniczne ma *S. maltophilia* (Brooke 2012, Bartoszek i Fleischer 2013).

S. maltophilia to krótka, prosta pałeczka o małych wymaganiach odżywczych. Rośnie na standardowych

* Autor korespondencyjny: Joanna Nowicka, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław, tel. 71 784 12 97, fax. 71 784 01 17, e-mail: joanna.nowicka@umed.wroc.pl

© 2023 Joanna Nowicka i wsp.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Stenotrophomonas maltophilia – znaczenie kliniczne, leczenie zakażeń, Joanna Nowicka i wsp., ADV MICROBIOL-NY, 2023, 62, 3/4, 12, <https://doi.org/10.2478/am-2023-0012>

podłożach, w warunkach tlenowych, w szerokim zakresie temperatur. Optymalna temperatura wzrostu to 35–37°C, chociaż opisywane są również izolaty środowiskowe wykazujące lepszy wzrost w niższych temperaturach, w zakresie 20–30°C. Większość szczepów jest w stanie przetrwać również w temperaturze 4°C (Brooke 2012, Mahdi *et al.* 2014, Szewczyk 2019). Na agarze z krwią rosną pod postacią błyszczących, okrągłych kolonii o lawendowym zabarwieniu (przy wydłużonej inkubacji wykazują barwę żółtozieloną) i silnym zapachu amoniaku (Szewczyk 2019). Na podłożu MacConkeya nie rozkładają laktozy i wyrastają jako bezbarwne kolonie (Mahdi *et al.* 2014, Szewczyk 2019). Tolerują szeroki zakres pH (Mahdi *et al.* 2014).

Najważniejsze cechy biochemiczne tych drobnoustrojów, umożliwiające odróżnienie od innych pałeczek niefermentujących, to dekarboksylacja lizyny i brak wytwarzania oksydazy cytochromowej, choć mogą zdarzyć się szczepy oksydazododatnie (Brooke 2012, Szewczyk 2019).

Są to mikroorganizmy szeroko rozpowszechnione w środowisku, miejscem ich naturalnego bytowania w przyrodzie jest przede wszystkim gleba i woda (Kalidasan *et al.* 2018, Szewczyk 2019). *S. maltophilia* izolowano między innymi od zwierząt, z korzeni roślin, z rzek i jezior, z oczyszczalni ścieków, systemów uzdatniania i dystrybucji wody, wody z kranu czy z wody butelkowanej (Brooke 2012). Pałeczki te obecne są również w środowisku szpitalnym. *S. maltophilia* zidentyfikowano w próbkach pochodzących z wody do hemodializy czy z niektórych zanieczyszczonych antyseptyków, przede wszystkim tych zawierających chlorheksydynę i cetrymid. *S. maltophilia* izolowano z baterii kranów, natrysków szpitalnych, zanieczyszczonych endoskopów, z aparatury medycznej, z elektronicznych czujników temperaturowych respiratora, mydła stosowanego do mycia rąk, a nawet kart medycznych pacjentów (Brooke 2012, Zając *et al.* 2014).

Pałeczki te są rzadko izolowane jako czynniki etiologiczne zakażeń u osób zdrowych ze sprawnie działającym układem immunologicznym, uchodzą więc za drobnoustroje oportunistyczne, będące zagrożeniem przede wszystkim dla osób z obniżoną odpornością i chorych na mukowiscydozę (Kalidasan *et al.* 2018, Mojica *et al.* 2022). Mikroorganizmy te mają ograniczony potencjał patogenności w odniesieniu do zdrowego gospodarza (Kalidasan *et al.* 2018). Z drugiej jednak strony pojawiają się coraz częściej opisy przypadków zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje u osób ze sprawnym układem immunologicznym (Jiang *et al.* 2022, Mojica *et al.* 2022).

Autorzy pracy na bazie najbardziej aktualnego piśmiennictwa postarają się przybliżyć czytelnikowi najważniejsze aspekty patogenności tych mikroorganizmów.

2. Postacie kliniczne zakażeń

Stenotrophomonas maltophilia jako patogen oportunistyczny powoduje głównie zakażenia u osób immunodeficytowych. Najczęściej są to zakażenia szpitalne, ale mogą być także infekcje pozaszpitalne (Bartoszek i Fleischer 2013, Gajdacs i Urban 2019, Guerci *et al.* 2019). Pałeczki te mogą kolonizować drogi oddechowe pacjentów, występować przez długi czas w płwocinie pacjentów, także tych z mukowiscydozą (Gajdacs i Urban 2019, Mojica *et al.* 2022).

Najczęstsze postacie kliniczne zakażeń to szpitalne infekcje dolnych dróg oddechowych, przede wszystkim zapalenie płuc i zaostrzenia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, oraz zakażenia krwi, głównie odcewnikowe (Gajdacs i Urban 2019, Mojica *et al.* 2022). Z innych warto wymienić zakażenia skóry i tkanek miękkich, kości i stawów, dróg moczowych, dróg żółciowych czy infekcje dotyczące gałki ocznej, wsierdza, wątroby i opon mózgowo-rdzeniowych (Bartoszek i Fleischer 2013, Brooke 2021, Gajdacs i Urban 2019, Mojica *et al.* 2022, Said *et al.* 2022).

W 2017 *S. maltophilia* stanowił jeden z dziesięciu najczęściej izolowanych drobnoustrojów odpowiedzialnych za szpitalne zapalenie płuc (HAP – hospital-acquired pneumonia) na oddziałach intensywnej terapii w wybranych krajach Europy, co stanowiło około 5% wśród wszystkich czynników etiologicznych HAP (ECDC 2019). Analiza retrospektywna przeprowadzona przez Guerci i wsp. (2019) wykazała, że spośród 102 316 pacjentów hospitalizowanych na oddziale intensywnej opieki medycznej różnych ośrodków medycznych we Francji w latach 2012–2017 u 282 szpitalne zapalenie płuc wywołane było przez *S. maltophilia* (2019). Autorzy wykazali, że HAP o takiej etiologii występowało przede wszystkim u pacjentów z długim pobytem na OIOM, poddanych wentylacji inwazyjnej (Chen i Zou 2022, Guerci *et al.* 2019). U pacjentów z ciężkim upośledzeniem odporności *S. maltophilia* może powodować krwotoczne zapalenie płuc (Araoka i Yoneyama 2012, Imoto *et al.* 2020). Dotyczy to najczęściej chorych z nowotworami układu krwiotwórczego, neutropenią, którzy przeszli chemioterapię przeciwnowotworową lub otrzymali przeszczep komórek macierzystych (Imoto *et al.* 2020, Zhu *et al.* 2021). Analiza przeprowadzona przez Zhu i wsp. wykazała, że prawdopodobieństwo rozwoju krwotocznego zapalenia płuc było wyższe u pacjentów m.in. z podwyższonym poziomem prokalcytoniny i neutropenią (Zhu *et al.* 2021).

S. maltophilia coraz częściej odpowiedzialny jest za zakażenia u chorych na mukowiscydozę (Bartoszek i Fleischer 2013), rośnie też liczba pacjentów skolonizowanych przez te pałeczki. Według danych francuskich w roku 1999 i 2018 odnotowano odpowiednio 4,7% i 10,3% pacjentów skolonizowanych *S. maltophilia*

(Menetrey *et al.* 2021). Zauważono większą częstotliwość hospitalizacji oraz pogorszenie czynności płuc u pacjentów skolonizowanych (Menetrey *et al.* 2021). Badania przeprowadzone przez Granchelli i wsp. (2018), obejmujące lata 2003–2011 również wskazują na wzrost częstości izolacji *S. maltophilia*. Odsetek pacjentów z zakażeniem *S. maltophilia* u chorujących na mukowiscydozę w roku 2003 i 2011 wynosił odpowiednio 12% i 14,7% (Granchelli *et al.* 2018). Dane szacunkowe wskazują, że zakażenia wywołane przez *S. maltophilia* mogą dotyczyć 10–18% pacjentów z mukowiscydozą (Gallagher *et al.* 2019).

Zakażenia krwi w większości przypadków są związane z obecnością cewnika naczyniowego (Bartoszek i Fleischer 2013, Said *et al.* 2022), ale także mogą być powikłaniem zapalenia płuc, zakażenia układu pokarmowego czy moczowego, a także zakażenia ran operacyjnych (Bartoszek i Fleischer 2013). Analiza przeprowadzona przez Kim i wsp. (2019) wykazała, że bakteriami *S. maltophilia* w 38,9% przypadków była związana ze stosowaniem cewnika naczyniowego, w 30,2% i 27,8% odpowiednio z infekcją wewnątrzbrzuszną i zakażeniem układu oddechowego. Śmiertelność w przebiegu bakteriemii *S. maltophilia* wynosiła 65,1% (Kim *et al.* 2019). Osawa i wsp. (2018) przeprowadzając analizę retrospektywną czynników ryzyka zgonu wśród pacjentów z bakteriami *S. maltophilia* w latach 2010–2017 zauważyli wzrost śmiertelności w latach 2014–2017 w porównaniu do 2010–2013 roku (Osawa *et al.* 2018). Bakteriemia wywołana przez *S. maltophilia* charakteryzuje się wysoką śmiertelnością. Jest zagrożeniem m.in. dla pacjentów w ciężkim stanie, z chorobami współistniejącymi czy pacjentów wcześniej przyjętych na oddziały intensywnej terapii (Kanchanasuwan *et al.* 2022).

Inne zakażenia wywołane przez *S. maltophilia* to zakażenia skóry i tkanek miękkich, przede wszystkim zakażenia ran czy zakażenia tkanki łącznej (Bartoszek i Fleischer 2013, Said *et al.* 2022). Przegląd literatury dokonany przez Abdulhak i wsp. (2009) wykazał, że zapalenie tkanki łącznej, przerzutowe lub pierwotne, przy nienaruszonej skórze występowało przede wszystkim u pacjentów z obniżoną odpornością. Infekcje były powiązane znacząco z obecnością nowotworów hematologicznych, stosowaną chemioterapią, a także z neutropenią (Bin Abdulhak *et al.* 2009). W 2014 roku opisano przypadek wrzodu skóry palców u pacjenta immunokompetentnego z zakażeniem *S. maltophilia*. Pacjent zgłosił się do szpitala z martwicą dystalnej części drugiego i trzeciego palca prawej ręki. Wyniki morfologii krwi, badania czynnościowe nerek i wątroby oraz przesiewowe badania immunologiczne były prawidłowe. Z materiału pobranego od pacjenta (biopsja głęboka, wymaz z wysięku) wyizolowano *S. maltophilia*. Szczep wykazywał wrażliwość na kotrimoksazol (Trignano *et al.* 2014).

S. maltophilia może być także przyczyną zakażeń układu moczowego (ZUM), przede wszystkim u pacjentów cewnikowanych. Zauważono, że obecność podstawowego procesu chorobowego dotyczącego nerek i dróg moczowych, np. kamica nerkowa oraz inne czynniki ryzyka sprzyjały rozwojowi ZUM (Bartoszek i Fleischer 2013, Said *et al.* 2022, Umar *et al.* 2022).

Warto zaznaczyć, że *S. maltophilia* może także powodować zakażenia pozaszpitalne, zarówno u osób dorosłych jak i dzieci. Najczęstsze postacie kliniczne zakażeń to zakażenia dróg oddechowych, infekcje dotyczące oka, zakażenia układu moczowego, ran i tkanek miękkich, zapalenie ucha a także zakażenia kości i stawów (Mojica *et al.* 2022). Ijang i wsp. (2022) w 2022 opisali przypadek pozaszpitalnego zakażenia o etiologii *S. maltophilia* u dziecka ze sprawnym układem immunologicznym (Jiang *et al.* 2022). Roczna dziewczynka została przyjęta do szpitala z powodu kaszlu i gorączki. Prześwietlenie klatki piersiowej wykazało prawostronne zapalenie płuc. Z krwi wyhodowano *S. maltophilia*. Zastosowane leczenie (początkowo meropenem, zamieniony na ceftazydym) przyniosło dobry efekt terapeutyczny. U dziewczynki nie wykazano żadnej choroby podstawowej ani wcześniejszej hospitalizacji (Jiang *et al.* 2022). Podobnie Geller i wsp. (2018) w 2018 roku przedstawili przypadek zapalenia płuc u 61-letniego mężczyzny bez chorób współistniejących. U mężczyzny występował uporczywy kaszel z odkrztuszaniem, tomografia komputerowa klatki piersiowej wykazała zmiany w lewym płucu. W płwocinie zidentyfikowano *S. maltophilia*. Zastosowane leczenie (lewofloksacyna) okazało się skuteczne (Geller *et al.* 2018). Aydemir i wsp. (2008) w 2008 roku opisali przypadek 8-letniej dziewczynki z septycznym zapaleniem prawego stawu kolannowego o etiologii *S. maltophilia*, po urazie penetrującym. Infekcja również wystąpiła u zdrowego dziecka bez czynników ryzyka. Po antybiotykoterapii celowanej (trimetoprim/sulfametoksazol, amikacyna) zakażenie zostało wyleczone (Aydemir *et al.* 2008).

Zakażenia z udziałem *S. maltophilia* mogą mieć również charakter mieszany, z trudną do ustalenia rolą *S. maltophilia* w tego rodzaju zakażeniach. Drobnoustrój ten izolowano m. in. z innymi pałeczkami niefermentującymi (np. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), pałeczkami jelitowymi (np. *E. coli* czy *E. cloacae*) czy ziarniakami Gram-dodatnimi (np. *Enterococcus* spp., gronkowce koagulazo-ujemne) (Mojica *et al.* 2022).

3. Czynniki predysponujące do zakażeń

Za czynniki ryzyka zakażeń pałeczkami *S. maltophilia* uznaje się inwazyjne zabiegi diagnostyczne i terapeutyczne, stosowanie elementów obcych (biomateriałów), choroby nowotworowe, mukowiscydozę,

zaburzoną czynność układu immunologicznego organizmu pacjenta, zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome), przewlekłą chorobę układu oddechowego, terapię lekami o działaniu immunosupresyjnym, długotrwałe stosowanie antybiotyków, przede wszystkim karbapenemów, oraz długotrwałą hospitalizację, głównie na oddziale intensywnej opieki medycznej (OIOM). Pobyt na takim oddziale, stosowanie antybiotyków, wspomagany oddech, obecność cewnika naczyniowego czy moczowego to czynniki zwiększające znacznie ryzyko śmiertelności wśród pacjentów z zakażeniem pałeczkami *S. maltophilia* (Brooke 2012, Mojica *et al.* 2022, Zajac *et al.* 2022). Śmiertelność jest wysoka, może sięgać od 20% do 70% (Gajdács i Urbán 2020, Zajac *et al.* 2022). *S. maltophilia* to przede wszystkim czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych, rzadko zakażeń pozaszpitalnych. Zakażenia mogą dotyczyć zarówno dorosłych jak i dzieci (Zajac *et al.* 2022).

Insuwanno i wsp. (2020) przeprowadzając charakterystykę kliniczną pacjentów z zakażeniami *S. maltophilia* wykazali, że czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażenia, który stwierdzono u większości pacjentów (91%), było wcześniejsze stosowanie antybiotyków, przede wszystkim karbapenemów. Chorem z zakażeniem *S. maltophilia* podawano (w okresie ostatnich 2 tygodni) karbapenemy (56%), piperacylinę z tazobaktamem (16%) oraz cefalosporyny (10%). 58% pacjentów było sztucznie wentylowanych, a 77% miało założony cewnik naczyniowy. Niewydolność wielonarządową, chemioterapię, a także stosowanie leczenia immunosupresyjnego wykazano odpowiednio u 37%, 13% i 33% pacjentów. W przypadku 88% pacjentów stwierdzono niskie stężenie albuminy w surowicy. Osłabiona czynność układu immunologicznego u tych chorych była spowodowana chorobą podstawową, terapią kortykosteroidami lub chemioterapią. Średnia wieku wynosiła 66 lat. Mężczyźni stanowili 47% pacjentów (Insuwanno *et al.* 2020).

Analiza przeprowadzona przez Duan i wsp. (2020) oceniająca czynniki ryzyka zakażeń pałeczkami *S. maltophilia* wykazała, że najczęściej izolatów pałeczek pochodziło od pacjentów z oddziału intensywnej opieki medycznej, a materiał, z którego najczęściej izolowano szczepy to płwocina (87%). 79% to pacjenci w wieku 60 lat lub starsi, 67% stanowili mężczyźni. 38% pacjentów, przed izolacją szczepów, poddawana była inwazyjnym zabiegom diagnostycznym lub terapeutycznym. U ponad 92% pacjentów stwierdzono chorobę podstawową (m.in. nadciśnienie, choroba wieńcowa, niewydolność nerek, białaczka), u 27% pacjentów wykazano chorobę nowotworową (nowotwór złośliwy). U wszystkich wykazano wcześniejsze przyjmowanie antybiotyków, przy czym najczęściej były to cefalosporyny (70%) i karbapenemy (57%). Pacjenci w wieku 60 lat i starsi byli bardziej podatni na zakażenie *S. mal-*

tophilia co może mieć związek z ich immunosupresją. Ponadto było stosunkowo więcej pacjentów płci męskiej. Według Duan i wsp. (2020) uzyskane wyniki wskazują na konieczność zwrócenia większej uwagi na zapobieganie zakażeniom pałeczkami *S. maltophilia* w niektórych grupach pacjentów (Duan *et al.* 2020).

W 2022 roku Wang i wsp. (2022) przeprowadzili metaanalizę dotyczącą czynników ryzyka nabytego zapalenia płuc o etiologii *S. maltophilia* u pacjentów hospitalizowanych na OIOM. Autorzy do analizy wybrali artykuły opublikowane w latach 2002–2022 oceniając stan ogólny pacjenta, choroby współistniejące, procedury inwazyjne i stosowane związki przeciwdrobnoustrojowe (płeć i wiek pacjenta, wynik skali APACHE-II (Acute Physiology and Chronic Evaluation; ocena ciężkości choroby oraz prognozowanie ryzyka zgonu), długość pobytu na OIOM, skala Glasgow, stosowanie glikokortykosteroidów, nowotwory złośliwe, cukrzyca, choroby układu krążenia, niewydolność nerek, zaburzenia odporności, intubacja dotchawicza, założone cewniki, zabiegi, stosowanie karbapenemów, aminoglikozydów i chinolonów). Analiza wykazała, że pacjenci OIOM-u, z obturacyjną chorobą płuc i nowotworem złośliwym byli najbardziej narażeni na rozwój zapalenia płuc o etiologii *S. maltophilia*. Nie wykazano takiej zależności w przypadku innych chorób, np. cukrzyca czy niewydolności nerek. Przyjmowanie glikokortykosteroidów nie było czynnikiem zwiększającym ryzyko zapalenia płuc wśród tych pacjentów, w przeciwieństwie do wentylacji mechanicznej i intubacji dotchawiczej. Wraz z wydłużeniem czasu wentylacji mechanicznej ryzyko zapalenia płuc rosło. Autorzy zwracają również uwagę na długotrwałe stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania, które jest istotnym czynnikiem ryzyka zakażeń szpitalnych wywołanych przez *S. maltophilia*, w tym również zapalenia płuc. Zalecają szczególną ostrożność u pacjentów hospitalizowanych na OIOM przyjmujących jednocześnie kilka antybiotyków (Wang *et al.* 2022).

Kliniczną charakterystykę pacjentów, u których izolowano *S. maltophilia* z krwi przeprowadził Kanchanasuwan i wsp. (2022). Autorzy ocenili czynniki ryzyka śmiertelności wśród pacjentów z bakterią *S. maltophilia*. Wzięto pod uwagę wiek pacjentów, płeć, masę ciała, choroby współistniejące (np. choroba naczyń mózgowych, sercowo-naczyniowa, przewlekła choroba nerek, cukrzyca) i stan obniżonej odporności (liczba neutrofilów $< 0,5 \times 10^9/l$ ponad dwa tygodnie lub stosowane leczenie immunosupresyjne – chemioterapia w ciągu 6 tygodni, kortykosteroidy dłużej niż 2 tygodnie lub leki przeciwreumatyczne). Informacje kliniczne obejmowały również przypadki zapalenia płuc, wstępną hospitalizację na OIOM, punktację stanu pacjenta w skali APACHE II, historię wcześniejszej antybiotykoterapii oraz stosowanie inwazyjnych

urządzeń medycznych (Kanchanasuwan *et al.* 2022). Średnia wieku pacjentów wynosiła 45 lat, 66% stanowili mężczyźni, a u 90% osób stwierdzono choroby współistniejące. Autorzy wskazali na dużą częstość występowania otyłości, która dotyczyła 70% pacjentów. 46% chorych było w stanie krytycznym (średnia punktacja APACHE II 19), u ponad połowy stwierdzono zapalenie płuc. U większości pacjentów (82%) zastosowano wentylację mechaniczną, cewnik naczyniowy (62%) czy moczowy (86%). Zdecydowana większość pacjentów (96%) przyjmowała przed wystąpieniem zakażenia karbapenemy, cefalosporyny (73%), fluorochinolony (62%) i aminoglikozydy (32%). Autorzy pracy zaznaczają, że zakażenie *S. maltophilia* dotyczy przede wszystkim pacjentów z wcześniejszym podawaniem środków przeciwdrobnoustrojowych, w szczególności karbapenemów. Stosowanie karbapenemów u hospitalizowanych pacjentów może przyczynić się do selektywnego wzrostu niewrażliwych izolatów *S. maltophilia* i wywoływania zakażeń przez te drobnoustroje (Kanchanasuwan *et al.* 2022).

Zöllner i wsp. (2021) przeprowadzili dziesięcioletnią (2011–2020) obserwację częstości izolacji *S. maltophilia* od pacjentów pediatrycznych z chorobą onkologiczną lub hematologiczną, w tym u pacjentów po autologicznym lub allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. W okresie tym *S. maltophilia* był czynnikiem etiologicznym zakażeń u 10-ciu pacjentów (4 pacjentów z zakażeniem łożyska naczyniowego; 3 z zakażeniem łożyska naczyniowego i zapaleniem płuc; 2 pacjentów z zakażeniem łożyska naczyniowego i zakażeniem tkanek miękkich; 1 pacjent z zapaleniem płuc z ropniem wewnątrzpłucnym bez izolacji *S. maltophilia* z krwi). Wykazano wzrost częstości izolacji *S. maltophilia* w okresie 2016–2020 (7 przypadków) w porównaniu do lat 2011–2015 (3 przypadki). Pięciu pacjentów było płci żeńskiej, pięciu płci męskiej, średnia wieku wynosiła 10,4 lata. Pięciu pacjentów miało ostrą białaczkę limfoblastyczną, pięciu było po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, u siedmiu stosowano terapię przeciwnowotworową lub immunosupresyjną, wszyscy pacjenci mieli założony cewnik dożylny. U 7 pacjentów stwierdzono powierzchowną kolonizację pałeczkami *S. maltophilia*, ale nie wykazano związku między kolonizacją gardła czy dróg oddechowych pacjentów przez pałeczki, a zakażeniem inwazyjnym. Wszyscy pacjenci mieli podwyższony poziom białka C-reaktywnego, u 7 stwierdzono granulocytopenię. Sześciu pacjentów wymagało hospitalizacji na OIOM, u 4 z nich konieczne było zastosowanie wentylacji mechanicznej. Czterech pacjentów zmarło (Zöllner *et al.* 2021). Prawdopodobnie inwazyjne zakażenie pałeczkami *S. maltophilia* było związane z ostrą białaczką i/lub przeszczepem komórek krwiotwórczych. Zakażenia te korelowały z zaburzonym funk-

cjonowaniem układu odpornościowego gospodarza, założonym dożylnie cewnikiem, leczeniem lekami o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym (karbapenemy, glikopeptydy, chinolony) i przyjęciem na oddział intensywnej opieki medycznej (Zöllner *et al.* 2021).

Gajdács i Urban (2020) analizując wykrywanie *S. maltophilia* z próbek klinicznych pacjentów wykazali ponad 2-krotny wzrost częstości izolacji tych pałeczek pomiędzy 5-letnimi okresami badania (263 przypadki w okresie 2008–2012 i 554 w 2013–2017). Materiał pobierano zarówno od pacjentów szpitalnych (m.in. OIOM; Oddział Chorób Wewnętrznych; Oddział Pediatrii; Oddział Onkologii; Oddział Neurologii) jak i pacjentów pozaszpitalnych. Do badań pobierano przede wszystkim krew, materiał z dróg oddechowych i mocz (Gajdács i Urban 2020). W ciągu całego okresu obserwacji wyizolowano 817 szczepów *S. maltophilia*, z największą częstotliwością izolacji w 2015 roku i najniższą w 2008. Najwięcej szczepów pochodziło z próbek pobranych z dróg oddechowych, najmniej z moczu. Większość szczepów pochodziła od pacjentów hospitalizowanych (694), najwięcej szczepów (334) wyizolowano od pacjentów hospitalizowanych na OIOM (Gajdács i Urban 2020). Autorzy podkreślają, że znaczenie kliniczne *S. maltophilia* wzrosło z powodu postępu w zakresie wykorzystywanych w medycynie inwazyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych, w przeszczepianiu narządów i stosowanego leczenia chemioterapeutycznego (Gajdács i Urban 2020).

4. Najważniejsze czynniki chorobotwórczości *Stenotrophomonas maltophilia*

Dla patogenności tych mikroorganizmów istotne są przede wszystkim zdolności adhezyjne, jak i wydzielane enzymy, umożliwiające zapoczątkowanie infekcji oraz jej rozprzestrzenianie (Tabela I). Adhezja *S. maltophilia*, związana głównie z obecnością adhezyn, rzęsek i fimbrii, umożliwia autoagregację, ale przede wszystkim kolonizację tkanek w organizmie gospodarza, a także wprowadzonych elementów obcych. Adhezja *S. maltophilia* istotna jest również na wczesnym etapie tworzenia struktur biofilmu (Zajac *et al.* 2014, Kalidasan *et al.* 2018, Szewczyk 2019, Mojica *et al.* 2022). Adhezyny niefimbrialne, zakotwiczone bezpośrednio w błonie zewnętrznej odpowiadają przede wszystkim za „bliski kontakt” komórki mikroorganizmu z powierzchnią abiotyczną czy z komórką gospodarza. Rzęski, wysoce immunogenne struktury, nadające cechę ruchu, również odgrywają rolę w przyleganiu bakterii do błon śluzowych gospodarza jak i powierzchni abiotycznych. Fimbrie typu 1 (SMF-1) biorą udział w hemaglutynacji, adhezji do komórek i w tworzeniu struktur biofilmu. Izolaty *S. maltophilia* pochodzące od pacjentów

Tabela I.

Rola wybranych czynników chorobotwórczości *S. maltophilia* (Bartoszek i Fleischer 2013, Zajac 2014, Kalidasan *et al.* 2018, Szewczyk 2019, Trifonova i Strateva 2019, Mojica *et al.* 2022, Fluit *et al.* 2022).

Czynnik	Rola w patogenności
Związane z komórką adhezyny niefimbrialne; rzęski; fimbrie; LPS; ruch; hydrofobowość	adhezja, autoagregacja, kolonizacja tkanek i elementów obcych, sprzyjają tworzeniu struktur biofilmu
Zewnątrzkomórkowe proteazy (StmPr1, StmPr2, StmPr3, StmPr4, elastaza, żelatynaza, fibrylizyna); nukleazy (deoksyrybonukleazy, rybonukleazy); hialuronidaza; esterazy, lipazy, fosfolipazy; heparynaza; hemolizyny; cytotosyny; siderofory	rozprzestrzenianie zakażenia
Biofilm	ochrona przed związkami przeciwdrobnoustrojowymi i mechanizmami odpornościowymi
Komunikacja	regulacja patogenności, wpływ na wydzielanie i aktywność czynników chorobotwórczości
Oporność synteza β -laktamaz; synteza enzymów modyfikujących; aktywne usuwanie leku z komórki	trudności w terapii zakażeń

z mukowiscydozą wykazywały obecność genu *smf-1*, kodującego wytwarzanie SMF-1, co może wskazywać na udział fimbrii *S. maltophilia* w kolonizacji dróg oddechowych u tych chorych. Szczepy środowiskowe nie wykazywały takiej cechy (Trifonova i Strateva 2019). Z wydzielanych enzymów zewnątrzkomórkowych należy wymienić: proteazy, lipazy, deoksyrybonukleazę, rybonukleazę, fibrylizynę, lecytynazę i esterazę. Działają one cytotoksycznie na komórki ustroju gospodarza i jak już zaznaczono wcześniej, umożliwiają rozprzestrzenianie zakażenia zwiększając inwazyjność pałeczek *S. maltophilia* (Kalidasan *et al.* 2018, Trifonova i Strateva 2019, Mojica *et al.* 2022). Proteazy przyczyniają się do niszczenia tkanki łącznej, przede wszystkim działając na fibronektynę i kolagen, mogą także rozkładać niektóre białka osocza oraz dezaktywować składniki układu odpornościowego w organizmie człowieka. Główna proteaza zewnątrzkomórkowa u *S. maltophilia*, alkaliczna proteaza serynowa StmPr1, kodowana jest przez gen *StmPr1* (Trifonova i Strateva 2019). W tworzenie biofilmu jak i w oporność na antybiotyki zaangażowany jest lipopolisacharyd tych mikroorganizmów (Kalidasan *et al.* 2018, Mojica *et al.* 2022). LPS składający się z lipidu A, oligosacharydu i polisacharydowego łańcucha O-swoistego uczestniczy w kolonizacji, ale także w oporności na bakteriobójcze działanie układu dopełniacza. Istotną rolę odgrywa tutaj gen *spgM*. Gen ten, kodując wytwarzanie enzymu o aktywności fosfoglukomutazy i fosfomannomutazy, wpływa na integralność struktury LPS-u i tym samym na zjadliwość pałeczek *S. maltophilia*. Zmutowane szczepy z nieaktywnym genem *spgM* nie są w stanie kolonizować płuc szczura i są bardziej wrażliwe na działanie układu dopełniacza (Trifonova i Strateva 2019). Cząsteczki sygnałowe (DSF – diffusible signal factor) umożliwiają porozumiewanie się pałeczek

S. maltophilia, regulują zdolność ruchu, wydzielanie enzymów zewnątrzkomórkowych, syntezę LPS-u, tworzenie mikrokolonii jak i tolerancję na antybiotyki i jony metali ciężkich (Zajac *et al.* 2014, Kalidasan *et al.* 2018, Mojica *et al.* 2022, Trifonova i Strateva 2019).

Tworzenie biofilmu jest ważnym czynnikiem patogenności *S. maltophilia*. Wykazano zdolność tworzenia biofilmu przez *S. maltophilia* zarówno na powierzchniach biotycznych jak i abiotycznych (np. teflon, szkło, polistyren), w monokulturze jak i z innymi gatunkami bakterii (Bartoszek i Fleischer 2013, Trifonova i Strateva 2019). Biofilm w istotny sposób wpływa na zmniejszenie wrażliwości tych drobnoustrojów na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i utrudnia ograniczone, ze względu na narastającą oporność, możliwości terapeutyczne tego rodzaju zakażeń (Zajac *et al.* 2014). Dodatkowo biofilm chroni komórki *S. maltophilia* przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza. Proces tworzenia biofilmu przez *S. maltophilia* jest oparty w głównej mierze na zjawisku *quorum sensing* czyli komunikacji między mikroorganizmami. U *S. maltophilia* komunikacja ta związana jest przede wszystkim z syntezą cząsteczek DSF, do których zaliczamy kwas cis-11-metylo-2-dodekenowy i jego pochodne (nasycone i nienasycone). System DSF jest regulowany przez zespół genów *rpf* (regulation of pathogenicity factors), z najistotniejszym z nich genem *rpfF*. Gen ten koduje syntezę DSF (Zajac *et al.* 2014). Jak wspomniano wcześniej system DSF reguluje w pewien sposób patogenność *S. maltophilia* wpływając na syntezę enzymów, LPS-u i zdolność do tworzenia struktur biofilmu. Porównując patogenność szczepu dzikiego *S. maltophilia* i szczepu z mutacją w genie *rpfF* wykazano zmniejszoną zjadliwość szczepu z mutacją. Między innymi wykazywał on zwiększoną wrażliwość na antybiotyki i jony metali ciężkich,

zmniejszoną ruchliwość, zmniejszoną zdolność do tworzenia mikrokolonii i tworzenia struktur biofilmu, a także znacznie niższą zdolność do wytwarzania i wydzielania proteaz (Zajac *et al.* 2014, Trifonova i Strateva 2019).

Warto podkreślić, że istotne w procesie tworzenia biofilmu są właściwości morfologiczne *S. maltophilia*, takie jak obecność fimbrii i rzęsek, a także zdolność ruchu i właściwości hydrofobowe powierzchni komórki (Zajac *et al.* 2014, Kalidasan *et al.* 2018, Mojica *et al.* 2022).

Bostanghadiri i wsp. (2019) przeprowadzając fenotypową i genotypową charakterystykę pałeczek *S. maltophilia* izolowanych w latach 2016–2017 wykazali, że ze 164 szczepów tylko 7 nie tworzyło biofilmu, pozostałe szczepy (157) tworzyły biofilm w stopniu słabym, średnim lub silnym. Najwięcej szczepów (67) tworzyło biofilm w stopniu średnim. U większości izolatów wykryto geny związane z tworzeniem biofilmu (*rpjF*, *rml* i *spgM*). Wszystkie szczepu posiadały gen *spgM* (Bostanghadiri *et al.* 2019).

Stenotrophomonas maltophilia jest naturalnie oporny na wiele antybiotyków. Należą do nich m.in. ceftazydym (często wrażliwość tylko *in vitro*) oraz karbapenemy, które powodują selekcję tego drobnoustroju w środowisku szpitalnym. Oporność *S. maltophilia* na antybiotyki β-laktamowe jest spowodowana przez syntezę β-laktamaz: L1 – metalo-β-laktamazy oraz L2 – β-laktamazy serynowej. Są one indukowane przez antybiotyki β-laktamowe i mogą rozkładać wszystkie β-laktamy. L1 hydrolizuje penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy, nie rozkłada aztreonamu. L2 hydrolizuje wszystkie β-laktamy, łącznie z aztreonamem (Avison *et al.* 2001, Dzierżanowska 2018, Mojica *et al.* 2022, IDSA 2022). Pozostałe mechanizmy oporności polegają na usuwaniu leku z komórki, co dotyczy tetracyklin oraz fluorochinolonów (Gordon i Wareham 2010). W przypadku aminoglikozydów oporność związana jest z syntezą enzymów modyfikujących (Okazaki i Avison 2007, Dzierżanowska 2018, IDSA 2022).

5. Leczenie zakażeń wywołanych przez *S. maltophilia*

W Europie EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) do oznaczania lekowrażliwości *S. maltophilia* zaproponował wartości graniczne wyłącznie dla trimetoprimu/sulfametoksazolu (TMP-SMX). Jest on jedynym lekiem, dla którego udowodniono korelację pomiędzy skutecznością kliniczną i wartościami granicznymi. Brakuje doniesień, które pozwoliłyby wyznaczyć wartości graniczne innych antybiotyków dla *S. maltophilia* (Stanowisko Zespołu Roboczego ds. oznaczenia lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST 2021, EUCAST 2022). Oporność na trimetoprim-sulfametoksazol rzadko

występuje u *S. maltophilia* i powinna zostać potwierdzona oznaczeniem wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) (EUCAST 2022).

W tabelach wartości granicznych zaproponowanych przez EUCAST dla *S. maltophilia* zawarto również informację odnośnie oznaczenia wrażliwości tego drobnoustroju na cefiderokol. Jest to sideroforowa cefalosporyna aktywna wobec tlenowych bakterii Gram-ujemnych, zatwierdzona do leczenia zakażeń u osób dorosłych wywołanych przez bakterie Gram-ujemne, w przypadku których opcje terapeutyczne są ograniczone. EUCAST określił wartości graniczne cefiderokolu dla pałeczek *Enerobacterales* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, zarówno dla metody dyfuzyjno-krażkowej, jak i ilościowej. Nie wyznaczono wartości granicznych dla *S. maltophilia*, mimo że cefiderokol wykazuje wyraźną aktywność, wobec tego drobnoustroju (EUCAST 2020, EUCAST 2022).

Polski Zespół Roboczy ds. oznaczania lekowrażliwości, zgodnie z wytycznymi EUCAST, zaleca oznaczanie wrażliwości *S. maltophilia* dodatkowo na: ceftazydym, lewofloksacynę, minocyklinę i chloramfenikol. Interpretację oznaczania wrażliwości na te dodatkowe środki przeciwdrobnoustrojowe należy wykonać zgodnie z rekomendacjami EUCAST z zastosowaniem wartości granicznych MIC niezwiązanych z określonym gatunkiem drobnoustrojów (preferowane) lub zgodnie z aktualnymi wartościami granicznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) dla metody dyfuzyjno-krażkowej i oznaczania MIC (Stanowisko Zespołu Roboczego ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST 2021).

W Stanach Zjednoczonych CLSI ustaliło kryteria interpretacji MIC dla 7 leków przeciwdrobnoustrojowych: trimetoprim-sulfametoksazol, tikarcylina – kwas klawulanowy, ceftazydym, cefiderokol, lewofloksacyna, minocyklina i chloramfenikol. Z powodu braku produkcji tikarcyliny z kwasem klawulanowym i ograniczonego stosowania chloramfenikolu z uwagi na toksyczność, pod uwagę bierze się 5 pozostałych leków (CLSI 2021, IDSA 2022). Niestety ograniczona powtarzalność oznaczeń wartości MIC dla ceftazydymu i lewofloksacyny oraz niewystarczające dane farmakokinetyczno-farmakodynamiczne stosowane do określania wartości granicznych dla większości wymienionych leków i korelacji pomiędzy MIC a wynikami klinicznymi powoduje, że kryteria interpretacji mogą być niedokładne (IDSA 2022, Khan *et al.* 2021).

CLSI nie ustaliło kryteriów wrażliwości dla polimyksyn (CLSI 2021). Przy wyznaczaniu wartości MIC kolistyny dla *S. maltophilia* dochodzi do niepełnego zahamowania wzrostu w studzienkach płytek mikrotitracyjnych, co sugeruje heterooporność. Istnieją także trudności w uzyskaniu zadowalającej dokładności i odtwarzalności uzyskanych wartości MIC dla polimyksyn

(Martinez-Servat *et al.* 2018). Zgodnie z najnowszymi wytycznymi IDSA (Infectious Diseases Society of America, USA) zaktualizowanymi w marcu 2022 roku kolistyna nie jest zalecana do leczenia zakażeń wywołanych przez *S. maltophilia* (IDSA 2022).

Lekiem z wyboru w zakażeniach wywołanych przez *Stenotrophomonas maltophilia* jest kotrimoksazol (trimetoprim/sulfametoksazol) (Dzierżanowska 2018, IDSA 2022, Mojica *et al.* 2022). Kotrimoksazol podawany jest w wysokich dawkach (między innymi z uwagi na bakteriostatyczne działanie tego leku), stanowi to jednak ograniczenie u pacjentów onkohematologicznych. Obserwuje się niestety coraz większą liczbę szczepów opornych na ten lek, obecnie jest to około 10 do 20% szczepów (Chang *et al.* 2015, Dzierżanowska 2018). Innymi lekami aktywnymi wobec *S. maltophilia* są nowe fluorochinolony, takie jak moksifloksacyna czy lewofloksacyna. Jednak mają one mniejszą aktywność w porównaniu z kotrimoksazolem (Grillon *et al.* 2016, Khan *et al.* 2021, Wang *et al.* 2014). Aktywne są także tetracykliny (minocyklina) czy tygecyklina (Farrell *et al.* 2010, Jacobson *et al.* 2016, Khan *et al.* 2021).

Według najnowszych wytycznych IDSA do łagodnych infekcji wywołanych przez *S. maltophilia* należy zastosować jeden ze wskazanych leków przeciwdrobnoustrojowych: trimetoprim/sulfametoksazol, minocyklinę, tygecyklinę, lewofloksacynę lub cefiderokol. Eksperti IDSA sugerują użycie trimetoprimu/sulfametoksazolu lub minocykliny, jako najbardziej preferowanych leków (IDSA 2022).

Z uwagi na naturalnie wytwarzane β -laktamazy przez *S. maltophilia* ceftazydym nie jest zalecany do leczenia zakażeń powodowanych przez ten drobnoustrój (Mojica *et al.* 2019, IDSA 2022).

Do leczenia zakażeń o umiarkowanym lub ciężkim przebiegu IDSA zaleca jedną z trzech opcji:

- 1) użycie terapii skojarzonej trimetoprimu/sulfametoksazolu z minocykliną (preferowane połączenie)
- 2) rozpoczęcie terapii od włączenia TMP-SMX, a następnie przy braku efektów klinicznych dołączenie drugiego leku: minocykliny (preferowana) lub tygecykliny, lewofloksacyny czy cefiderokolu
- 3) zastosowanie skojarzonej terapii – ceftazydym-awibaktam z aztreonamem – przy nietolerancji lub braku aktywności innych leków (IDSA 2022).

Wśród pochodnych tetracyklin preferowana jest minocyklina w stosunku do tygecykliny. Spowodowane to jest nieco korzystniejszymi danymi dotyczącymi działania tego antybiotyku *in vitro*, dostępnością wartości granicznych CLSI, możliwością podania doustnego oraz prawdopodobnie lepszą tolerancją tego leku przez pacjenta. Pomimo tego tygecyklina jest również jedną z opcji terapeutycznych (Jacobson *et al.* 2016, IDSA 2022).

W przypadku fluorochinolonów lekiem o uznanej aktywności wobec *S. maltophilia* jest lewofloksacyna,

która może być stosowana w monoterapii łagodnych zakażeń. Jednakże z powodu narastającej w trakcie terapii oporności na fluorochinolony IDSA zaleca ostrożność w podawaniu lewofloksacyny. Zalecenia wskazują na podawanie tego leku tylko jeżeli jest taka konieczność i w terapii skojarzonej, np. z trimetoprimem/sulfametoksazolem, do leczenia ciężkich zakażeń (Gibb i Wong 2021, IDSA 2022).

Sugerowana jest również możliwość zastosowania skojarzonego leczenia preparatem ceftazydymu z awibaktamem i aztreonamu w przypadku umiarkowanego lub ciężkiego zakażenia, gdy leczenie trimetoprimem/sulfametoksazolem i minocykliną nie jest możliwą opcją terapeutyczną (Coward i Ferguson 2021, Gibb i Wong 2021, IDSA 2022).

5.1. Nowe opcje terapeutyczne

Leczenie ciężkich zakażeń wywołanych przez wielolekooporne pałeczki *Stenotrophomonas maltophilia* stanowi ogromne wyzwanie dla klinicystów, dlatego poszukuje się nowych sposobów leczenia tych zakażeń (Gibb i Wong 2021).

Wśród nowych antybiotyków β -laktamowych wprowadzonych do lecznictwa w ciągu ostatnich kilku lat jedynie preparat ceftazydymu z awibaktamem ma zdolność hamowania β -laktamaz wytwarzanych przez *S. maltophilia*, co daje możliwość zastosowania w leczeniu umiarkowanych lub ciężkich zakażeń (Moriceau *et al.* 2020). Zgodnie z wytycznymi IDSA powinien zostać podany w połączeniu z aztreonamem (IDSA 2022). Pozostałe preparaty, takie jak meropenem-waborbaktam czy imipenem-relebaktam nie wykazują aktywności wobec *S. maltophilia* (Zhanel *et al.* 2018). W badaniu Forrester *et al.* wykazano, że ponad 80% szczepów *S. maltophilia* była wrażliwa na ceftolozan/tazobaktam (Forrester *et al.* 2018). Wśród antybiotyków o nowym mechanizmie działania obiecującą rolę w zakażeniach wywołanych przez *S. maltophilia* wykazuje cefiderokol. Jest to cefalosporyna podobna np. do cefepimu, ale wykorzystująca siderofor, czyli nośnik żelaza, żeby dostać się do wnętrza bakterii. Jest to preparat stabilny wobec β -laktamaz serynowych i metalo- β -laktamaz wytwarzanych przez pałeczki MDR (MDR – multidrug-resistant) (Simner i Patel 2020).

Ogromne nadzieje wiąże się również z preparatem aztreonam-awibaktam, z uwagi na potencjalną zdolność blokowania chromosomalnych β -laktamaz L1 i L2. Awibaktam ma za zadanie zahamować β -laktamazę serynową L2, aby umożliwić aztreonamowi ominięcie metalo- β -laktamazy L1 i osiągnięcie efektu bakterio-bójczego. Obecnie preparat ten nie jest powszechnie dostępny, więc w terapii ratunkowej stosuje się połączenie ceftazydym-awibaktam i dodaje aztreonam (Gibb i Wong 2021).

Plazomycyna, nowy antybiotyk aminoglikozydowy, wykazuje znikomą aktywność wobec *S. maltophilia* (Walkty *et al.* 2014).

Wśród tetracyklin prowadzi się badania nad aktywnością erawacykliny wobec pałeczek *S. maltophilia*. Antybiotyk ten jest coraz częściej podawany w zakażeniach wielolekoopornymi pałeczkami Gram-ujemnymi. Wykazano, że ma on 2–4 razy niższe wartości MIC₉₀ w porównaniu do tygecykliny. Wartości MIC erawacykliny są zbliżone do wartości MIC minocykliny dla *S. maltophilia* (Morrissey *et al.* 2020).

Badania nad nowoczesnymi terapiami do leczenia zakażeń o etiologii *S. maltophilia* obejmują również ocenę aktywności peptydów czy fagów, wobec tego drobnoustroju. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP – Antimicrobial peptides) są związkami wytwarzanymi naturalnie przez wiele organizmów, jako element układu odpornościowego. Mogą być również produkowane syntetycznie. W porównaniu do tradycyjnych antybiotyków działają poprzez inne mechanizmy na drobnoustroje, co pozwala stosować je wobec szczepów wielolekoopornych (Gibb i Wong 2021, Huan *et al.* 2020). Wykazano aktywność zarówno naturalnych, jak i syntetycznych peptydów wobec szczepów *S. maltophilia* (Huertas Méndez *et al.* 2017, Pompilio *et al.* 2012). Obiecujące wyniki dają również badania nad aktywnością fagów infekujących pałeczki *S. maltophilia* (Gibb i Wong 2021).

6. Podsumowanie

Częstotliwość zakażeń powodowanych przez *S. maltophilia* rośnie, zarówno wśród pacjentów z zaburzoną czynnością układu immunologicznego jak i immunokompetentnych (Belzer *et al.* 2022). Zakażenia te mogą dotyczyć zarówno dzieci, jak i osób dorosłych. Narastająca oporność *S. maltophilia* na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym powoduje, że terapia zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje jest trudna. Warto dodać, że szczepy *S. maltophilia* odporne na TMP-SMX znalazły się wśród dziesięciu priorytetowych klinicznie bakterii wielolekoopornych, stanowiących zagrożenie dla pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej opieki medycznej, wobec których istnieje szczególna konieczność poszukiwania nowych opcji terapeutycznych (Rello *et al.* 2019).

Piśmiennictwo

1. Araoka H., Yoneyama A.: Rapidly progressive fatal hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in hematologic malignancy. *Transpl Infect Dis.* **14**, 355–363 (2012)
2. Avison M.B., Higgins C.S., von Heldreich C.J., Walsh T.R.: Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2

- β-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 413–419 (2001)
3. Aydemir C., Aktas E., Eldes N., Kutsal E., Demirel F., Ege A.: Community-acquired infection due to *Stenotrophomonas maltophilia*: a rare cause of septic arthritis. *Turk J Pediatr.* **50**, 89–90 (2008)
4. Bartoszek D., Fleischer M.: Znaczenie kliniczne *Stenotrophomonas maltophilia*. *Forum zakażeń*, **4**, 165–171 (2013)
5. Belzer A., Weiss E., Etaee F., Bunick C.G., Damsky W., Nelson C.A.: *Stenotrophomonas maltophilia*, a Pathogen of Increasing Relevance to Dermatologists: A Case Report and Review of the Literature. *Antibiotics*, **11**, DOI:10.3390/antibiotics11101398 (2022)
6. Bin Abdulhak A.A., Zimmerman V., Al Beirouti B.T., Badour L.M., Tleyjeh I.M.: *Stenotrophomonas maltophilia* infections of intact skin: a systematic review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **63**, 330–333 (2009)
7. Bostanghadiri N., Ghalavand Z., Fallah E., Yadegar A., Ardebili A., Tarashi S., Pournajaf A., Mardaneh J., Shams S., Hashemi A.: Characterization of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated From Selected Hospitals in Iran. *Front Microbiol.* **10**, DOI:10.3389/fmicb.2019.01191 (2019)
8. Brooke J.S.: Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* **34**, DOI:10.1128/CMR.00030-19 (2021)
9. Brooke J.S.: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol Rev.* **25**, 2–41 (2012)
10. Chang Y.T., Lin C.Y., Chen Y.H., Hsueh P.R.: Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol.* **6**, DOI:10.3389/fmicb.2015.00893 (2015)
11. Chen S., Zou D.: Prognosis of hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia with *Stenotrophomonas maltophilia* versus *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit: A retrospective cohort study. *Clin Respir J.* **16**, 669–676 (2022)
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31 ed. Wayne, PA, 2021, https://clsi.org/media/z2uhcbmv/m100ed31_sample.pdf (14.03.2023)
13. Cowart MC, Ferguson CL.: Optimization of Aztreonam in Combination With Ceftazidime/Avibactam in a Cystic Fibrosis Patient With Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* Pneumonia Using Therapeutic Drug Monitoring: A Case Study. *Ther Drug Monit.* **43**, 146–149 (2021)
14. Duan Z., Qin J., Liu Y., Li C., Ying C.: Molecular epidemiology and risk factors of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a Chinese teaching hospital. *BMC Microbiol.* **20**, DOI:10.1186/s12866-020-01985-3 (2020)
15. Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna. α-medica press, Bielsko-Biała, 2018
16. Farrell D.J., Sader H.S., Jones R.N.: Antimicrobial susceptibilities of a worldwide collection of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates tested against tigecycline and agents commonly used for *S. maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**, 2735–2737 (2010)
17. Fluit, A.C., Bayjanov, J.R., Aguilar, M.D., Cantón R., Elborn S., Tunney M.M., Scharringa J., Benaissa-Trouw B.J., Ekkelenkamp M.B.: Taxonomic position, antibiotic resistance and virulence factor production by *Stenotrophomonas* isolates from patients with cystic fibrosis and other chronic respiratory infections. *BMC Microbiol.* **22**, DOI:10.1186/s12866-022-02466-5 (2022)

18. Forrester J.B., Steed L.L., Santevecchi B.A., Flume P., Palmer-Long G.E., Bosso J.A.: In Vitro Activity of Ceftriaxone/Tazobactam vs Nonfermenting, Gram-Negative Cystic Fibrosis Isolates. *Open Forum Infect Dis.* **5**, DOI:10.1093/ofid/ofy158 (2018)
19. Gajdacs M., Urbán E.: A 10-year single-center experience on *Stenotrophomonas maltophilia* resistotyping in Szeged, Hungary. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. **10**, 91–97 (2020)
20. Gajdacs M., Urban E.: Prevalence and antibiotic resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory track: a 10-year epidemiological snapshot. *Health Serv Res Manag Epidemiol.* **15**, DOI:10.1177/2333392819870774 (2019)
21. Gallagher T., Phan J., Oliver A., Chase A.B., England W.E., Wandro S., Hendrickson C., Riedel S.F., Whiteson K.: Cystic fibrosis-associated *Stenotrophomonas maltophilia* strain specific adaptations and responses to pH. *J Bacteriol.* **13**, DOI:10.1128/JB.00478-18 (2019)
22. Geller M., Nunes C.P., Oliveira L., Nigri R.: *S. maltophilia* pneumonia: a case report. *Respir Med Case Rep.* **24**, 44–45 (2018)
23. Gibb J., Wong D.W.: Antimicrobial Treatment Strategies for *Stenotrophomonas maltophilia*: A Focus on Novel Therapies. *Antibiotics*, **10**, DOI:10.3390/antibiotics10101226 (2021)
24. Gordon N.C., Wareham D.W.: Novel variants of the Smqnr family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* **65**, 483–489 (2010)
25. Granchelli A.M., Adler F.R., Keogh R.H., Kartsonaki C., Cox D.R., Liou T.G.: Microbial Interactions in the cystic fibrosis airway. *J Clin Microbiol.* **56**, DOI: 10.1128/JCM.00354-18 (2018)
26. Grillon A., Schramm F., Kleinberg M., Jehl F.: Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and Time-Kill Studies. *PLoS One*, **11**, DOI:10.1371/journal.pone.0156690 (2016)
27. Guerci P., Bougle A. i wsp. AZUREA research network.: Outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* hospital-acquired pneumonia in intensive care unit: a nationwide retrospective study. *Crit Care.* **23**. DOI: 10.1186/s13054-019-2649-5 (2019)
28. Healthcare-associated infections in intensive care units – Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control, 2019, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-1> (14.03.2023)
29. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H.: Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* **11**, DOI:10.3389/fmicb.2020.582779 (2020)
30. Huertas Méndez N.J., Vargas Casanova Y., Gómez Chimbi A.K., Hernández E., Leal Castro A.L., Melo Diaz J.M., Rivera Monroy Z.J., García Castañeda J.E.: Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*, **22**, DOI:10.3390/molecules22030452 (2017)
31. IDSA Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections: Version 2.0, 3/31/2022 <https://www.idsociety.org/news--publications-new/articles/2021/new-guidance-for-treating-antimicrobial-resistant-infections-released/> (14.03.2023)
32. Imoto W., Kakeya H. i wsp.: Clinical characteristics of rapidly progressive fatal hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Intern Med.* **59**, 193–198 (2020)
33. Insuwanon W., Kiratisin P., Jitmuang A.: *Stenotrophomonas maltophilia* Infections: Clinical Characteristics and Factors Associated with Mortality of Hospitalized Patients. *Infect. Drug Resist.* **13**, 1559–1566 (2020)
34. Jacobson S., Junco Noa L., Wallace M.R., Bowman M.C.: Clinical outcomes using minocycline for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Antimicrob Chemother.* **71**, 3620–3622 (2016)
35. Jiang Z., Ren Y., Zhang C., Yin Y., Li C.: Community-Acquired *Stenotrophomonas Maltophilia* Infection in a Child: A Case Report and Literature Review. *Infect Drug Resist.* **15**, 5469–5474 (2022)
36. Kalidasan V., Joseph N., Kumar S., Awang Hamat R., Neela V.K.: Iron and Virulence in *Stenotrophomonas Maltophilia*: All We Know So Far. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* DOI:10.3389/fcimb.2018.00401 (2018)
37. Kanchanasuwan S., Rongmuang J., Siripaitoon P.; Kositpantawong N., Charoenmak B., Hortiwakul T., Nwabor O.F., Chusri S.: Clinical Characteristics, Outcomes, and Risk Factors for Mortality in Patients with *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia. *J. Clin. Med.* **11**, DOI:10.3390/jcm11113085 (2022)
38. Khan A., Pettaway C., Dien B.J., Arias C.A., Bhatti M.M., Humphries R.M.: Evaluation of the Performance of Manual Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Disk Breakpoints for *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **65**, DOI:10.1128/AAC.02631-20 (2021)
39. Kim E.J., Kim Y.C., Ahn J.Y., Jeong S.J., Ku N.S., Choi J.Y., Yeom J., Song Y.G.: Risk factors for mortality in patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia and clinical impact of quinolone-resistant strains. *BMC Infect Dis.* **19**, DOI:10.1186/s12879-019-4394-4 (2019)
40. Mahdi O., Eklund B., Fisher N.: Laboratory culture and maintenance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Curr. Protoc. Microbiol.* DOI:10.1002/9780471729259.mc06f01s32 (2014)
41. Martinez-Servat S., Yero D., Huedo P., Marquez R., Molina G., Daura X., Gibert I.: Heterogeneous Colistin-Resistance Phenotypes Coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Influence Colistin Susceptibility Testing. *Front. Microbiol.* **9**, DOI:10.3389/fmicb.2018.02871 (2018)
42. Menetrey Q., Sorlin P., Jumas-Bilak E., Chiron R., Dupont C., Marchandin H. *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging pathogens well-armed for life in the cystic fibrosis patients' lung. *Genes*, **12**, DOI:10.3390/genes12050610 (2021)
43. Mojica M.F., Humphries R., Lipuma J.J., Mathers A.J., Rao G.G., Shelburne S.A., Fouts D.E., Van Duin D., Bonomo R.A.: Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: an update. *JAC Antimicrob. Resist.* DOI:10.1093/jacamr/dlac040 (2022)
44. Mojica M.F., Rutter J.D., Taracila M., Abriata L.A., Fouts D.E., Papp-Wallace K.M., Walsh T.J., LiPuma J.J., Vila A.J., Bonomo R.A.: Population Structure, Molecular Epidemiology, and beta-Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States. *mBio*, **10**, DOI:10.1128/mBio.00405-19 (2019)
45. Moriceau C., Eveillard M., Lemarié C., Chenouard R., Pailhoriès H., Kempf M.: *Stenotrophomonas maltophilia* susceptibility to ceftazidime-avibactam combination versus ceftazidime alone. *Méd. Mal. Infect.* **50**, 305–307 (2020)
46. Morrissey L., Olesky M., Hawser S., Lob S.H., Karlowsky J.A., Corey G.R., Bassetti M., Fyfe C.: In Vitro activity of eravacycline against gram-negative bacilli isolated in clinical laboratories worldwide from 2013 to 2017. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, DOI:10.1128/AAC.01699-19 (2020)
47. Okazaki A., Avison M.B.: Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**, 359–360 (2007)
48. Osawa K., Shigemura K., Kitagawa K., Tokimatsu I., Fujisawa M.: Risk factors for death from *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Infect Chemother.* **24**, 632–636 (2018)

49. Pompilio A., Di Bonaventura G. i wsp.: Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: Antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed – helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC Microbiol.* **12**, DOI:10.1186/1471-2180-12-145 (2012)
50. Rello J., Kalwaje E.V., Lagunes L., Alves J., Wunderink R.G., Conway-Morris A., Rojas J.N., Alp E., Zhang Z.: A global priority list of the TOp TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **38**, 319–323 (2019)
51. Said M.S., Tirthani E., Lesho E.: *Stenotrophomonas maltophilia*. StatPearls, Treasure Island, Floryda, StatPearls, 2022
52. Simner P.J., Patel R.: Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing considerations: The Achilles' Heel of the Trojan Horse? *J. Clin. Microbiol.* **59**, DOI:10.1128/JCM.00951-20 (2020)
53. Stanowisko Zespołu Roboczego ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST w sprawie najczęściej zgłaszanych pytań dotyczących stosowania rekomendacji EUCAST, wersja 5.0, 15 grudnia 2021 https://korld.nil.gov.pl/wp-content/uploads/2022/03/Stanowisko-Zespołu-Roboczego-wersja-5_0-2021.pdf (14.03.2023)
54. Szewczyk M.E.: Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2019
55. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, Guidance document on broth microdilution testing of cefiderocol, December 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_201217.pdf (14.03.2023)
56. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing „Clinical breakpoints – breakpoints and guidance”, January 1, 2022, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf (14.03.2023)
57. Trifonova A., Strateva T.: *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors, *Infectious Diseases*, **51**, 168–178 (2019)
58. Trignano E., Manzo M.J., Fallico N., Maffei M., Marongiu F., Campus G.V., Rubino C.: First report of digital skin ulcer with *Stenotrophomonas maltophilia* infection in an immunocompetent patients. *In Vivo*, **28**, 259–261 (2014)
59. Umar Z., Ashfaq S., Parikh A., Ilyas U., Foster A., Bhangal R., Khan J., Nassar M.: *Stenotrophomonas maltophilia* and urinary tract infections: a systematic review. *Cureus*. **14**, DOI: 0.7759/cureus.26184 (2022)
60. Walkty A., Adam H., Baxter M., Denisuik A., Lagacé-Wiens P., Karlowsky J.A., Hoban D.J., Zhanel G.G.: In Vitro activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011–2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2554–2563 (2014)
61. Wang N., Tang C., Wang L.: Risk Factors for Acquired *Stenotrophomonas maltophilia* Pneumonia in Intensive Care Unit: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Med.* **8**, DOI:10.3389/fmed.2021.808391 (2022)
62. Wang Y.L., Scipione M.R., Dubrovskaya Y., Papadopoulos J.: Monotherapy with fluoroquinolone or trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**, 176–182 (2014)
63. Zając O., Laudy A.E., Tyski S.: Biofilm, pompy MDR i inne mechanizmy oporności *Stenotrophomonas maltophilia* na związki przeciwdrobnoustrojowe. *Post. Mikrobiol.* **53**, 264–276 (2014)
64. Zając O.M., Tyski S., Laudy A.E.: Phenotypic and Molecular Characteristics of the MDR Efflux Pump Gene-Carrying *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated in Warsaw, Poland. *Biology*, **11**, DOI:10.3390/biology11010105 (2022)
65. Zhanel G.G., Karlowsky J.A. i wsp.: Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: Two novel carbapenem-_-lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, **78**, 65–98 (2018)
66. Zhu L., Ye X. i wsp.: Fatal hemorrhagic pneumonia in patients with hematologic diseases and *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* **21**, DOI:10.1186/s12879-021-06420-0 (2021)
67. Zöllner S.K., Kampmeier S., Froböse N.J., Herbrüggen H., Masjosthusmann K., van den Heuvel A., Reicherts C., Ranft A., Groll A.H.: *Stenotrophomonas maltophilia* Infections in Pediatric Patients – Experience at a European Center for Pediatric Hematology and Oncology. *Front Oncol.* **11**, DOI:10.3389/fonc.2021.752037 (2021)

MICROBIAL BIOSURFACTANT SCREENING: DIVERSITY IN ASSESSMENT METHODS

Rafeya Sohail^{1*}, Nazia Jamil¹

¹Institute of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Punjab, Lahore 54590, Pakistan

Submitted in September 2022, accepted in January 2023

Abstract: Biosurfactants are a group of surface-active agents mainly produced by microorganisms and have a wide range of applications in industries as well as agriculture. Global usage of such biologically active compounds as detergents, bioremediation agents, cosmetic products is hugely dependent on their high production. New avenues of research have opened up due to this increased interest, most of which are focused on identifying specialized microorganisms capable of biosurfactant production. Screening methods for selection of biosurfactant producing bacteria are, therefore, of utmost importance in this endeavor. The aim of this review was to discuss various conventional and novel methods that can overcome the hurdles encountered in time effective, economical microbial biosurfactant screening. This review lists several important biosurfactant screening methods based on supernatant, biomass as well as culture media. New methods devised for biosurfactant screening in the last half decade such as surfactant dependent dye solubilization, metagenomic studies etc. are also explained in detail. A thorough grasp of both contemporary and anachronistic screening methodologies will not only lead to discoveries of novel native strains capable of biosurfactant production but also form the basis on which new screening methods can be devised.

1. Introduction. 2. Biosurfactant Screening Methods. 2.1. Supernatant based screening methods. 2.2. Colony/Biomass based screening methods. 2.3. Screening methods on the basis of incubation media. 2.4. Metagenomic screening methods. 2.5. Imaging and spectroscopic techniques used for biosurfactant screening. 3. Conclusion. 4. References

Keywords: biosurfactant, screening, supernatant, biomass, PCR

1. Introduction

Surface active metabolites such as biosurfactants are generally produced extracellularly since these molecules possess variable amphiphilic structures that reduce surface and interfacial tension (Twiggs *et al.* 2021). These amphiphilic structures act with diverse polarities since they are comprised of different hydrophilic and hydrophobic moieties, that classify biosurfactants based on structure and function. The hydrophobic moieties of these amphiphilic structures are derived from fatty acid or their derivatives while the hydrophilic moieties are derived from peptides, carbohydrates, alcohols, carboxylic acids, carbohydrates, amino acids or phosphate (Eldin *et al.* 2019). Bacterial biosurfactants have remarkable emulsification and surface properties making them particularly significant in various environmental applications. The reduced toxicity and biodegradability of bacterial biosurfactants makes them even more advantageous over synthetic surfactants

(Purwasena *et al.* 2019). Such surface-active compounds produced by microorganisms also have the ability to form stable emulsions. This strong emulsification of hydrophobic compounds enhances their bioavailability especially in case of bioremediation (Nayariseri *et al.* 2018). The applications of biosurfactant are wide and varied in the fields of medicine, industry as well as environment (Tayeb *et al.* 2022). Due to the non-toxicity of biosurfactant, these are highly specific compared to their synthetic counterparts. In cellular systems, biosurfactants are used in desorption, flocculation, aggregation, adhesion or dispersion etc. They are highly useful in bioremediation of heavy metal, forming stable emulsions as well as reducing surface tension (Eldin *et al.* 2019). The interest biosurfactants have garnered in numerous fields owing to their applications is only made possible if large scale production of biosurfactants can be achieved economically. Highest hurdle in such cases is the cost and time effective screening of biosurfactant producers. In this review, various conventional

* Corresponding Author: Rafeya Sohail, ¹Institute of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Punjab, Lahore 54590, Pakistan, rafeyasohail@gmail.com

© 2023 Rafeya Sohail, Nazia Jamil

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Microbial biosurfactant screening: diversity in assessment methods. Rafeya Sohail and Nazia Jamil, ADV MICROBIOL-NY, 2023, 62, 3/4, 13
<https://doi.org/10.2478/am-2023-0013>

and novel biosurfactant screening methodologies have been discussed in detail. Parameters such as use of supernatant, biomass, media, metagenome, imaging and spectroscopic techniques have been used for classification of screening methodologies.

2. Biosurfactant screening methods

Effective screening of biosurfactant producing bacteria is based on well-chosen experimental design, efficient analytical and assessment methods. Physical and chemical properties can be used to devise screening methodologies specifically for biosurfactant producing bacteria. Surface tension, emulsification, hydrocarbon adherence etc. are all properties whose application can be extrapolated in formulation of biosurfactant screening methods (Koim-Puchowska *et al.* 2019). Thus far, numerous methods have been developed for this purpose such as oil displacement, drop collapse, surface tension measurement, hydrocarbon adherence, emulsification assay etc.

Furthermore, there are various methods to screen for biosurfactant producing bacteria according to their selective physiological as well as physicochemical properties. For example, physicochemical properties such as salinity, temperature and pH etc. greatly effect biosurfactant activities (Purwasena *et al.* 2019). Biosurfactants are accumulated between fluid phases either on microbial cell surfaces or extracellularly. Factors such as pH, temperature, operation mode and agitation are used for quantification as well as identification of biosurfactant quality (Nayarisseri *et al.* 2018).

Most commonly, biosurfactant production ability of bacterial species is evaluated by detecting their presence or absence in supernatant. The effect of biosurfactants – present in supernatant – is studied in such screening methods particularly on surface tension. Some of these biosurfactant screening methods include emulsion test, parafilm-M test, surface tension test etc. The glycolipid nature of biosurfactants can be detected by using either the CTAB methylene blue test in culture for anionic biosurfactants such as rhamnolipids or by phenol sulfuric test in supernatant. The lipolytic activity of biosurfactants can also be detected using tests as Tween 80 substrate test and Phenol red test. Thus, based on the type of methodology used, biosurfactant screening can be supernatant based, biomass (bacterial cell pellet) based, as well as culture based. Some advanced techniques have also been devised for biosurfactant screening in bacterial samples. In screening for potential biosurfactant producers, it is imperative that more than one screening method be used for accurate identification of biosurfactant producing bacterial strains. Due to the limitations of various test methods,

an apparent and strong correlation between results confirms the potency of effective biosurfactant production (Eldin *et al.* 2019). Most commonly used screening methods are discussed below (Table I).

2.1. Supernatant based screening methods

Among the wide array of tests used to screen the ability of a bacterial strain for biosurfactant production, most are based on supernatant. Since, biosurfactants are extracellular, their presence or absence in the supernatant can vouch for bacteria's ability to produce biosurfactants. These supernatant-based screening techniques can in turn be based on physical as well as chemical parameters (Fig. 1).

2.1.1. Physical parameters as basis for biosurfactant screening

2.1.1.1. Emulsification index test

Emulsification activity is measured in terms of emulsification index (E24%). Emulsification index is generally based on the ability of biosurfactant to emulsify hydrocarbons, thus, making them more accessible for uptake by the cell. If biosurfactants are present in a sample, they will emulsify the hydrocarbons and form emulsions. Whereas no emulsion will be formed in the absence of biosurfactants (Guerra *et al.* 2018). In this test, a droplet of oil is added to supernatant in a screw cap test tube. This test tube is vortexed at high speed and then allowed to stand in an incubator for 24 hours at 37°C (Eldin *et al.* 2019). The emulsification index is calculated by measuring total height of liquid column and the height of emulsified layer using the formula:

$$E24\% = \left(\frac{\text{Emulsified layer height}}{\text{Total liquid column height}} \right) \times 100$$

It should be noted that the emulsification activity of biosurfactant is not correlated with surface tension reduction and is only the indicative of biosurfactant presence (Devi *et al.* 2020).

2.1.1.2. Surface tension test

Reduction of surface tension at water and air interface while reduction of interfacial tension at water and oil interface is an ability specifying biosurfactant presence. Such surface-active properties are the result of amphiphilic moieties of biosurfactant and favor aggregation by formation of amphipathic micelles. Surfactant concentration that is needed for micelle formation is known as critical micellization concentration (CMC) and corresponds to the maximum surface tension reduction achieved by the minimum biosurfactant concentration. Efficiency of surfactant as well as its effectivity in terms of surface and interfacial tension measurement

Table I.
Biosurfactant screening methods: advantages and disadvantages

Screening methods	Advantages	Disadvantages	References
Emulsification Index	<ul style="list-style-type: none"> • Simple to use • Gives indication of biosurfactant presence 	<ul style="list-style-type: none"> • Low stability of emulsion • Surface activity and emulsification capacity do not always correlate 	(5, 7)
Surface tension test	<ul style="list-style-type: none"> • Precise • Simple • Reliable 	<ul style="list-style-type: none"> • Concurrent measurements present difficulties • Variation prone 	(15)
Oil displacement/ Oil spreading test	<ul style="list-style-type: none"> • High precision • Small sample volume • Low quantity of biosurfactant detected • No need for specialized equipment • Rapid 	<ul style="list-style-type: none"> • Amount of oil used influences detection 	(22)
Drop collapse assay	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Rapid • No need for specialized equipment • Small sample volume 	<ul style="list-style-type: none"> • Low sensitivity 	(9, 17)
Penetration assay	<ul style="list-style-type: none"> • Used for screening large number of samples 	<ul style="list-style-type: none"> • Qualitative 	(29)
Optical distortion grid assay	<ul style="list-style-type: none"> • Easy • Rapid • Sensitive • Small sample volume • Suitable for automated high throughput screening 	<ul style="list-style-type: none"> • Rough • Only qualitative 	(29)
BATH assay	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Inexpensive 	<ul style="list-style-type: none"> • Indirect • Only qualitative 	(14)
Tilted glass slide test	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Easy 	<ul style="list-style-type: none"> • Preliminary • If negligible amount of surfactant is present, false results are given 	(27)
Hydrocarbon overlay agar test	<ul style="list-style-type: none"> • Direct • Efficient 	<ul style="list-style-type: none"> • Cannot be used if microbe does not degrade hydrocarbons 	(30)
Atomized oil assay	<ul style="list-style-type: none"> • Surface enhanced biosurfactant production is shown 	<ul style="list-style-type: none"> • Many strains only produce biosurfactant in liquid media 	(11)
Blood hemolysis test	<ul style="list-style-type: none"> • Preliminary screening method • Also predicts surface activity of producer 	<ul style="list-style-type: none"> • Dubious results (lytic enzymes can also cause hemolysis) • Hydrophobic substrates cannot be used as sole carbon source • Diffusion restriction can inhibit zone formation 	(22)
Blue agar plate test	<ul style="list-style-type: none"> • Semi-quantitative • Allows various culture conditions 	<ul style="list-style-type: none"> • Specific for anionic biosurfactants • Inhibits growth of some microbes 	(7, 11)

are indicated by CMC value (Koim-Puchowska *et al.* 2019). Surface tension measurement can be done by various methods such as capillary rise method etc. In capillary rise method, supernatant is transferred to glass tubes and immersed in a water bath. Standardized capillary tube is immersed in each glass tube and the height reached by supernatant is calculated as an action of free ascending force to calculate surface tension. The equation; $\gamma = r \times h \times d \times g^2$ can be used to calculate surface tension, where surface tension (mNm^{-1}) is denoted by γ , capillary radius (cm) by r , height of the liquid column (cm) by h , density (g/ml) by d and gravity by g (Eldin *et al.* 2019). Tensiometers can be also used to determine surface tension of cell free culture broth using various different methods such as Du Nouy Ring method (Nayariseri *et al.* 2018).

2.1.1.3. Parafilm-M test

Parafilm-M test is based on the principle that biosurfactant can destabilize a drop of polar liquid by reducing the surface tension and the interfacial tension present between the drop and hydrophobic surface of the parafilm strip. This reduction in surface and interfacial tension leads to flattening of the drop. The absence of biosurfactant results in maintenance of drop shape, since no change in either surface or interfacial tension takes place (Eldin *et al.* 2019). Supernatant is dropped on a strip of parafilm at room temperature. Drop is allowed to rest for one minute and then shape and diameter of the drop are evaluated. A flat drop confirms the presence of biosurfactant. A scoring system ranging from partial to complete spreading of drop on the parafilm surface corresponds from + to +++++ (El-Shahed *et al.* 2020).

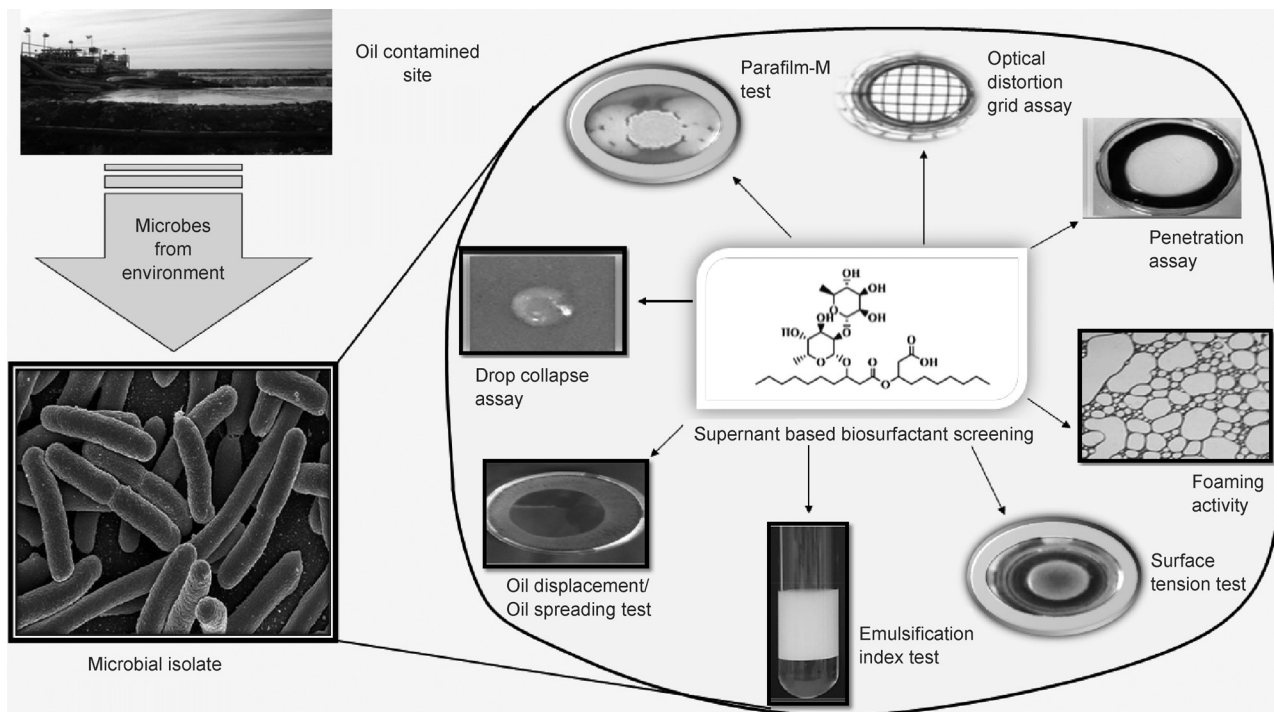


Fig. 1. Supernatant based biosurfactant screening methods.
(Figure depicts the isolation of microbes from environment and screening for biosurfactant)

2.1.1.4. Oil displacement/Oil spreading test

Oil displacement test is based on the principle that effectiveness of biosurfactant activity shows positive linear relation to the amount of surfactant present in the sample (Eldin *et al.* 2019). Biosurfactant, if present in the supernatant, has the ability to display oil and create an oil free clearing zone (Nayarisseri *et al.* 2018). Oil displacement test distilled water is taken in a Petri dish and oil is dispensed onto the surface of distilled water. The oil forms a thin film on the center of which supernatant is dispensed. If biosurfactant is present in the supernatant it results in displacement of oil and creates an oil free zone due to reduction of surface and interfacial tension. The diameter of oil free zone is compared to the zones created in positive and negative controls. The oil displacement is calculated in cm^2 and expressed as biosurfactant activity unit. Biosurfactant activity unit is defined as the surfactant amount that creates oil displaced area of 1 centimeter square. This method is suitable only for qualitative testing during primary screening of biosurfactant producers (Pardhi *et al.* 2020).

2.1.1.5. Drop collapse assay

The ability of biosurfactant to modify shape, based on the principle of reduced surface and interfacial tension, according to its surroundings is employed for drop collapse tests. Biosurfactants reduce the interfacial tension between drop and hydrophobic surface and thus the drop collapses (Ghasemi *et al.* 2019). This method,

being highly specific, is reliable for the detection of large unknown consortia, however low levels of surfactant cannot be detected due to low sensitivity. Furthermore, false positives can be shown due to hydrophobicity of bacterial cells, in which case bacterial cells themselves mimic biosurfactant behavior. Oil is applied to the wells of a 96-well microplates and left to rest for 24 hours in order to reach equilibration. A single drop of 48-hour culture free broth is transferred to each well. If biosurfactant is present in the media, drop collapses and bacterial culture giving flat drop is considered to be positive for biosurfactant produced. While, if the drop maintains its shape and a round shaped drop is observed, those cultures are considered as negative for biosurfactant production (Nayarisseri *et al.* 2018). For quantification of the test, drop diameter can be measured and is larger for experimental group compared to control group in case of positive test results. Software such as Image J can be used for the measurement of drop (Mishra *et al.* 2021).

2.1.1.6. Penetration assay

Penetration assay depends upon the hydrophobic and hydrophilic behaviors of biosurfactants i.e., in the presence of biosurfactants, a hydrophobic phase will be exited much quickly by silica gel. Silica gel will enter hydrophilic phase at a more rapid rate than in the absence of biosurfactants. In this test, a microtiter plate filled with hydrophobic paste (usually made of oil and silica gel) is covered with oil. Supernatant of culture

broth and uncultured media (mixed with 1% safranin added as indicator dye) are dispensed at the surface of oil covered wells. In the presence of biosurfactant, the color of upper phase turns white from the clear red of safranin after 10 to 15 minutes. However, biosurfactant free supernatant turns cloudy (since there is a modicum of silica gel transfer) but still remains red (Touseef and Ahmad 2018).

2.1.1.7. Foaming activity

Foam formation due to biosurfactant activity can be studied by shaking supernatant taken in test tube. In case of foam formation, biosurfactant presence in the supernatant is verified. Foaming activity can be quantitatively measured using the equation:

$$\text{Foaming} = \left(\frac{\text{height of foam}}{\text{total height of supernatant}} \right) \times 100$$

This activity also serves as indicator of surface tension reduction by biosurfactants (Bader *et al.* 2021).

2.1.1.8. Optical distortion grid assay

Pure water dispensed in a well has a flat surface which becomes concave in the presence of surfactant and causes wetting of the well edges. The fluid takes on the shape of single diverging lens causing image distortion in a grid when viewed from above. A microwell titer plate is used to study the optical distortion of biosurfactant containing supernatant. Black and white grids present on a backing sheet of paper are used for this purpose. Supernatant is placed in the wells and plate is viewed through the grid paper. Optical distortion, in the presence of biosurfactant serves a positive test result (Touseef and Ahmad 2018).

2.1.2. Chemical parameters as basis for biosurfactant screening

2.1.2.1. Phenol sulfuric test

Phenol sulfuric test is based on the action of sulfuric acid on carbohydrates to create monosaccharides by removing water molecules to form furfural compounds. These compounds condense with phenol to give a dark yellow color. Unfortunately, this method detects almost all classes of carbohydrates and not only glycolipid based biosurfactants. It is very difficult to distinguish biosurfactant glycolipids from other carbohydrates present in supernatant (Eldin *et al.* 2019). In the phenol sulfuric test, supernatant is added to the phenol solution and concentrated sulfuric acid is introduced drop by drop until a characteristic orange color develops. The mixture is shaken and left at room temperature in order to allow reaction when biosurfactant is present. The development of color indicates biosurfactant presence.

2.1.2.2. Bromothymol blue assay

Bromothymol blue assay can be used for high throughput detection of all three classes of biosurfactants specifically lipopeptide based biosurfactants. This quantitative assay is a colorimetric technique based on the principle that lipopeptide biosurfactant changes color in the presence of bromothymol blue that can be quantified as a linear response to concentrations at 410 nm and 616 nm spectrophotometrically. This test can be performed using either cell-free broth for biosurfactant screening or purified biosurfactant for quantitative assays. Such chemical tests for biosurfactant screening, however, have some limitations such as reagent preparation, use of toxic chemicals etc. (Ong and Wu 2018).

2.1.2.3. Methylene blue active substances (MBAS) assay

MBAS assay or methylene blue active substances assay is an analysis method that uses methylene blue for the detection of surfactant based on their anionic nature. It is a colorimetric analysis since the color saturation increases with the increase in concentration of anionic surfactants present in the sample. These anionic surfactants include phosphates, sulfonates, carboxylates as well as sulfates.

The basic principle of this method is the color reaction between methylene blue and the anionic surfactant. Since methylene blue is a cationic dye, an ion pair forms due to the reaction between cationic methylene blue and anionic surfactant resulting in color change. Firstly, a sample containing surfactants is acidified. A solution of methylene blue and chloroform are added and reagents are distributed throughout the aqueous and organic phases by agitating the biphasic solution. If an ion pair is created due to the presence of surfactant, it is extracted in the organic phase (Singh *et al.* 2021). Nonionic surfactants, on the other hand, can be detected using cobalt thiocyanate active substance assay (Muthukumaran 2022).

2.1.2.4. Surfactant dependent dye solubilization

Victoria Pure Blue BO (VPBO) dye can be used for screening of biosurfactants in culture supernatant. This method is a colorimetric assay used for detection of different anionic and non-ionic biosurfactants and quantification of biosurfactant concentration in a sample. This method is based on solubilization dependent on detergent presence or absence. If biosurfactant is present in the sample/supernatant, the immobilized dye is solubilized as a result of micelle formation and hence the specific absorption of VPBO increases. The amount of dye released as result of solubilization by biosurfactant reflects the amount of biosurfactant in a linear logarithmic trendline and can be used to obtain quantifiable data. Whereas if biosurfactant is

absent in the supernatant, VPBO solubilization does not take place and the overall specific absorption of VPBO remains the same. Microtiter plates containing Victoria pure blue BO dye coatings are obtained and supernatant is transferred to the assay plates. Plates are sealed with aluminum and incubated at 23°C for 1 hour with constant shaking at a speed of 750 rpm. Absorbance of solution before and after incubation is measured at 625 nm. Changes in VBPO absorption can be used for quantification of biosurfactant concentration in supernatant by calculating logarithmic trend-line equations from plots of standard biosurfactant. In contrast to less specific chemical reactions between reducing sugar and surfactants, this method depends on surface activity and enable quantification compared to current semi-quantitative colorimetric methods. One limitation observed is that the behavior of biosurfactant assembly to macrostructure changes in response to pH. Thus, when using this method for screening of biosurfactant, it is advised to work in a pH range that is suitable for solubilizing biosurfactant micelle formation (Kubicki *et al.* 2020).

2.2. Colony /Biomass based screening methods

2.2.1. Tilted glass slide test

Surface tension is decreased as an action of biosurfactant. In this method, a droplet of 0.9% NaCl is dispensed on the surface of glass slide and a single colony is transferred to the drop. Slides are placed in a tilted position. If surface tension decreases due to biosurfactant action, water flows over the surface whereby the test is considered positive and vice versa (Touseef and Ahmad 2018, Sohail and Jamil 2020).

2.2.2. BATH assay

Bacterial cells able to produce biosurfactant often exhibit cell hydrophobicity by adhering to hydrocarbon surface. Generally, the adhesion of bacterial cell to crude oil as well as cell surface hydrophobicity increases with time. There are, however, some factors such as temperature, pH, organic phases and ionic strength that can influence adhesion (Khanpour-Alikelayeh *et al.* 2020). In this test, culture pellet is made via centrifugation, washed twice and suspended in a buffer salt solution of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 (16.9 g/L and 7.3 g/L respectively). The pellet is diluted to an optical density of 0.5 at 610 nm, using the same buffer salt solution. Crude oil is added to the cell suspension and vortexed. The cell and crude oil mixture is allowed to rest for 1 hour in order to separate the aqueous and crude oil phases. Optical density of aqueous phase at 610 nm is measured and the percentage of cells that adhere to oil is calculated using the formula:

$$1\% \text{ of bacterial cell adherence} = \left[1 - \left(\frac{OD_{\text{shaken with oil}}}{OD_{\text{original}}} \right) \right] \times 100$$

where the $OD_{\text{shaken with oil}}$ is the optical density of the mixture containing cells and crude oil while the OD_{original} is the initial optical density of the cell suspension e.g., 0.5.

In some cases, bacterial strains give positive results for BATH test but if drop collapse test is performed, negative test results are observed. The ability some highly hydrophobic, bacterial cells to act as biosurfactants themselves influences these test results. Since no extracellular biosurfactant is produced, negative results are observed for drop collapse test. Further confirmation of bacterial cell adherence to hydrocarbon (BATH assay) can be made using a chemical technique i.e., by adding INT (iodophenyl nitrophenyl-phenyl tetrazolium-chloride) solution and observing under a light microscope. INT is an indicator that changes color when reduced. INT is taken up by bacterial cells and reduced in the presence of biosurfactant. In BATH assay, if bacterial cells actively adhere to the oil, INT is reduced inside the cells and turns red. This change in color observed under microscope also indicates the viability of bacterial cells under experimentation (Nayariseri *et al.* 2018).

2.3. Screening methods on the basis of incubation media

2.3.1. Hydrocarbon overlay agar (HOA) test

HOA test is used for the identification of hydrocarbon-elastic bacteria and gives a measure of bacteria's hydrocarbon degrading activity (Nayariseri *et al.* 2018). It has been suggested that many microorganisms such as bacteria produce biosurfactants in order to enhance the solubilization and emulsification of non-polar substrates such as hydrocarbons. Hydrocarbons are the sole source of carbon in a media and their emulsification by the action of biosurfactants facilitates the overall process of growth and maintenance (Trudgeon *et al.* 2020). This ability of biosurfactants is exploited in hydrocarbon overlay plate test by measuring the overall emulsification of hydrocarbon that is observed in form of emulsification halo zone around bacterial colonies (Eldin *et al.* 2019).

Hydrocarbon overlay agar (HOA) plate test is conducted using a minimal salt agar plate whose surface has been coated in oil and serves as indicator of tolerance against hydrocarbon (Touseef and Ahmad 2018). The bacterial culture in which presence of biosurfactant is suspected is cultured onto the surface of oil coated agar plate and incubated at 30°C for seven to 10 days. The growth of colonies is studied for the presence of emulsified halo zone around the colonies that is indicative of biosurfactant presence.

2.3.2. Atomized oil assay

Oil/ hydrocarbon is displaced by the activity of biosurfactant and bright zone or halos are created in the presence of biosurfactant. In this method, a droplet of oil or a mist of liquid paraffin is sprayed over bacterial culture plates in a fine spray. The formation of halos around bacterial colonies is indicative of biosurfactant production. Atomized oil assay is highly sensitive even for very low concentrations of biosurfactant, however is limitable only to microbes culturable on a solid medium (Touseef and Ahmad 2018).

2.3.3. Blood hemolysis test

Blood agar plate test is conducted to evaluate the hemolytic activity of surfactant. Blood agar media is inoculated with bacteria culture and incubated at 37°C for 48 to 72 hours. After incubation the formation of clear zone indicating hemolysis is observed (Pardhi *et al.* 2020). The hemolytic zones are categorized as white for incomplete hemolysis (α), greenish for complete hemolysis (β), and no change in color in case of no hemolysis (γ). Hemolytic activity of biosurfactant however well documented – as ideal method for detection of rhamnolipids and surfactins – has some limitations pictures such as formation of clear zones around bacterial colonies by action of other lytic enzymes, minimum to no support of hydrophobic substrates, and hindrance in biosurfactant production due to diffusion restriction which consequently leads to inhibition of clear zone formation. Since this particular method creates a lot of false negative or false positive results, hemolysis is not considered a reliable criterion for the detection of biosurfactant activity (Eldin *et al.* 2019).

2.3.4. Blue agar plate (BAP) test

Extracellular anionic biosurfactants can be detected by CTAB-methylene blue agar plate test. Biological surface-active compounds such as biosurfactants form insoluble ion pairs in the presence of cationic surfactant CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide). These ion pairs are indicated by formation of dark blue halos due to the action of methylene blue dye base in the media. This method, however only applicable in case of anionic biosurfactants, is ideal for the detection of extracellular glycolipids (Islam and Sarma 2021). A minimal salt agar media supplemented with glucose, CTAB and methylene blue is used in this test. Petri plates containing media are inoculated with bacterial culture and incubated at 37°C for 7 to 8 days. After incubation, plates are stored at 4°C to develop color for an additional 24 hours. Formation of halo zone with dark blue coloration around the bacterial colonies serves as indicative of biosur-

factant presence. The diameter of dark blue zone created around bacterial colonies, is usually considered as proportional to biosurfactant concentration, albeit semi-quantitatively. However, CTAB also forms complexes with polysaccharides. Hence, if polysaccharides are present in the supernatant, the reliability of this test is considered to be significantly minimized (Eldin *et al.* 2019).

2.3.5. Agar double diffusion test

Cell bound biosurfactant have a characteristic ionic behavior that can be used as a screening strategy. In the presence of two charge bearing compounds, of either the same or opposite types, precipitation lines are formed due to the action of biosurfactant. In this test, uniformly spaced wells are made in agar surface and filled with 24-hour culture of test strain in Nutrient broth media. On either side of wells anionic and cationic compounds are introduced. Generally, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) are used in this test, as anionic and cationic compounds respectively. Plates are incubated for 24 hours at 25°C. After incubation, presence or absence of precipitation lines is observed (Touseef and Ahmad 2018).

2.3.6. Tween 80 substrate test

Tween 80 induces lipase gene expression and thereby stimulates lipase secretion. It also serves as substrate for the enzymatic action of lipases and esterases. When lipases act on Tween 80 substrate, oleic fatty acids are released. Calcium ions present in the growth medium react with these fatty acids and transform them to calcium oleate that is water insoluble and appears in form of white precipitate (Eldin *et al.* 2019). For Tween 80 agar plate test, petri plates are inoculated with bacterial culture and incubated at 30°C for three to five days. Due to the action of lipolytic biosurfactant, the presence of white precipitate is detected in the medium is indicative of biosurfactant presence.

2.3.7. Phenol red test

Phenol red is a pH indicator dye that is used in order to detect pH changes in the occurring due to acidity. When extracellular lipases act on triglycerides, fatty acids are released. These fatty acids cause a change in the acidity of medium (Eldin *et al.* 2019). For lipase assay by phenol red agar plate test, the plates are inoculated with bacterial culture and supplemented with oil. Bacterial plates are incubated at 30°C for three to five days. After incubation formation of hydrolysis zone around the bacterial colonies as well change in color of phenol red to a bright yellow is indicative of biosurfactant presence.

2.3.8. Antifungal activity

Bacterial biosurfactants such as surfactin have the ability to inhibit fungal growth by various defensive mechanisms especially against cellular membranes. Since antifungal activity has been linked to strong biosurfactant production, it can be used to screen for the presence or absence of biosurfactant. Agar spot test can be used to determine antifungal activity of bacterial strain. In this test, fungal plug is inoculated in the center of bacterial culture plate and each bacterial strain is spotted at a distance from the fungus (approximately 2.5 cm). Growth inhibition of fungus is studied at day 7 of incubation at 25°C. Zone of inhibition are created around bacterial colonies that produce biosurfactant. Diameter of inhibition zones is measured in mm (Kaboré *et al.* 2018).

2.3.9. Antimicrobial and antiadhesive activity

Biosurfactants serve as therapeutic antimicrobial agents due to their potential for self-association and pore creation in cell membrane. Antimicrobial activity of biosurfactants against various microorganisms such as *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus cereus* can be determined by various tests such as agar well diffusion method etc. In case of agar well diffusion method, biosurfactant solution i.e., supernatant as well as liquid culture can be added to wells made in solid agar media plates and plates are incubated at 37°C. Antimicrobial activity of biosurfactant against microbial culture can be observed in form of clear inhibition zones around the wells (Ghasemi *et al.* 2019). Studies show that adsorption of biosurfactant against solid surfaces reduces microbial adhesion. This ability also aids in inhibition of pathogenic microbial colonization. Antiadhesive activity of biosurfactants against microbial strains therefore can be exploited as screening test for biosurfactant producing bacteria and serves as a reliable criterion.

2.4. Metagenomic screening methods

Metagenomics provide a bypass from traditional cultivation methods and make it efficient to handle diverse microbial populations. Metagenomic approaches have been devised by taxonomic and functional analysis using databases and computational tools such as NCBI BLAST (27), COG (clusters of orthologous groups of proteins), Biosurfactants and Biodegradation Database (BioSurfDB) (22), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), antiSMASH

(antibiotic and secondary metabolite analysis shell) etc. (Islam and Sarma 2021). Knowledge of microorganisms and genes involved in biosurfactant production, their identification and characterization help in determination of specific microbial diversity in a consortium. Collective microbial genome analysis aided by bioinformatics tools can be aimed at identification and screening of taxa as well as genes involved in biosurfactant production (Gaur *et al.* 2022). A few such approaches are listed as follows:

2.4.1. Genome sequencing of unknown consortia

The extraction of DNA from environmental pool aids in screening for biosurfactant producing genes. A stable isotope probe (SIP) can be used for effective and efficient discovery and identification of biosurfactant producing strains. Since biosurfactants have significance in hydrocarbon degradation, targeting the gene specific for polyaromatic hydrocarbon (PAHs) degradation can aid in screening for biosurfactant producers. Exploration of crude oil fields have led to the discovery of various key genera of hydrocarbon degrading bacteria, many of whom are biosurfactant producers (Gaur *et al.* 2022). Genomic DNA is obtained from microbial consortia and sequenced to obtain metagenomic data. Metagenomic data is analyzed using different computational analysis such as alignment, taxonomic hierarchy mapping and dendrogram drawing etc. in order to map out metabolic pathways specific for biosurfactant production. Bacterial strains in which such biosurfactant specific genomic sequences are identified are screened from the consortia (Guerra *et al.* 2018).

2.4.2. PCR detection of known biosurfactant genes

PCR detection of biosurfactant specific genes can also be done for screening of biosurfactant production bacteria. Many genes involved in biosurfactant biosynthetic pathways have been identified. Rhamnolipid biosurfactants are produced by *rhlAB* genes (Alyousif *et al.* 2020) while *surfA* operon containing *surfA*, *surfB* and *surfC* genes is responsible for production of surfactin biosurfactant. In case of hydrocarbon degradation, gene *alkB* mediates petroleum hydrocarbon degradation while *nah* gene mediates alkane and aromatic hydrocarbon degradation (Islam and Sarma 2021). Gene *sfp* has been reported to be involved in the biosynthetic pathway of surfactin, a lipopeptide antibiotic. Surfactin also aids in biofilm formation owing to its specific surface-active properties. Due to its detergent like action against biological membranes, as a defense mechanism, surfactin is considered to be a powerful biosurfactant (Kaboré *et al.* 2018).

2.4.3. Vector construction from metagenomic library

Metagenome libraries are being used in for vector construction derived biosurfactant screening. Such vectors – including but not limited to lipids and proteins – have proven efficient tools in diverse biosurfactant identification from non-cultivable microorganisms. Metagenome derived ornithine lipid identification has been proposed as a novel functional screening methodology for biosurfactants, in a recent study. A metagenomic library using environmental DNA from *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* and *Pseudomonas putida* shuttle vector was constructed. This library was used for sequence analysis to confirm ornithine acyl-ACP N-acyltransferase as being responsible for biosurfactant activity. Transposon mutagenesis was also explored. This vector was used to study and identify ornithine lipid in unknown microbial strains as indicative of biosurfactant activity. Use of multiple hosts, in case of biosurfactants, also increases substrate diversity during biosurfactant synthesis (Williams *et al.* 2019). Another study proposed the use of a protein having oil degradative activity, namely MBSP1, without substrate dependence. Additionally, MBSP1 transformed cells showed increased aliphatic hydrocarbon degradation (Araújo *et al.* 2020).

2.5. Imaging and spectroscopic techniques used for biosurfactant screening

The properties of biosurfactants are being explored in depth to devise innovative screening methodologies such as biofilm disruption assay, etc. Recent advancement in the field of biosurfactant screening are as follows.

2.5.1. Biofilm disruption detected by ERT

Microbial biofilms are surface associated complex aggregates of microbial cells in an extracellular matrix. These hydrophobic aggregates are highly resistant against antimicrobial agents and have high interfacial tension. Surface active molecules remove biofilms either by destroying the extracellular matrix or altering surface adhesion properties by emulsification, leading to overall decrease in interfacial tension. Due to their low toxicity, amphipathic biosurfactant molecules are preferred in biofilm removal as well as hydrocarbon and xenobiotic remediation (Bhadra *et al.* 2022). In recent studies, electrical resistance tomography (ERT) has been reported as a screening method by detection of biosurfactant mediated biofilm disruption. Sphorolipids and rhamnolipids have been reported to disrupt bacterial biofilms leading to their eventual removal. Electric resistance tomography can be used to detect either biofilm disruption or removal by action of biosurfactants. Biofilms are nonconductive and their electrical proper-

ties are governed by electrolyte diffusion and porosity of biofilm layer. Pre-formed biofilms with well-known electrical conductivities can be used to check the effect of biosurfactant presence or absence. ERT, a non-intrusive imaging technique, can be used to monitor the temporal and spatial resolution of biofilms. This tomographic technique also provides detection independent of biofilm growth location. In this method, the electrical conductivities of biofilms before and after biosurfactant aided disruption are measured. The deviation of control from experimental group can be represented as zonal boundary averages for biofilm removal in terms of conductivity values (De Rienzo *et al.* 2018).

2.5.2. Matrix assisted laser desorption/ time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)

Matrix assisted laser desorption/ time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) was used in a recent study for the screening of glycolipid biosurfactant producing bacteria. Crude extract of well-known biosurfactant producer initially used MALDI-TOF/MS and then environmental samples were screened using broth cultures. Results were compared to evaluate biosurfactant production. This method can be used reliably for the rapid screening of specific biosurfactant producing strains such as glycolipid type biosurfactant (Sato *et al.* 2019).

2.5.3. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS)

Biofouling results from an excessive buildup of microbes whose extracellular bioactive metabolites can clog purification membranes and reduce efficiency. At this air-water interface, microbial biosurfactants influence the water-membrane interface during bacterial adherence mechanisms. This biosurfactant production, as a result of quorum sensing, is strictly maintained at transcriptional level and allows rapid screening of biofilms at membrane surface. Thus, biosurfactants have a particular molecular signal, that can be detected in form of DESI-MS specific signatures, indicative of biofilm initiation. In *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm formation is mediated by rhamnolipids that forewarn the process of biofouling. Mass spectrometry specifically ambient ionization techniques can also be used for the detection of surfactant-metal complexes, in case of heavy metal toxicity (Jakka Ravindran *et al.* 2018).

2.5.4. Laser ablation electrospray ionization mass spectrometry

Laser ablation electrospray ionization mass spectrometry can be used for the study of biofilm production *in situ*. This biofilm production is accompanied

by the production of various competitive biological control factors within a chemically complex matrix. Such factors including biosurfactants mostly of lipopeptide classes e.g., fengycin and surfactin can be detected by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry as screening criteria for biosurfactants producers (Bacon *et al.* 2018).

3. Conclusion

Various concurrent methods and selection criteria of biosurfactant producers are discussed in this review. Specific methods like MBAS assay for anionic biosurfactants can be used for targeted microbial isolation. Expertise in imaging and spectroscopic techniques permits explorations of large populations. Metagenomic libraries are being employed for characterization of novel microbes and surface-active metabolites using techniques such as vector construction.

References

- Alyousif N.A., Al-Tamimi W.H., Al-Luaibi Y.Y.: Screening, enhance production and characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. *EurAsian Journal of BioSciences*, **14** (2), (2020)
- Araújo S.C.d.S., Silva-Portela R.C., de Lima D.C., da Fonseca M.M.B., Araújo W.J., da Silva U.B., Napp A.P., Pereira E., Vainstein M.H., Agnez-Lima L.F.: MBSP1: a biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation. *Sci Rep.* **10** (1), 1–13 (2020)
- Bacon C., Hinton D., Mitchell T.: Screening of *Bacillus mojavensis* biofilms and biosurfactants using laser ablation electrospray ionization mass spectroscopy. *J Appl Microbiol.* **125** (3), 867–875 (2018)
- Bader F.D., Almansoori A.F., Al-Tamimi W.H.: Screening potential of biosurfactant production from local bacterial isolates. *Marsh Bulletin*, **16** (2), (2021)
- Bhadra S., Chettri D., Kumar Verma A.: Biosurfactants: Secondary Metabolites Involved in the Process of Bioremediation and Biofilm Removal. *Appl Biochem Biotechnol.* 1–27 (2022)
- De Rienzo M.D., Hou R., Martin P.: Use of electrical resistance tomography (ERT) for the detection of biofilm disruption mediated by biosurfactants. *Food Bioprod Process.* **110**, 1–5 (2018)
- Devi S.P., Jha D.K.: Screening of Bacteria Isolated from Refinery Sludge of Assam for Hydrocarbonoclastic Activities. *Journal of Pure and Applied microbiology and biotechnology*, **14** (2), 1453–1465 (2020)
- El-Shahed M., Sadik M., Mabrouk M., Sedik M.: Isolation, refinement and screening of heavy metals tolerant biosurfactant-producers microorganisms from Egyptian soil. *Plant Archives*, **20**, 1831–1842 (2020)
- Eldin A.M., Kamel Z., Hossam N.: Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. *Microchem J.* **146**, 309–314 (2019)
- Gaur V.K., Sharma P., Gupta S., Varjani S., Srivastava J., Wong J.W., Ngo H.H.: Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: Strategies and advancements. *Environmental Technology and Innovation*, **25**, 102132 (2022)
- Ghasemi A., Moosavi-Nasab M., Setoodeh P., Mesbahi G., Yousefi G.: Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: strain screening followed by product characterization. *Sci Rep.* **9** (1), 1–12 (2019)
- Guerra A.B., Oliveira J.S., Silva-Portela R.C., Araújo W., Carlos A.C., Vasconcelos A.T.R., Freitas A.T., Domingos Y.S., de Farias M.F., Fernandes G.J.T.: Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environ Pollut.* **235**, 869–880 (2018)
- Islam N.F., Sarma H.: Metagenomics Approach for Selection of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Contaminated Soil: An Insight Into Its Technology. In: *Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine*, 2021, p. 43–58.
- Jakka Ravindran S., Kumar R., Srimany A., Philip L., Pradeep T.: Early detection of biofouling on water purification membranes by ambient ionization mass spectrometry imaging. *Anal Chem.* **90** (1), 988–997 (2018)
- Kaboré D., Gagnon M., Roy D., Sawadogo-Lingani H., Diawara B., LaPointe G.: Rapid screening of starter cultures for maari based on antifungal properties. *Microbiol Res.* **207**, 66–74 (2018)
- Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A., Kermanian H.: Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicol Environ Saf.* **205**, 111103 (2020)
- Koim-Puchowska B., Klosowski G., Mikulski D., Menka A.: Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds. *PLoS One*, **14** (11), e0225108 (2019)
- Kubicki S., Bator I., Jankowski S., Schipper K., Tiso T., Feldbrügge M., Blank L.M., Thies S., Jaeger K.-E.: A straightforward assay for screening and quantification of biosurfactants in microbial culture supernatants. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 958 (2020)
- Mishra N., Agsar D., Deepthi S.S., Kattagouda U.M., Shetty P.R., Pandey V.: Novel application of Nerium leaf and Image J software in drop collapse assay for rapid screening of biosurfactant producing microorganisms. *Indian J Exp Biol.* **59** (7), 484–492 (2021)
- Muthukumaran M.: Advances in bioremediation of nonaqueous phase liquid pollution in soil and water. In: *Biological Approaches to Controlling Pollutants*, Elsevier, 2022, p. 191–231.
- Nayarisseri A., Singh P., Singh S.K.: Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, **14**(6), 304 (2018)
- Oliveira J.S., Araujo W., Lopes Sales A.I., Brito Guerra A.d., Silva Araújo S.C.d., de Vasconcelos A.T.R., Agnez-Lima L.F., Freitas A.T.: BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. *Database*, **2015** (2015)
- Ong S.A., Wu J.C.: A simple method for rapid screening of biosurfactant-producing strains using bromothymol blue alone. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **16**, 121–125 (2018)
- Pardhi D., Panchal R., Rajput K.: Screening of biosurfactant producing bacteria and optimization of production conditions for *Pseudomonas guguanensis* D30. *Biosci Biotechnol Res Commun.* **13** (1), 170–179 (2020)
- Purwasena I.A., Astuti D.I., Syukron M., Amaniyah M., Sugai Y.: Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis*

- DS1 using experimental design and its application for MEOR. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **183**, 106383 (2019)
26. Sato S., Fukuoka T., Saika A., Koshiyama T., Morita T.: A new screening approach for glycolipid-type biosurfactant producers using MALDI-TOF/MS. *Journal of Oleo Science*, **68(12)**, 1287–1294 (2019)
 27. Sayers E.W., Beck J., Bolton E.E., Bourexis D., Brister J.R., Canese K., Comeau D.C., Funk K., Kim S., Klimke W.: Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* **49(D1)**, D10 (2021)
 28. Singh A., Chaturvedi K.R., Sharma T.: Natural surfactant for sustainable carbon utilization in cleaner production of fossil fuels: Extraction, characterization and application studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **9(5)**, 106231 (2021)
 29. Sohail R., Jamil N.: Isolation of biosurfactant producing bacteria from Potwar oil fields: Effect of non-fossil fuel based carbon sources. *Green Processing and Synthesis*, **9(1)**, 77–86 (2020)
 30. Tayeb A.M., Mostafa N., Olfat M., Farouq R., Monazie A.M.: Investigation of Biosurfactants Production from Petroleum Oil Wastes Using Response Surface Methodology. *Petroleum Chemistry*, 1–8 (2022)
 31. Touseef H., Ahmad K.A.: A combination of rapid and easy assays of biosurfactant producing bacterial strain isolated from automobiles repairing workshop in Aligarh. *Proceedings of VSUET*, **80(3(77))**, 153–1563 (2018)
 32. Trudgeon B., Dieser M., Balasubramanian N., Messmer M., Foreman C.M.: Low-temperature biosurfactants from polar microbes. *Microorganisms*, **8(8)**, 1183 (2020)
 33. Twigg M.S., Baccile N., Banat I.M., Déziel E., Marchant R., Roelants S., Van Bogaert I.N.: Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microb Biotechnol.* **14(1)**, 147–170 (2021)
 34. Williams W., Kunorozva L., Klaiber I., Henkel M., Pfannstiel J., Van Zyl L.J., Hausmann R., Burger A., Trindade M.: Novel metagenome-derived ornithine lipids identified by functional screening for biosurfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* **103(11)**, 4429–4441 (2019)

ROLA WYBRANYCH CZYNNIKÓW WIRULENCJI W ZAKAŻENIACH WYWOŁYWANYCH PRZEZ SZCZEPY *ENTEROCOCCUS* SPP.

Zuzanna Kraszewska, Iwona Skuczyńska, Tomasz Bogiel, Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

Wpłynęło w sierpniu 2022, zaakceptowano w sierpniu 2023

Streszczenie: Ziarenkowce z rodzaju *Enterococcus* spp. są składnikiem mikrobioty ludzi i zwierząt oraz powszechnie występują w środowisku naturalnym. Należą do patogenów warunkowo chorobotwórczych, mogących wywoływać zakażenia o różnej lokalizacji. Bakterie te rzadko wywołują zakażenia pozaszpitalne. Mimo, że do niedawna były uważane za drobnoustroje o niskim potencjale chorobotwórczym, stały się jednym z istotnych patogenów szpitalnych. Ich powszechne występowanie i zdolność do przeżycia w środowisku szpitalnym przyczyniają się do notowanej od kilku lat i nadal wzrastającej częstości ich izolacji, również z zakażeń inwazyjnych. Gatunki najczęściej izolowane z przypadków zakażeń to *E. faecalis* i *E. faecium*, stwarzające problemy terapeutyczne w związku z ich narastającą wielolekoopornością. Z powodu rosnącego znaczenia klinicznego, mechanizmów naturalnej i nabytej oporności na antybiotyki oraz potencjalnych czynników wirulencji, ziarenkowce z rodzaju *Enterococcus* stały się przedmiotem wielu badań. Celem pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej najistotniejszych czynników wirulencji mogących występować u bakterii z rodzaju *Enterococcus*, do których należą – antygen wydzielniczy SagA, białko EfaA, białko powierzchniowe Esp, białko wiążące kolagen Ace, cytolizyna, hialuronidaza, hemaglutynina, lipaza, proteaza serynowa, substancja agregująca, zewnątrzkomórkowe nadtlenki oraz żelatynaza.

1. Wstęp. 2. Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Enterococcus* spp. 3. Najważniejsze czynniki wirulencji *Enterococcus* spp. 3.1. Białko powierzchniowe Esp. 3.2. Cytolizyna. 3.3. Białko EfaA. 3.4. Białka wiążące kolagen (Ace, Acm, Scm). 3.5. Hialuronidaza. 3.6. Substancja agregująca. 3.7. Żelatynaza. 3.8. Antygen wydzielniczy SagA. 3.9. Lipaza. 3.10. Hemaglutynina. 3.11. Zewnątrzkomórkowe nadtlenki. 4. Podsumowanie 5. Piśmiennictwo

THE ROLE OF SELECTED VIRULENCE FACTORS IN INFECTIONS CAUSED BY *ENTEROCOCCUS* SPP.

Abstract: *Enterococcus* spp. are a component of the microbiota of humans and animals and are commonly found in the natural environment. They are opportunistic pathogens that can cause infections of various locations. These bacteria rarely cause community-acquired infections. Although they were considered microorganisms with low pathogenic potential, they have become one of the important hospital pathogens recently. Their common occurrence and ability to survive in the hospital environment contribute to the recorded and still increasing frequency of their isolation, also from invasive infections. The species most frequently isolated from infection cases are *E. faecalis* and *E. faecium*, which pose therapeutic problems due to their increasing multidrug resistance. Due to the growing clinical importance, mechanisms of natural and acquired resistance to antibiotics, and potential virulence factors, *Enterococcus* spp. have become the subject of many studies. The aim of the study is to present the current knowledge on the most important virulence factors that may occur in bacteria of the genus *Enterococcus*, which include: SagA secretory antigen, EfaA protein, Esp surface protein, Ace collagen binding protein, cytolysin, hyaluronidase, hemagglutinin, lipase, serine protease, aggregating substance, extracellular peroxides and gelatinase.

1. Introduction. 2. Pathogenesis of infections caused by *Enterococcus* spp. 3. The most important virulence factors of *Enterococcus* spp. 3.1. The Surface protein Esp. 3.2. Cytolysin. 3.3. EfaA protein. 3.4. Collagen binding proteins (Ace, Acm, Scm). 3.5. Hialuronidase. 3.6. Aggregation substance. 3.7. Gelatinase. 3.8. SagA secreted antygen. 3.9. Lipase. 3.10. Hemagglutinin. 3.11. Extracellular peroxides. 4. Summary. 5. Literature

Słowa kluczowe: antygen wydzielniczy SagA, białko EfaA, białko powierzchniowe Esp, białko wiążące kolagen Ace, cytolizyna, czynniki wirulencji, *Enterococcus* spp., hialuronidaza, hemaglutynina, lipaza, proteaza serynowa, substancja agregująca, zewnątrzkomórkowe nadtlenki, żelatynaza

Keywords: secreted antigen SagA, EfaA protein, surface protein Esp, collagen binding protein Ace, cytolysin, virulence factors, *Enterococcus* spp., hyaluronidase, hemagglutinin, lipase, serine protease, aggregation substance, extracellular superoxide, gelatinase

* Autor korespondencyjny: mgr Zuzanna Kraszewska, Katedra Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: z.kraszewska@cm.umk.pl

© 2023 Zuzanna Kraszewska et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Czynniki wirulencji *Enterococcus* spp., Zuzanna Kraszewska et al., ADV MICROBIOL-NY, 2023, 62, 3/4, 157–171, <https://doi.org/10.2478/am-2023-0014>

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są składnikiem mikrobioty układu pokarmowego człowieka i zwierząt, stąd dawniej nazywano je paciorkowcami kałowymi. Liczba bakterii *Enterococcus faecalis* na jeden gram treści kałowej ludzi wynosi od 10^5 do 10^7 j.t.k. (jednostek tworzących kolonie), a *Enterococcus faecium* od 10^4 do 10^5 j.t.k. (Fisher i Phillips 2009). Mikroorganizmy te mogą występować również w jamie ustnej, cewce moczowej, pochwie oraz na powierzchni skóry ludzi i zwierząt. Obecne są w środowisku naturalnym, tj. w wodzie, glebie, ściekach i na powierzchni roślin, a także izolowane są z produktów spożywczych, m.in., z serów, mielonego mięsa, wędlin czy ryb (Fisher i Phillips 2009, Giraffa 2022, Ziarno 2006). Bakterie *Enterococcus* spp. należą do fakultatywnych beztlenowców o niskich wymaganiach odżywczych. Mimo braku możliwości wytwarzania przetrwalników, zdolne są do przetrwania w szerokim zakresie pH (4,5–10,0) i temperatury (5–65°C), wykazują oporność na 40% stężenie żółci oraz na 6,5% stężenie NaCl (Fisher i Phillips 2009). W obrazie mikroskopowym widoczne są jako Gram-dodatnie ziarenkowce występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuszkach, rzadziej w skupiskach. Na agarze z krwią wzrastają w postaci szarych i stosunkowo niewielkich kolonii, niekiedy hemolizując podłoże. W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej do wstępnej identyfikacji enterokoków używa się podłoża zawierającego eskulinę, której rozkład pod wpływem metabolizmu tych bakterii powoduje zmianę zabarwienia podłoża na czarny (Facklam i Elliott 1995).

Ziarenkowce *Enterococcus* spp. są patogenami względnie chorobotwórczymi, a ich znaczenie w wywoływaniu zakażeń zaczęło odnotowywać od lat 80. XX wieku, gdy stosowanie cefalosporyn, na które bakterie te są naturalnie odporne, stało się powszechne. Przedstawiciele opisywanego rodzaju wywołują zakażenia o różnej lokalizacji, głównie u hospitalizowanych pacjentów. Gatunkami najczęściej izolowanymi z materiału klinicznego są *E. faecalis* i *E. faecium*, rzadziej *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* i *E. raffinosus*. Informacje o najczęstszych zakażeniach wywołanych przez wymienione gatunki enterokoków przedstawiono w Tabeli I. Szczepy *E. faecalis* są odpowiedzialne za około 60% wszystkich zakażeń o etiologii *Enterococcus* spp. (Flamm *et al.* 2012).

W ostatnich latach odnotowano także znaczący wzrost infekcji wywołanych przez gatunek *E. faecium*. Oba te gatunki cechuje oporność na antybiotyki z trzech lub więcej grup (ang. Multi Drug Resistant, MDR), przez co zakażenia wywołane przez te ziarniki są trudne w leczeniu. Paciorkowce *Enterococcus* spp. są coraz częstszym czynnikiem etiologicznym

zakażeń układu moczowego, ran, czy też bakteriemii (de Fátima Silva Lopes *et al.* 2005, Fisher i Phillips 2009). Wzrasta też częstość izolacji od chorych hospitalizowanych szczepów o fenotypach: VRE (ang. Vancomycin Resistant *Enterococcus*), GRE (ang. Glycopeptide Resistant *Enterococcus*), LRE (ang. Linezolid-Resistant *Enterococcus*) i HLAR (ang. High Level Aminoglycoside Resistance) (ECDC 2021). Fenotypy te stanowią poważny problem medyczny i epidemiologiczny, a opcje terapeutyczne wobec szczepów wieloantybiotykoopornych są nieliczne lub całkowicie ich brak.

W środowisku naturalnym występowanie drobnoustrojów w formie planktonicznej (rozproszonej) jest dla nich mało korzystne, dlatego wykazują one zdolność przylegania do powierzchni syntetycznych lub warstw komórek żywych i tworzenia błony biologicznej zwanej biofilmem. Ta wielokomórkowa struktura może składać się z wielu komponentów w tym: bakterii jednego lub wielu gatunków/rodzajów, grzybów, glonów, a nawet pierwotniaków (Ostrowska *et al.* 2013). Proces tworzenia biofilmu przebiega wieloeta-

Tabela I
Zakażenia wywołane przez wybrane gatunki *Enterococcus*.

Gatunek	Postać zakażenia	Piśmiennictwo
<i>E. casseliflavus</i>	zapalenie dróg żółciowych bakteriemia zapalenie gałki ocznej zapalenie wsierdzia zapalenie jamy otrzewnej zapalenie opon mózgowych	(17, 86, 136)
<i>E. durans</i>	zapalenie wsierdzia bakteriemia zapalenie dróg żółciowych	(119, 129)
<i>E. faecalis</i>	zakażenie dróg moczowych zapalenie wsierdzia zapalenie gałki ocznej infekcje tkanek miękkich bakteriemia zakażenia dziąseł i przyzębia infekcje ran pooperacyjnych	(1, 2, 3, 4, 56)
<i>E. faecium</i>	zakażenie dróg moczowych bakteriemia zapalenie wsierdzia infekcje ran pooperacyjnych zapalenie płuc zapalenie opon mózgowych	(34, 66, 138)
<i>E. gallinarum</i>	zapalenie dróg żółciowych bakteriemia zakażenia ran zakażenie dróg moczowych	(86, 119)
<i>E. raffinosus</i>	bakteriemia zakażenia ran zakażenie dróg moczowych zapalenie kości i stawów zapalenie gałki ocznej zapalenie pochwy	(94, 119)

Tabela II
Aktywność wybranych czynników wirulencji występujących u *E. faecium* i *E. faecalis*.

Czynnik wirulencji	Gen kodujący	Aktywność	Piśmiennictwo
Białko powierzchniowe Esp	<i>esp</i>	– udział w tworzeniu biofilmu – ułatwianie kolonizacji	(65, 98, 121, 122, 130)
Cytolizyna	<i>cytR</i> <i>cytLs</i> <i>cytLl</i> <i>cytM</i> <i>cytB</i> <i>cytA</i>	– hemoliza erytrocytów – egzotoksyna	(6, 10, 56)
Białko EfaA	<i>efaA</i>	– adhezyna – udział w tworzeniu biofilmu	(5)
Białko wiążące kolagen	<i>ace</i> <i>acm</i>	– adhezyna	(104)
Hialuronidaza	<i>hyl</i>	– hydroliza kwasu hialuronowego	(10, 113)
Substancja agregująca	<i>agg</i> <i>asa</i>	– adhezyna – komunikacja komórek bakteryjnych	(82, 102, 113)
Żelatynaza	<i>gelE</i>	– hydroliza kolagenu, żelatyny, hemoglobiny	(12, 111, 118)
Lipaza	<i>lip-fm</i> <i>lip-fl</i>	– hydroliza tłuszczów	(4, 108, 135)

powo i zależy zarówno od właściwości powierzchni, jak i organizmów go tworzących. Pierwszym etapem powstawania biofilmu jest adhezja. U *Enterococcus* spp. dużą rolę odgrywają tu adhezyny powierzchniowe, białko wiążące kolagen Ace oraz obecność genu *ebp* kodującego pilusy mające szczególne znaczenie w patogenie zapaleń wsierdza wywołanych przez enterokoki (Manias i Dunny 2018). Po wytworzeniu się wiązań stabilizujących pomiędzy warstwą komórek bakteryjnych, a zasiedlaną powierzchnią adhezja przechodzi w etap nieodwracalny i biofilm zaczyna dojrzewać. Podczas trwania tego etapu, drobnoustroje namnażają się i różnicują, tracąc stopniowo indywidualne właściwości. Dojrzały biofilm bakteryjny ma na celu chronić bakterie przed środowiskiem zewnętrznym, temperaturą, środkami bakteriobójczymi oraz detergentami. W takiej formie dostęp do substancji odżywczych i ich dystrybucja są ułatwione, natomiast narażenie na antybiotyki i chemioterapeutyki zmniejsza się (Ostrowska *et al.* 2013). Szczepy *Enterococcus* spp. zdolne do tworzenia biofilmu i kolonizujące różne powierzchnie oraz sprzęt medyczny mogą utrzymywać się na nich przez dłuższy czas, pomimo przestrzegania procedur dezynfekcji i higieny (Byers *et al.* 1998, Drees *et al.* 2008).

Wirulencja szczepów *Enterococcus* spp. jest w większości uwarunkowana występowaniem genów zjadliwości na chromosomie bakteryjnym lub elementach pozachromosomalnych. Geny te mogą być przenoszone za pośrednictwem transpozonów koniugacyjnych, czy też plazmidów, rzadziej natomiast ulegają transferowi

horyzontalnemu (Huycke *et al.* 1998). Plastyczność genomu enterokoków ułatwia im nabywanie genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki, jak i kodujących czynniki wirulencji. To z kolei warunkuje zwiększoną patogenność szczepów, zwłaszcza dla chorych z obniżoną odpornością. Geny kodujące mechanizmy antybiotykoporności i czynniki wirulencji mogą być zlokalizowane w obrębie wysp patogenności PAI (ang. Pathogenicity Islands) (Shankar *et al.* 2002) i przekazywane z chromosomu jednego szczepu na chromosom innego z udziałem plazmidów (Palmer *et al.* 2010). Plazmidy mogą ponadto reagować na sygnały feromonowe wytwarzane przez inne bakterie Gram-dodatnie (np. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp.), a nawet Gram-ujemnych (*Escherichia coli*), co sprzyja międzygatunkowemu rozprzestrzenianiu się genów wirulencji i oporności na antybiotyki (Palmer *et al.* 2010, Vickerman *et al.* 2010). Genom przedstawicieli rodzaju *Enterococcus* zawiera wiele ruchomych elementów w postaci sekwencji insercyjnych, fagów i plazmidów (Gilmore *et al.* 2013). Co ciekawe, mimo bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego, u szczepów z gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* występują różne typy plazmidów, co sugeruje, że nie jest to cecha powiązana z gatunkiem (Jensen *et al.* 2010, Palmer *et al.* 2010, Rosvoll *et al.* 2010).

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* dysponują niewielką liczbą czynników wirulencji w porównaniu do innych ziarenkowców Gram-dodatnich. Gatunkiem spośród rodzaju *Enterococcus*, u którego najlepiej zbadano czynniki zjadliwości jest *E. faecalis*.

2. Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Enterococcus* spp.

Szczepy z rodzaju *Enterococcus* mogą wywoływać zakażenia endo- i egzogenne. Źródłem zakażeń endogennych jest mikrobiota chorego, która w wyniku translokacji z przewodu pokarmowego dostaje się do węzłów chłonnych krezkowych, a następnie, poprzez błonę śluzową jelita, do układu krążenia, a wraz z krwią do różnych narządów (Śledzińska *et al.* 2009). W przypadku zakażeń układu moczowego najczęściej obserwuje się zakażenia endogenne drogą wstępującą, w przypadku których mikrobiota jelitowa dostaje się do pęcherza moczowego bezpośrednio poprzez cewkę moczową, co jest możliwe ze względu na bliskie sąsiedztwo tych narządów z okolicami odbytu (Salvatore *et al.* 2011).

Zakażenie egzogenne poprzedzone jest najczęściej bezobjawową kolonizacją układu pokarmowego, rza dziej skóry, przez szczepy *Enterococcus* spp. występujące endemicznie w środowisku szpitalnym (Kayser 2003). Źródłem szczepów są nosiciele lub chorzy zakażeni *Enterococcus* spp., personel medyczny (przejsiowa mikrobiota skóry rąk) oraz sprzęt medyczny (Drees *et al.* 2008).

Ryzyko wystąpienia zakażenia szpitalnego o etiologii *Enterococcus* spp. zależne jest głównie od czasu trwania hospitalizacji pacjenta zaawansowania choroby podstawowej oraz stosowanej antybiotykoterapii (Colomer-Winter *et al.* 2018). Grupę zwiększonego ryzyka stanowią osoby z obniżoną odpornością: chorzy w podeszłym wieku, z poważną chorobą podstawową, osoby z immunosupresją, z rozległymi oparzeniami, zespołem stopy cukrzycowej, niewydolnością nerek, po przeszczepie narządów oraz po hemodializach (Arias i Murray 2012, Śledzińska *et al.* 2009). Szczególnie narażeni są chorzy oddziałów hematologicznych, intensywnej terapii oraz oddziałów chirurgicznych (Arias i Murray 2012).

3. Najważniejsze czynniki wirulencji *Enterococcus* spp.

3.1. Białko powierzchniowe Esp

Zewnątrzkomórkowe białko powierzchniowe (ang. *Enterococcal surface protein*, Esp) zostało po raz pierwszy wykryte u *E. faecalis* i opisane w 1999 roku przez Shankar i wsp. (Shankar *et al.* 1999). Jego masa cząsteczkowa wynosi około 202 kDa. Białko Esp składa się głównie z powtarzających się bloków aminokwasowych, oznaczonych jako A (84 aminokwasy) i C (82 aminokwasy), których liczba w obrębie gatunku może się różnić. W bliskiej odległości od wspomnianych bloków umiejscowiona jest unikatowa białkowa domena N-końcowa, składająca się z 694 amino-

kwasów, poprzedzona krótką sekwencją sygnałową S (Tendolkar *et al.* 2005).

Esp jest metaloproteinazą zależną od jonów cynku, która może hydrolizować, m.in., żelatynę, hemoglobinę i kolagen (Zheng *et al.* 2017). Obecność Esp wiąże się ze zdolnością *Enterococcus* spp. do wytwarzania biofilmu, stwierdzaną zwłaszcza u szczepów z gatunku *E. faecalis* (Toledo-Arana *et al.* 2001, Waar *et al.* 2002), szczególnie u izolatów wywołujących zapalenie wsierdzia (Heikens *et al.* 2011). Enzym Esp wykazuje podobieństwo do białek występujących u innych gatunków bakterii np. białko Bap u *Staphylococcus aureus* i białko Rib u *Streptococcus agalactiae*, które również biorą udział w tworzeniu biofilmu (Shankar *et al.* 1999). Białko Esp ma istotną rolę w kolonizacji i wywoływaniu zakażeń układu moczowego m.in. przez tworzenie biofilmu w drogach moczowych oraz na powierzchniach cewników urologicznych (Leendertse *et al.* 2009, Shankar *et al.* 2001). Na podstawie swoich badań, Taglialegna i wsp. (2020) wykazali, że domena N-końcowa białka Esp tworzy w środowisku kwaśnym agregaty podobne strukturalnie do amyloidu, dzięki którym może indukować wytwarzanie macierzy biofilmu przez komórki niezdolne do syntezy białka powierzchniowego Esp. Natomiast Ghameshlouei i wsp. (Ghameshlouei *et al.* 2021) zasugerowali, że zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i biologicznym oksadiazoli obniża ekspresję genu *esp* i działa hamująco na formowanie biofilmu przez *E. faecalis*.

Białko Esp kodowane jest przez gen *esp*, zlokalizowany w obrębie PAI. Top i wsp. (Top *et al.* 2013) wykazali, że transkrypcja operonu dla Esp u *E. faecium* jest regulowana przez białko EbrB, a gen *ebrB* znajduje się w sekwencji poprzedzającej gen *esp*. Badane szczepy, u których występowała mutacja sekwencji regulatorowej, wykazywały niższy poziom ekspresji białka Esp, a także mniejszą zdolność tworzenia biofilmu. Bakterie, z mutacją genu *ebrB* wytwarzały biofilm mniej intensywnie, w porównaniu do szczepów niosących mutację genu *esp*. Sugeruje to, że *ebrB* reguluje również geny zaangażowane w tworzenie biofilmu, kodujące lizozym i oksydazę NADH.

Występowanie białka Esp na powierzchni komórek *E. faecium* jest zróżnicowane pomiędzy szczepami i zależy od warunków wzrostu, tj. temperatury i zawartości tlenu (Van Wamel *et al.* 2007). Więcej eksponowanych zewnątrzkomórkowo cząsteczek występuje w przypadku hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C, w porównaniu z hodowlą w 21°C, oraz w warunkach beztlenowych. Dane te wskazują, że szczepy z gatunku *E. faecium* reagują na zmieniające się warunki środowiskowe, a większa liczba białek Esp ułatwia kolonizację i przyczynia się do przyspieszenia procesu zakażenia.

Białko Esp jest czynnikiem wirulencji rozpowszechnionym wśród *Enterococcus* spp. (Nasaj *et al.* 2016,

Strateva *et al.* 2016), zwłaszcza u szczepów MDR (Eaton i Gasson 2001). Początkowo, w latach 90. ubiegłego wieku, gen ten wykrywano tylko u gatunku *E. faecalis* (Shankar *et al.* 1999), obecnie jego występowanie stwierdza się również u przedstawicieli gatunków, tj. *E. faecium*, *E. raffinosus* i *E. avium* (Freitas *et al.* 2018, Vankerckhoven *et al.* 2004). Ponadto wykazano korelację między występowaniem genu *esp* na plazmidach koniugacyjnych, a opornością bakterii na ampicylinę (Vergis *et al.* 2002). Obecność genu *esp* stwierdzano częściej u szczepów *E. faecium* o fenotypie VRE oraz izolowanych z ognisk epidemicznych (Arshadi *et al.* 2018, Willems *et al.* 2001). Szczepy z gatunku *E. faecium* o fenotypie VRE kolonizujące krtań i gardło pacjentów hematoonkologicznych, częściej wykazują obecność genu *esp* w porównaniu do izolatów z kału, jednak rzadziej cechuje ich zdolność do tworzenia biofilmu. Potwierdza to znaczenie białka Esp w samym procesie kolonizacji pacjentów (Jovanović *et al.* 2018).

3.2. Cytolizyna

Cytolizyna jest egzotoksyną działającą zarówno wobec komórek eukariotycznych, jak i prokariotycznych (Dong *et al.* 2015, Van Tyne *et al.* 2013). Należy do grupy bakteriocyn klasy II zawierających lantioninę, aktywnych wobec wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich (Archimbaud *et al.* 2002). Po raz pierwszy opisano ją w 1934 roku, jako streptolizynę (Todd 1934). Nazywana jest również hemolizyną, ponieważ wywołuje rozpad erytrocytów ludzkich, końskich, bydłowych i króliczych (Arias i Murray 2012, Basinger i Jackson 1968).

Cytolizyna kodowana jest przez gen *cylA*, umiejscowiony na chromosomie bakteryjnym bądź na plazmidach zależnych od feromonów. Może występować w obrębie wysp PAI wraz z genami kodującymi substancję agregującą oraz białko powierzchniowe Esp (Shankar *et al.* 2004). Na operon cytolizyny składają takie geny, jak: *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* i *cylI* (Jett *et al.* 1994). Geny kodujące cytolizynę nie występują u wszystkich szczepów *Enterococcus* spp. Ponadto, ulegają wybiórczej ekspresji (Semedo *et al.* 2003a).

Wytwarzanie, wydzielanie i aktywność cytolizyny wymaga współdziałania wielu białek. Cytolizyna składa się z dwóch peptydów, nazwanych cytolizyną L i S, kodowanych przez geny *cylL_S* i *cylL_L* (Arias i Murray 2012). Są one modyfikowane potranslacyjnie dzięki reakcjom katalizowanym przez białko CylM, kodowane przez gen *cylM*. Proces ten polega na dehydratacji seryny i treoniny oraz powstaniu cząsteczek lantioniny i metylolantioniny. Łączą one odwodnione reszty aminokwasowe z sąsiadującymi grupami tiolowymi cystein (Van Tyne *et al.* 2013, Dong *et al.* 2015). Zmo-

dyfikowane peptydy CylL_L i CylL_S, zostają wydzielone na zewnątrz komórki przy udziale CylB – białka wiążącego ATP. Aktywacja uwolnionej cytolizyny następuje przez proteazę serynową, kodowaną przez gen *cylA*. Oporność komórki bakteryjnej na działanie wydzielonej toksyny zapewnia białko odpornościowe, będące produktem genu *cylI* (Biswas *et al.* 2016).

Ekspresja genu cytolizyny, należącej do hemolizyn bakteryjnych, regulowana jest przez układ dwóch białek CylR1/CylR2 (De Vuyst *et al.* 2003, Shankar *et al.* 2001, Śledzińska *et al.* 2009). W przypadku braku komórek docelowych dla cytolizyny, peptydy CylL_L i CylL_S tworzą nierozpuszczalny kompleks, a operon cytolizyny ulega ekspresji na niskim poziomie. W przypadku obecności komórek docelowych za wiązanie się z nimi odpowiada peptyd CylL_L, stanowiący większą podjednostkę toksyny i mający znacznie większe powinowactwo do erytrocytów niż podjednostka CylL_S. Podjednostka CylL_S łączy się ze związanym z błoną peptydem CylR1, co prowadzi do uwalniania białka represorowego CylR2 i skutkuje wysokim poziomem ekspresji operonu cytolizyny. Proces ten docelowo odpowiada za wytworzenie porów w błonie atakowanej komórki (Ali *et al.* 2017, Arias i Murray 2012, Byers *et al.* 1998, LaGrow *et al.* 2017). Dokładny proces transmisji sygnałów pomiędzy kompleksem CylR1/CylR2, a podjednostkami toksynotwórczymi nie został jeszcze w pełni poznany.

Cytolizyna jest obecna zarówno u szczepów wyizolowanych z zakażeń jak i wchodzących w skład mikrobioty osób zdrowych. Infekcje wywołane przez szczepy mające gen *cyl* cechują się cięższym przebiegiem i wyższym odsetkiem śmiertelności (Chow *et al.* 1993, Huycke *et al.* 1991). Cytolizyna wykrywana jest także u szczepów izolowanych od zwierząt i z produktów spożywczych, które również mogą być źródłem ciężkich zakażeń, np. u osób z obniżoną odpornością (Ghosh *et al.* 2011, Semedo *et al.* 2003a). Geny cytolizyny wykrywane są najczęściej u gatunku *E. faecalis* (45%), chociaż występują również u gatunków rzadziej izolowanych z zakażeń, np. *E. durans* (16%) i *E. hirae* (3%) (Semedo *et al.* 2003a). LaGrow i wsp. (LaGrow *et al.* 2017) wykazali, że użycie nanocząsteczkowego modelu krwinek czerwonych w terapii zakażeń gałki ocznej o etiologii *E. faecalis* neutralizuje aktywność cytolizyny poprzez wiązanie się do nich podjednostki CylL_L.

3.3. Białko EfaA

Białko EfaA ma strukturę wykazującą w wysokim stopniu homologię do białkowych adhezyn umiejscowionych w ścianie komórkowej paciorkowców z rodzaju *Streptococcus* (Archimbaud *et al.* 2002). Wyniki badań nad jego funkcją wykazały, że białko to może uczestniczyć w przyleganiu komórek bakteryjnych do komórek mięśnia sercowego (Guzmán *et al.* 1989).

Obecność genu *efaA*, kodującego białko EfaA, stwierdza się u ponad 80% przedstawicieli rodzaju *Enterococcus* (Semedo *et al.* 2003b), a jego ekspresja podlega kontroli w czasie szeregu procesów. Gen ten może występować niezależnie od pochodzenia szczepów oraz ich występowania. U szczepów *E. faecalis* białko EfaA kodowane jest u przez gen *efaA_{fs}*. Wśród szczepów klinicznych *E. faecalis* jego obecność stwierdzono u 86% izolatów (Strateva *et al.* 2016). Świadczy to o rozpowszechnieniu tego genu u większości szczepów należących do tego gatunku.

Obecność genów kodujących białko EfaA potwierdzono u innych gatunków m.in. *E. faecium*, *E. durans* czy *E. solitarius* (Eaton *et al.* 2001, Semedo *et al.* 2003b). U szczepów *E. faecium* białko kodowane jest przez gen *efaA_{fm}*, który wykrywany jest u kilkunastu procent szczepów (Semedo *et al.* 2003b). W badaniach na szczepach *E. faecium* wykazano jednocześnie, że gen ten występuje z niższą częstością u szczepów nie tworzących biofilmu – 44,3% w porównaniu do 85,0% u izolatów wytwarzających biofilm (Sieńko *et al.* 2015).

Samo występowanie genu *efaA* nie determinuje chorobotwórczości danego szczepu. Dowiedziono bowiem, że obecność genu nie ma wpływu na prozdrowotne, komensalne właściwości szczepu i dlatego nie wyklucza jego wykorzystania w konstrukcji preparatów leczniczych np. preparatu probiotycznego (Mishra i Ghosh 2018).

Pomimo dużego zróżnicowania genetycznego wśród szczepów z rodzaju *Enterococcus*, obecność białka EfaA, wykazano u wszystkich izolatów wyosobnionych z ran (Heidari *et al.* 2016). Jego występowanie stwierdza się z wyższą częstością u szczepów klinicznych w porównaniu z izolatami pochodzącymi ze środowiska naturalnego czy z żywności (Semedo *et al.* 2003b). Jest to szczególnie istotne z punktu widzenia stosowanych procedur diagnostycznych i leczniczych. Wykazano bowiem, że ekspresja genu *efaA* może być indukowana przez obecność antybiotyku, np. gentamycyny w środowisku bytowania szczepu (Kafil *et al.* 2016).

Badania opisane w 2018 roku wykazały, że do właściwego działania szeregu czynników wirulencji *E. faecalis* niezbędne jest uzyskanie odpowiednich warunków, np. pozyskanie przez komórki bakteryjne manganu (Colomer-Winter *et al.* 2018). Wytwarzanie białka EfaA jest natomiast uzależnione, m.in., od odczynu środowiska i działania pola magnetycznego, co ma znaczenie w tworzeniu technologii procesów dezynfekcji (Fan *et al.* 2018). Beomidehagh i wsp. (Beomidehagh *et al.* 2018) wykazali, że środowisko kwaśne nie wpływa na poziom ekspresji genu *efaA* u szczepów *E. faecalis* natomiast warunki zasadowe znacznie go obniżają.

Występowanie szczepów posiadających gen *efaA* wydaje się szczególnie istotne w odniesieniu do zakażeń na tle *Enterococcus* spp., do których dochodzi w sto-

matologii (Akbari Aghdam *et al.* 2017). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że gen ten występował u 95% izolatów *Enterococcus* spp. wyosobnionych z materiału klinicznego, pobranego z kanałów korzeniowych od pacjentów z wierzchołkowym zapaleniem przyzębia (Barbosa-Ribeiro *et al.* 2016).

3.4. Białka wiążące kolagen (Ace, Acm, Scm)

Jedną z najważniejszych adhezyn występujących u *E. faecalis* jest białko powierzchniowe Ace. Strukturą i funkcją przypomina białko Cna, determinujące adhezję szczepów *S. aureus* (Rich *et al.* 1999). Białko kodowane jest przez gen *ace*, którego ekspresja jest kontrolowana, m.in., przez czynniki transkrypcyjne z rodziny ArgR (Manias i Dunny 2018). Analiza genomu szczepów *Enterococcus* spp. pochodzących ze środowiska ludzi i zwierząt wykazała, że aż 89,0% z nich zawierały gen *ace* (Freitas *et al.* 2020). Ze względu na powszechne występowanie białka Ace u szczepów *E. faecalis*, zaproponowano wykorzystanie kodującego go genu do identyfikacji gatunkowej szczepów (Duh *et al.* 2001).

Cząsteczka białka Ace zawiera krótką sekwencję sygnałową składającą się z 31 aminokwasów na N-końcu. W strukturze białka wyodrębnia się domenę A, składającą się z 335 aminokwasów, która jest odpowiedzialna za wiązanie ligandu w białkach macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM) komórek gospodarza oraz domenę B o zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych. Ostatnim elementem struktury białka Ace jest region C składający się z sekwencji LPXTG (L – leucyna, P – prolina, X – dowolne aminokwasy, T – treonina, G – glicyna) o wysokim powinowactwie do białek ECM (Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2017).

Właściwości adhezyjne białka Ace ułatwiają bakteriom z rodzaju *Enterococcus* kolonizację poprzez łączenie się z białkami ECM oraz udział w wiązaniu kolagenu typu I i IV (Nallapareddy *et al.* 2003, Rich *et al.* 1999). Białko Ace oraz swoiste dla niego przeciwciała klasy IgG wykrywane są w surowicy aż w 90% przypadków zapalenia wsierdza o etiologii *E. faecalis* (Tendolkar *et al.* 2003). Wykazano, że podawanie szczerom monoklonalnego przeciwciała anty-Ace mAb70 znacząco zmniejsza intensywność wiązania komórek bakteryjnych z kolagenem IV w testach adherencji *in vitro*, a wstępne leczenie mAb70 anty-Ace znacząco zmniejsza częstość zakażeń zastawek aortalnych (Singh *et al.* 2018).

Analogiem białka Ace u szczepów *E. faecalis* jest białko Acm występujące u *E. faecium*. Kodujące je geny również wykazują w wysokim stopniu homologię do białka Cna występującego u *S. aureus*. Produkt ekspresji

genu *acm* ma zdolność wiązania kolagenu, jednak tylko typu I (Nallapareddy *et al.* 2003). Obecność tego genu stwierdzono u 86,6% klinicznych izolatów *E. faecium* (Arshadi *et al.* 2018).

W badaniach na szczepach *E. faecium* wykazano obecność innego białka wiążącego kolagen Scm (ang. second collagen adhesion, kodowanego przez gen *scm*) (Sillanpää *et al.* 2008). Szczepy *E. faecium* posiadające to białko wykazują zdolność wiązania kolagenu typu V oraz fibrynogenu, co pełni istotną funkcję w patogenezie zapalenia wsierdza o tej etiologii. Ponadto wykazano, że nawet niewielkie zmiany mutacyjne w genach mogą wpływać na zdolność wzrostu izolatów *E. faecium* oraz ekspresję ich czynników wirulencji, przyczyniając się do zmian patogenetycznych konkretnego szczepu (Somarajam *et al.* 2014).

3.5. Hialuronidaza

Hialuronidaza wytwarzana jest przez szczepy wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich, w tym przedstawicieli *Enterococcus* spp. Wykazuje ona zdolność hydrolizy kwasu hialuronowego, będącego składnikiem tkanek i płynów ustrojowych, np. skóry, chrząstek, mózgu, mięśni czy pępowiny. Jest enzymem kodowanym przez gen *hyl*, plazmidowo lub chromosomalnie (Basinger i Jackson 1968, Śledzińska *et al.* 2009).

Udział hialuronidazy w patogenezie zakażeń wywołanych przez *Enterococcus* spp. nie jest dostatecznie poznany. Pełni ona funkcje podobne do enzymów wytwarzanych przez *S. pyogenes* i *S. aureus*. Uszkadza tkanki i ułatwia rozprzestrzenianie się bakterii oraz ich toksyn w zakażonym organizmie (Śledzińska *et al.* 2009). Rozkładając kwas hialuronowy, hialuronidaza uwalnia disacharydy, które stanowią składniki odżywcze dla bakterii (Hynes *et al.* 2000, Kayaoglu i Ørstavik 2004).

Gen *hyl* wykrywany jest głównie wśród szczepów *E. faecium* izolowanych od pacjentów hospitalizowanych (Basinger i Jackson 1968, Rice *et al.* 2003). Znacznie rzadziej stwierdza się go wśród klinicznych szczepów *E. faecalis* (Soheili *et al.* 2014). Obecność genu *hyl* stwierdzano częściej u szczepów o fenotypie VRE (28,7%) w porównaniu do izolatów o fenotypie VSE (ang. Vancomycin Sensitive *Enterococci*) (5%) (Arshadi *et al.* 2018). Ważną informację dotyczącą potencjału wytwarzania hialuronidazy wniosły wyniki badania Elmali i Can (2018), którzy wykazali, że wśród 246 izolatów *Enterococcus* spp. pozyskanych z żywności, żaden nie miał genu *hyl*. Arias i wsp. (2009) na podstawie swoich badań zasugerowali, że klastry genów warunkujących oporność na wankomycynę są łączone z plazmidem zawierającym gen *hyl* i mogą być wspólnie transferowane.

3.6. Substancja agregująca

Substancja agregująca (ang. aggregation substance, AS) jest białkiem powierzchniowym, którego aktywność zależy od obecności feromonów i surowicy (Sava *et al.* 2010). Kodowana jest przez geny *agg*, *asa*, *asa373*, *prgB*, występujące na plazmidach koniugacyjnych pAD1, pCF10, pPD1 (Przybylski 2007, Shiono i Ike 1999, Śledzińska *et al.* 2009).

Obecność AS wiąże się ze zwiększoną zdolnością bakterii do tworzenia dużych agregatów i przyczynia się do efektywnego przenoszenia między nimi informacji genetycznej (Biswas *et al.* 2016, Süßmuth *et al.* 2000). Ponadto ułatwia adhezję do powierzchni komórek gospodarza, takich jak: komórki nabłonkowe, erytrocyty, granulocyty oraz makrofagi (Rakita *et al.* 1999, Süßmuth *et al.* 2000, Śledzińska *et al.* 2009). Szczepy *Enterococcus* spp. wytwarzające AS są częściej fagocytowane przez makrofagi, ale wykazują wewnątrz nich wyższą przeżywalność niż szczepy niewytwarzające AS (Süßmuth *et al.* 2000, Śledzińska *et al.* 2009). Proces ten przyczynia się do translokacji *Enterococcus* spp. z przewodu pokarmowego do krwiobiegu, układu limfatycznego i innych tkanek organizmu, co umożliwia bakteriom wywoływanie zakażeń o różnej lokalizacji (Arshadi *et al.* 2018).

Ekspresja białka AS, o masie cząsteczkowej 137 kDa, jest regulowana przez obecność hamującego peptydu iCF10, kodowanego na plazmidzie pCF10, lub alternatywnie przez kompleksy lipidowo-białkowe, które wpływają na aktywność tego peptydu. Afonina i wsp. (Afonina *et al.* 2018) wykazali, że AS współdziała z białkiem Esp w tworzeniu struktury biofilmu oraz osadzeniu w niej agregatów bakteryjnych. Ponadto udowodniono, że białko AS odpowiada przede wszystkim za wstępną agregację komórek bakterii, a następnie hamowane jest przez wzrost stężenia peptydu iCF10, podczas gdy białko Esp bierze udział w zagęszczeniu struktury biofilmu w późniejszych etapach jego tworzenia.

Białko AS jest ważnym czynnikiem wirulencji, który ma wpływ na wywoływanie przez *Enterococcus* spp. zapalenia wsierdza (Chow *et al.* 1993, Schlievert *et al.* 1998). Pierwszy przypadek izolacji *E. faecalis* z takiego zakażenia został opisany w 1899 roku przez Maccallum i Hastings (Maccallum i Hastings 1988). Murray (Murray 1990) w 1990 roku określił, że 5–15% przypadków zapalenia wsierdza jest wywołanych przez *Enterococcus* spp., a choroba ta częściej występuje u mężczyzn w starszym wieku.

Obecność genu białka AS jest wykrywana głównie u szczepów *E. faecalis*, z niższą częstością u *E. faecium*, przy czym częściej występuje u izolatów o fenotypie VRE (Biswas *et al.* 2016, Strateva *et al.* 2016).

3.7. Żelatynaza

Żelatynaza jest metaloproteinazą wykazującą zdolność hydrolizy żelatyny, kolagenu, kazeiny, hemoglobiny, elastyny (Biswas *et al.* 2016, Su *et al.* 1991) oraz rozpuszczania fibryny (Waters *et al.* 2003). Zdolność ta ułatwia komórkom bakteryjnym rozprzestrzenianie się w warunkach *in vivo*. Żelatynaza wpływa hamująco na układ immunologiczny, co potwierdziły badania na surowicy ludzkiej krwi i hemolimfie owadów (Park *et al.* 2007). Inną ważną funkcją żelatynazy jest rozkład nieprawidłowo sfałdowanych, нефункциональных białek powierzchniowych komórek bakteryjnych (Waters *et al.* 2003).

Enzym ten kodowany jest przez gen *gelE*, który po raz pierwszy został zsekwencjonowany w 1991 roku (Su *et al.* 1991). Ulega on ekspresji jednocześnie z genem *sprE*, kodującym proteinazę serynową, która stanowi potencjalny czynnik wirulencji *Enterococcus* spp. uszkadzający tkanki gospodarza. Aktywność proteinazy serynowej stwierdzana jest tylko w połączeniu z aktywnością wytwarzanej jednocześnie żelatynazy.

Ekspresja genów *gelE* i *sprE* podlega regulacji dwuskładnikowemu systemowi *quorum sensing* Fsr. Na locus Fsr składają się geny: *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *fsrD*. Udowodniono, że system Fsr reaguje na stężenie feromonu aktywującego GBAP (ang. gelatinase biosynthesis activation pheromone). Jest on cyklicznym peptydem kodowanym przez gen *fsrD* i mającym pierścień laktonowy (Nakayama *et al.* 2001). FsrB odpowiada za rozszczepienie proteolityczne i cyklizację FsrD (Nakayama *et al.* 2006). Akumulacja peptydu GBAP w przestrzeni pozakomórkowej jest prawdopodobnie wykrywana przez kinazę histydynową FsrC, prowadząc do aktywacji regulatora (Nakayama *et al.* 2001).

Wyniki badań Hancock i wsp. (Hancock i Perego 2004) wykazały, że system Fsr wpływa na tworzenie biofilmu przez szczepy *E. faecalis* poprzez wytwarzanie żelatynazy. Ustalono, że mutacja w obrębie genów systemu Fsr skutkuje wytwarzaniem biofilmu i żelatynazy na niższym poziomie. Proteinaza ta wpływa również na uwalnianie przez *Enterococcus* spp. zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA), które jest czynnikiem promującym rozwój biofilmu (Thomas *et al.* 2008). Z kolei SprE wpływa zarówno na uwalnianie eDNA, dojrzewanie biofilmu, jak i hamuje autolizę komórek. Odmienne wyniki w tym aspekcie uzyskali Zheng i wsp. (Zheng *et al.* 2017), którzy wykazali, że brak genu *gelE* koreluje z wyższą częstością *E. faecalis* do tworzenia biofilmu.

Gen *gelE* może występować na chromosomie bakteryjnym, lecz nie zawsze ulega ekspresji (Eaton *et al.* 2001, Semedo *et al.* 2003a). Strzelecki i wsp. (2011) w swoich badaniach wykryli ten gen u 91% izolatów *E. faecalis*, z czego zaledwie u 53% szczepów wykazano fenotypowo zdolność hydrolizy żelatyny.

Przyczyną dysfunkcji tej metaloproteinazy mogą być mutacje w obrębie genów *fsr* i *gelE* (Nakayama *et al.* 2002, Qin *et al.* 2000). Znaczenie tego procesu nie jest do końca poznane.

Szczepy z rodzaju *Enterococcus* zawierające gen żelatynazy wykazują większą zdolność adhezji do powierzchni zębiny, co tłumaczy ich udział w zakażeniach endodontycznych (Guneser i Eldeniz 2016). Wytwarzanie żelatynazy nie jest niezbędne do utrzymywania się i wywoływania przez *Enterococcus* spp. zakażeń w obrębie układu moczowego, gdyż wiele szczepów izolowanych z zakażeń tego układu wykazuje delecję regionów odpowiedzialnych za wytwarzanie tej proteinazy (Nakayama *et al.* 2002). Hashem i wsp. (2021) dzięki swoim badaniom potwierdzili, że sama obecność genu *gelE* nie wiąże się z aktywnością żelatynazy, jednak zaobserwowali korelację pomiędzy obecnością w genomie *E. faecalis* genów *gelE* i *sprE*, a intensywnością tworzenia biofilmu. Ponadto zasugerowali, że obecność systemu *quorum sensing* Fsr może być skutecznym biomarkerem aktywności żelatynazy.

Gen *gelE* wykrywany jest częściej wśród izolatów klinicznych, w porównaniu do szczepów z przypadków kolonizacji, co potwierdzałoby udział żelatynazy w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *Enterococcus* spp. (Coque *et al.* 1995, Pillai *et al.* 2002). Gen kodujący żelatynazę występuje częściej u *E. faecalis*, niż u *E. faecium* (Biswas *et al.* 2016, Eaton i Gasson 2001). Jego obecność potwierdzono również u szczepów *E. faecalis* izolowanych z żywności (Eaton i Gasson 2001).

3.8. Antygen wydzielniczy SagA

W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele informacji o właściwościach antygeny wydzielniczego SagA (Paganelli *et al.* 2015, Śledzińska *et al.* 2009). Jest to białko wykrywane u przedstawicieli gatunku *E. faecium* i kodowane przez gen *saga* umiejscowiony w grupie genów niosących podstawowe informacje dotyczące szlaku syntezy ściany komórkowej bakterii. Stąd, postuluje się, że produkt syntezy tego genu może odgrywać ważną rolę w procesie wzrostu i namnażania się komórek *E. faecium* (Teng *et al.* 2003). Czyni to zatem sekwencję genu *saga*, albo aktywność kodowanego przez niego białka, potencjalnym celem w konstrukcji szczepionek, zapobiegającym głównie rozwojowi bakterii o etiologii *Enterococcus* spp. lub tworzenia nowych leków o właściwościach przeciwbakteryjnych (Kropec *et al.* 2011).

Białko SagA jest podobne do analogicznych części występujących u pałeczek *Listeria monocytogenes* (białek P45 i 60), które u przedstawicieli tego gatunku są odpowiedzialne za inwazję hepatocytów, fibroblastów i makrofagów. Antygen wydzielniczy SagA jest jed-

nocześnie jednym z podstawowych składników budowy biofilmu *E. faecium* (Paganelli *et al.* 2015), jednak tylko w odniesieniu do szczepów należących do kladu A1 (zawierającego szczepy izolowane od ludzi) (Gerald *et al.* 2022). Ma zdolność wiązania się z proteinami macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in., fibrynogenem, kolagenem typu I i IV, lamininą i fibronektyną (Teng *et al.* 2003). Wpływa to na zdolność adhezji komórek bakteryjnych oraz ułatwia szczepom z gatunku *E. faecium* kolonizację tkanek i narządów gospodarza oraz nieożywionych powierzchni. W trakcie oceny znaczenia antygeny wydzielniczego SagA wykazano, że jest on w znacznym stopniu wytwarzany przez szczepy izolowane z zapalenia wsierdza (Śledzińska *et al.* 2009).

Z badań przeprowadzonych w ostatnich kilku latach wynika, że rola białka SagA polega na modulowaniu zdolności do kolonizacji czy zakażenia bakteriami bezwzględnie patogennymi, co wpływa na formację ludzkiej bariery jelitowej (Paganelli *et al.* 2015, Pedicord *et al.* 2016, Rangan *et al.* 2016). Ponadto przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych na modelu zwierzęcym badania wykazały, że obecność antygeny wydzielniczego znacząco wpływa na skład mikrobiomu ich jelit. Stwierdzono, że może on nawet promować tolerancję wobec zakażeń wywołanych przez bakterie chorobotwórcze, np. z rodzaju *Salmonella* (Rangan *et al.* 2016).

3.9. Lipaza

Mniejsze znaczenie w patogenezie zakażeń przypisuje się właściwościom lipolitycznym szczepów z rodzaju *Enterococcus*. Wytwarzane przez te szczepy lipazy hydrolizują cząsteczki tłuszczów, co poszerza zakres warunków środowiskowych, w jakich mogą występować. Dzięki właściwościom lipolitycznym *Enterococcus* spp. mogą optymalizować pH środowiska, a także niszczyć lipidowe komponenty komórek gospodarza (Stehr *et al.* 2003).

Wśród szczepów *Enterococcus* spp. wykazano duże zróżnicowanie obecności lipazy. Jej występowanie notuje się w szerokim zakresie od 4% do nawet ponad 35% wśród szczepów wyosobnionych z krwi (Elsner *et al.* 2000, Śledzińska *et al.* 2009). Według różnych badaczy aktywność lipolityczna u szczepów klinicznych mieści się w granicach od 7% szczepów wykrytych w zakażonych ranach (Dworniczek *et al.* 2012) do prawie 24% wśród szczepów o różnej specyficy zakażeń i różnym profilu antybiotykooporności (Biswas *et al.* 2016, Kowalska-Krochmal *et al.* 2011). Aktywność lipazy wykrywana jest zdecydowanie częściej wśród szczepów tworzących biofilm (Dworniczek *et al.* 2014). W badaniach przeprowadzonych przez Komiyama i wsp. (2016) na wytwarzających biofilm izolatów różnych gatunków rodzaju *Enterococcus*,

wykazano aktywność lipolityczną u 92% szczepów. Według Wróblewskiej i wsp. (Wróblewska *et al.* 2013) aktywność lipolityczną wykazywało 71,1% klinicznych szczepów *E. faecium*, a dodatkowo stwierdzono różnicę w aktywności lipazy wobec różnych użytych w badaniu estrów kwasowych. Może to sugerować różnice strukturalne oraz biochemiczne enzymów lipolitycznych wytwarzanych przez *Enterococcus* spp., co przyczynia się do wybiórczej hydrolizy substratów.

Ważnym spostrzeżeniem badaczy przedstawnym w dostępnym piśmiennictwie jest to, że na aktywność lipazy i zdolność tworzenia biofilmu wpływają różne czynniki, w tym składniki odżywcze. Wojnicz i wsp. (Wojnicz *et al.* 2016) wykazali, że ekstrakt z żurawiny ma wpływ na wytwarzanie lipazy i tworzenie biofilmu, co może pośrednio redukować zdolność szczepów *E. faecalis* do wywoływania zakażeń układu moczowego. Może to mieć znaczenie w profilaktyce zakażeń o tej etiologii występujących w tej konkretnej lokalizacji (Wojnicz *et al.* 2016).

3.10. Hemaglutynina

W piśmiennictwie dostępnym jest zaledwie kilka publikacji dotyczących znaczenia hemaglutyniny u szczepów z rodzaju *Enterococcus* (Carvalho *et al.* 1995, Elsner *et al.* 2000). Takiej aktywności nie wykryto u szczepów *E. faecium*. Natomiast wśród izolatów *E. faecalis*, stwierdza się jej występowanie u niemal wszystkich izolatów (97%) (Carvalho *et al.* 1995, Elsner *et al.* 2000, Śledzińska *et al.* 2009).

Specyfika zjawiska hemaglutynacji erytrocytów, jakie mogą wykazywać szczepy z gatunku *E. faecalis*, jest różna i zależy w dużej mierze od modelu badawczego w warunkach *in vitro* – pochodzenia badanych krwinek, pochodzenia szczepów względem lokalizacji zakażenia czy rodzaju materiału klinicznego, z którego izolowane były badane szczepy (Carvalho *et al.* 1995, Izumi *et al.* 2005). Na podstawie wyników przeprowadzonych badań dostrzeżono dwie prawidłowości. Po pierwsze, najwięcej szczepów wykazuje zdolność wywoływania hemaglutynacji erytrocytów króliczych. Po drugie, czynniki odpowiedzialne za tę cechę mogą mieć zarówno typowo białkowy, jak i niebiałkowy charakter (Carvalho *et al.* 1995).

Według najnowszych badań opartych na technikach biologii molekularnej w genomie szczepów z rodzaju *Enterococcus* można wykazać grupę genów zawierającą, m.in., operony utworzone z sekwencji genów analogicznych do enzymów-toksyn u bakterii Gram-dodatnich, w tym kodujących hemaglutyninę. Na szczególną uwagę zasługuje operon zawierający rearanżację genów w obrębie sekwencji podobnych do tych, które kodują neurotoksyny u lasceczek z gatunku *Clostridium botulinum* (Brunt *et al.* 2018).

3.11. Zewnątrzkomórkowe nadtlarki

Zewnątrzkomórkowe nadtlarki zaliczane są do grupy czynników zjadliwości *Enterococcus* spp. ułatwiających niszczenie tkanek gospodarza, głównie u pacjentów z bakteriami o tej etiologii. Wpływają one znacząco na uogólnienie zakażenia (Huycke *et al.* 1996). Stwierdza się, że możliwość wytwarzania reaktywnych form tlenu znacznie częściej notuje się wśród szczepów *E. faecalis* w porównaniu do *E. faecium*. Zdolność ich wytwarzania zewnątrzkomórkowo ułatwia przedstawicielom rodzaju *Enterococcus* przeżycie wewnątrz komórek żernych. Ponadto reaktywne formy tlenu uszkadzają nabłonek przewodu pokarmowego, ułatwiając bakteriom przełamanie bariery jelitowej. Ważnym spostrzeżeniem poczynionym podczas badań w tym zakresie było stwierdzenie różnic w poziomie wytwarzania nadtlarków w grupach szczepów o różnym pochodzeniu. Wyniki badań prowadzonych przez Huycke i wsp. (Huycke *et al.* 1996) wykazały, że poziom wytwarzania zewnątrzkomórkowych nadtlarków był o 60% wyższy w przypadku szczepów *Enterococcus* spp. izolowanych z bakteriami w porównaniu ze szczepami pozyskanymi z przypadków kolonizacji pacjentów.

Ciekawym spostrzeżeniem jest również powiązanie aktywności bakteryjnych nadtlarków z procesem kancerogenezy. Postuluje się bowiem, że zdolność wytwarzania nadtlarków przez szczepy z rodzaju *Enterococcus* jest związana z indukcją lub progresją procesów nowotworowych w komórkach nabłonkowych jelita grubego (Huycke *et al.* 2002, Rezasoltani *et al.* 2018, Wang *et al.* 2017).

4. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* ze względu na powszechne występowanie i zdolność do utrzymywania się w środowisku szpitalnym, są coraz częstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń, również inwazyjnych. Ponadto zwiększa się rezerwuuar szczepów MDR oraz posiadających szereg czynników wirulencji. Szczepy o takim fenotypie izolowane są nie tylko od pacjentów szpitalnych, ale również od zwierząt domowych (Dotto *et al.* 2018), gospodarskich (Vignaroli *et al.* 2011), produktów spożywczych, jak i ze środowiska naturalnego (Sánchez Valenzuela *et al.* 2012). Do takiej sytuacji przyczyniły się szeroko stosowane antybiotyki w praktyce klinicznej, jak i w sektorze pozamedycznym (głównie weterynaryjnym i rolniczym).

Czynniki wirulencji umożliwiają szczepom *Enterococcus* spp. wywoływanie zakażeń poprzez wspomaganie adhezji, kolonizacji i inwazji tkanek gospodarza, modulację odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz wytwarzanie enzymów i toksyn, które zwiększają

ciężkość przebiegu zakażenia (Jett *et al.* 1994, Strateva *et al.* 2016). Czynnikiem mającym wpływ na proces kolonizacji jest zewnątrzkomórkowe białko powierzchniowe Esp. Translokację z miejsca kolonizacji do innych narządów umożliwia substancja agregująca, a czynnikami rozprzestrzeniającymi są hialuronidaza i żelatynaza. Znaczenie poszczególnych czynników wirulencji *Enterococcus* spp. w patogenezie wywoływanych zakażeń jest nadal przedmiotem wielu badań, gdyż uzyskiwane wyniki nie zawsze są jednoznaczne. Najnowsze badania nad genami kodującymi czynniki wirulencji wskazują, że na wzrost ekspresji wielu z nich (*esp*, *gelE*, *cylL*, *sprE*) wpływa zarówno stres osmotyczny, jak i wysokie ciśnienie, co prowadzi do konkluzji, że nawet powszechne w przemyśle metody przetwórstwa żywności mogą indukować zmiany w profilu wirulencji szczepów środowiskowych z rodzaju *Enterococcus* (Zarzecka *et al.* 2022).

Wiele czynników wirulencji występujących u przedstawicieli *Enterococcus* spp. ma potencjalny wpływ na tworzenie biofilmu, jednak zależność między ich występowaniem, a zdolnością tworzenia biofilmu nie została w pełni ustalona. Sugeruje się, że tworzenie biofilmu przez *Enterococcus* spp. jest złożonym procesem, wymagającym współdziałania wielu białek. Biofilm, mimo, iż nie zawsze jest czynnikiem promującym wywołanie przez bakterie zakażenia, przyczynia się do wzrostu patogenności bakterii również poprzez zwiększanie oporności na antybiotyki, środki dezynfekcyjne i warunki środowiska.

Bakterie *Enterococcus* spp. jeszcze kilka dekad temu nie były uznawane za chorobotwórcze, obecnie stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń, w tym tych o ciężkim przebiegu, oraz stanowią istotny problem medyczny, terapeutyczny i epidemiologiczny. Stąd, potrzebne jest lepsze zrozumienie zdolności gatunków z rodzaju *Enterococcus* do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych, ich mechanizmów oporności, a także cech wirulencji, aby w pełni zrozumieć złożoność procesów przyczyniających się do wywoływania przez nie zakażeń.

Piśmiennictwo

1. Afonina I., Lim X.N., Tan R., Kline K.A.: Planktonic Interference and Biofilm Alliance between Aggregation Substance and Endocarditis and Biofilm-Associated Pili in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, **200**, e00361-18 (2018)
2. Akbari Aghdam M., Soroush Barhaghi M.H., Aghazadeh M., Jafari F., Beomide Hagh M., Haghdoost M., Memar M.Y., Ahangarzadeh Rezaee M., Samadi Kafil H.: Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **63**, 55–59 (2017)
3. Ali L., Goraya M.U., Arafat Y., Ajmal M., Chen J.L., Yu D.: Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*:

- Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, **18**, E960 (2017)
4. Ali S.A., Bin-Asif H., Hasan K.A., Rehman M., Abbasi A.: Molecular assessment of virulence determinants, hospital associated marker (IS16gene) and prevalence of antibiotic resistance in soil borne *Enterococcus* species. *Microbial Pathogenesis*, **105**, 298–306 (2017)
 5. Archimbaud C., Shankar N., Forestier C., Baghdayan A., Gilmore M.S., Charbonné F., Joly B.: In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol*, **153**, 75–80 (2002)
 6. Arias C.A., Murray B.E.: The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*, **10**, 266–278 (2012)
 7. Arias C.A., Panesso D., Singh K.V., Rice L.B., Murray B.E.: Cotransfer of Antibiotic Resistance Genes and a hlyEfm-Containing Virulence Plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 4240–4246 (2009)
 8. Arshadi M., Mahmoudi M., Motahar M.S., Soltani S., Pourmand M.R.: Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance Patterns of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Different Sources in Southwest Iran. *Iran J Public Health*, **47**, 264–272 (2018)
 9. Barbosa-Ribeiro M., De-Jesus-Soares A., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Almeida J.F.A., Gomes B.P.F.A.: Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod*, **42**, 1022–1028 (2016)
 10. Basinger S.F., Jackson R.W.: Bacteriocin (hemolysin) of *Streptococcus zymogenes*. *J Bacteriol*, **96**, 1895–1902 (1968)
 11. Beomidehagh M., Rezaee M.A., Ganbarov K., Jafari F., Hasani A., Alizadeh N., Tanomand A., Kafil H.S.: Effect of acidic and alkali shocks on expression of efaA gene in *Enterococcus faecalis*, isolated from root canal infection. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **64**, 1–5 (2018)
 12. Biswas P.P., Dey S., Sen A., Adhikari L.: Molecular Characterization of Virulence Genes in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Sensitive *Enterococci*. *J Glob Infect Dis*, **8**, 16–24 (2016)
 13. Brunt J., Carter A.T., Stringer S.C., Peck M.W.: Identification of a novel botulinum neurotoxin gene cluster in *Enterococcus*. *FEBS Lett*, **592**, 310–317 (2018)
 14. Byers K.E., Durbin L.J., Simonton B.M., Anglim A.M., Adal K.A., Farr B.M.: Disinfection of hospital rooms contaminated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **19**, 261–264 (1998)
 15. Carvalho M. da G., Teixeira L.M.: Hemagglutination properties of *Enterococcus*. *Curr Microbiol*, **30**, 265–268 (1995)
 16. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT – Food Science and Technology*, **C**, 670–676 (2017)
 17. Choi S.H., Lee S.O., Kim T.H., Chung J.W., Choo E.J., Kwak Y.G., Kim M.N., Kim Y.S., Woo J.H., Ryu J., Kim N.J.: Clinical Features and Outcomes of Bacteremia Caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 Cases. *Clinical Infectious Diseases*, **38**, 53–61 (2004)
 18. Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., Zervos M.J.: Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, **37**, 2474–2477 (1993)
 19. Colomer-Winter C., Flores-Mireles A.L., Baker S.P., Frank K.L., Lynch A.J.L., Hultgren S.J., Kitten T., Lemos J.A.: Manganese acquisition is essential for virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLOS Pathogens*, **14**, e1007102 (2018)
 20. Coque T.M., Patterson J.E., Steckelberg J.M., Murray B.E.: Incidence of Hemolysin, Gelatinase, and Aggregation Substance among *Enterococci* Isolated from Patients with Endocarditis and Other Infections and from Feces of Hospitalized and Community-Based Persons. *The Journal of Infectious Diseases*, **171**, 1223–1229 (1995)
 21. De Vuyst L., Foulquié Moreno M.R., Revets H.: Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol*, **84**, 299–318 (2003)
 22. Dong S.H., Tang W., Lukk T., Yu Y., Nair S.K., van der Donk W.A.: The enterococcal cytolysin synthetase has an unanticipated lipid kinase fold. *Elife*, **4**, (2015)
 23. Dotto G., Berlanda M., Pasotto D., Mondin A., Zambotto G., Menandro M.L.: Pets as potential carriers of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* of significance to public health. *New Microbiol*, **41**, 168–172 (2018)
 24. Drees M., Snyderman D.R., Schmid C.H., Barefoot L., Hansjosten K., Vue P.M., Cronin M., Nasraway S.A., Golan Y.: Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*, **46**, 678–685 (2008)
 25. Duh R.W., Singh K.V., Malathum K., Murray B.E.: In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist*, **7**, 39–46 (2001)
 26. Dworniczek E., Piwowarczyk J., Bania J., Kowalska-Krochmal B., Wałęcka E., Seniuk A., Dolna I., Gościński G.: *Enterococcus* in wound infections: virulence and antimicrobial resistance. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **59**, 263–269 (2012)
 27. Dworniczek E., Piwowarczyk J., Seniuk A., Gościński G.: *Enterococcus* virulence and susceptibility to photodynamic therapy of clinical isolates from Lower Silesia, Poland. *Scand J Infect Dis*, **46**, 846–853 (2014)
 28. Eaton T.J., Gasson M.J.: Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 1628–1635 (2001)
 29. Elmali M., Can H.: The prevalence, vancomycin resistance and virulence gene profiles of *Enterococcus* species recovered from different foods of animal origin. *Veterinarski arhiv*, **88**, 111–124 (2018)
 30. Elsner H.A., Sobottka I., Mack D., Claussen M., Laufs R., Wirth R.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **19**, 39–42 (2000)
 31. Facklam R., Elliott J.A.: Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **8**, 479–495 (1995)
 32. Fan W., Huang Z., Fan B.: Effects of prolonged exposure to moderate static magnetic field and its synergistic effects with alkaline pH on *Enterococcus faecalis*. *Microb Pathog*, **115**, 117–122 (2018)
 33. de Fátima Silva Lopes M., Ribeiro T., Abrantes M., Figueiredo Marques J.J., Tenreiro R., Crespo M.T.B.: Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol*, **103**, 191–198 (2005)
 34. Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, **155**, 1749–1757 (2009)
 35. Flamm R.K., Farrell D.J., Mendes R.E., Ross J.E., Sader H.S., Jones R.N.: LEADER surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis*, **74**, 54–61 (2012)
 36. Freitas A.R., Novais C., Duarte B., Pereira A.P., Coque T.M., Peixe L.: High rates of colonisation by ampicillin-resistant

- enterococci in residents of long-term care facilities in Porto, Portugal. *Int J Antimicrob Agents*, **51**, 503–507 (2018)
37. Freitas A.R., Tedim A.P., Novais C., Lanza V.F., Peixe L.: Comparative genomics of global *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* uncovers a common chromosomal hotspot for *optrA* acquisition within a diversity of core and accessory genomes. *Microb Genom*, **6**, e000350 (2020)
 38. Geraldés C., Tavares L., Gil S., Oliveira M.: *Enterococcus* Virulence and Resistant Traits Associated with Its Permanence in the Hospital Environment. *Antibiotics*, **11**, 857 (2022)
 39. Ghameshlouei S., Ahrabi N.Z., SarveAhrabi Y.: In Vitro and In Silico Evaluation of Biological Activity of a New Series of Oxadiazole Compounds Against *Esp* Gene Expression in *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Gene Cell Tissue*, **8**, (2021)
 40. Ghosh A., Dowd S.E., Zurek L.: Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One*, **6**, e22451 (2011)
 41. Gilmore M.S., Lebreton F., van Schaik W.: Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multi-drug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol*, **16**, 10–16 (2013)
 42. Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 163–171 (2002)
 43. Guner M.B., Eldeniz A.U.: The effect of gelatinase production of *Enterococcus faecalis* on adhesion to dentin after irrigation with various endodontic irrigants. *Acta Biomater Odontol Scand*, **2**, 144–149 (2016)
 44. Guzmán C.A., Pruzzo C., LiPira G., Calegari L.: Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun*, **57**, 1834–1838 (1989)
 45. Hancock L.E., Perego M.: The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol*, **186**, 5629–5639 (2004)
 46. Hashem Y.A., Abdelrahman K.A., Aziz R.K.: Phenotype-Genotype Correlations and Distribution of Key Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect Drug Resist*, **14**, 1713–1723 (2021)
 47. Heidari H., Emaneini M., Dabiri H., Jabalameli F.: Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of *Enterococcal* strains isolated from burn patients. *Microb Pathog*, **90**, 93–97 (2016)
 48. Heikens E., Singh K.V., Jacques-Palaz K.D., van Luit-Asbroek M., Oostdijk E.A.N., Bonten M.J.M., Murray B.E., Willems R.J.L.: Contribution of the enterococcal surface protein *Esp* to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect*, **13**, 1185–1190 (2011)
 49. Huycke M.M., Joyce W., Wack M.F.: Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, **173**, 743–746 (1996)
 50. Huycke M.M., Sahn D.F., Gilmore M.S.: Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, **4**, 239–249 (1998)
 51. Huycke M.M., Spiegel C.A., Gilmore M.S.: Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**, 1626–1634 (1991)
 52. Huycke M.M., Abrams V., Moore D.R.: *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, **23**, 529–536 (2002)
 53. Hynes W.L., Walton S.L.: Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **183**, 201–207 (2000)
 54. Izumi E., Domingues Pires P., Bittencourt de Marques E., Suzart S.: Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different human clinical sources. *Res Microbiol*, **156**, 583–587 (2005)
 55. Jensen L.B., Garcia-Migura L., Valenzuela A.J.S., Løhr M., Hasman H., Aarestrup F.M.: A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods*, **80**, 25–43 (2010)
 56. Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S.: Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*, **7**, 462–478 (1994)
 57. Jovanović M., Tošić T., Jovanović S., Stošović R., Stevanović G., Velebit B., Zervos M.J.: Presence of the *esp* gene in *Enterococcus faecium* derived from oropharyngeal microbiota of haematology patients. *Arch Oral Biol*, **88**, 54–59 (2018)
 58. Kafil H.S., Mobarez A.M., Moghadam M.F., Hashemi Z. Sadat, Yousefi M.: Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Pathogenesis*, **92**, 30–35 (2016)
 59. Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **15**, 308–320 (2004)
 60. Kayser F.H.: Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol*, **88**, 255–262 (2003)
 61. Komiyama E.Y., Lepesqueur L.S.S., Yassuda C.G., Samaranyake L.P., Parahitiyawa N.B., Balducci I., Koga-Ito C.Y.: *Enterococcus* Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS One*, **11**, e0163001 (2016)
 62. Kowalska-Krochmal B., Dworniczek E., Dolna L., Bania J., Wałęcka E., Seniuk A., Gościński G.: Resistance patterns and occurrence of virulence determinants among GRE strains in southwestern Poland. *Adv Med Sci*, **56**, 304–310 (2011)
 63. Kropec A., Sava I.G., Vonend C., Sakinc T., Grohmann E., Huebner J.: Identification of *SagA* as a novel vaccine target for the prevention of *Enterococcus faecium* infections. *Microbiology*, **157**, 3429–3434 (2011)
 64. LaGrow A.L., Coburn P.S., Miller F.C., Land C., Parkunan S.M., Luk B.T., Gao W., Zhang L., Callegan M.C.: A Novel Biomimetic Nanosponge Protects the Retina from the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *mSphere*, **2**, e00335-17 (2017)
 65. Leendertse M., Heikens E., Wijnands L.M., van Luit-Asbroek M., Teske G.J.D., Roelofs J.J.T.H., Bonten M.J.M., van der Poll T., Willems R.J.L.: Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis*, **200**, 1162–1165 (2009)
 66. Li F., Wang Y., Sun L., Wang X.: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* pneumonia in a uremic patient on hemodialysis: a case report and review of the literature. *BMC Infect Dis*, **20**, 167 (2020)
 67. Maccallum W.G., Hastings T.W.: A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov.spec.), with a description of the microorganisms. *J Exp Med*, **4**, 521–534 (1988)
 68. Manias D.A., Dunny G.M.: Expression of Adhesive Pili and the Collagen-Binding Adhesin *Ace* Is Activated by *ArgR* Family Transcription Factors in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, **200**, e00269-18 (2018)
 69. Mishra A.K., Ghosh A.R.: Characterization of Functional, Safety, and Probiotic Properties of *Enterococcus faecalis* AG5 Isolated From Wistar Rat, Demonstrating Adherence to HCT 116 Cells and Gastrointestinal Survivability. *Probiotics Antimicrob Proteins*, **10**, 435–445 (2018)
 70. Murray B.E.: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, **3**, 46–65 (1990)
 71. Nakayama J., Cao Y., Horii T., Sakuda S., Akkermans A.D., de Vos W.M., Nagasawa H.: Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*, **41**, 145–154 (2001)

72. Nakayama J., Chen S., Oyama N., Nishiguchi K., Azab E.A., Tanaka E., Kariyama R., Sonomoto K.: Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: the small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal agrd. *J Bacteriol*, **188**, 8321–8326 (2006)
73. Nakayama J., Kariyama R., Kumon H.: Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding fsr genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 3152–3155 (2002)
74. Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E.: Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol*, **47**, 1733–1747 (2003)
75. Nasaj M., Mousavi S.M., Hosseini S.M., Arabestani M.R.: Prevalence of Virulence Factors and Vancomycin-resistant Genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* Isolated from Clinical Specimens. *Iran J Public Health*, **45**, 806–813 (2016)
76. Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Stączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig Med Dosw*, **67**, 1027–1033 (2013)
77. Paganelli F.L., de Been M., Braat J.C., Hoogenboezem T., Vink C., Bayjanov J., Rogers M.R.C., Huebner J., Bonten M.J.M., Willems R.J.L., Leavis H.L.: Distinct SagA from Hospital-Associated Clade A1 *Enterococcus faecium* Strains Contributes to Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol*, **81**, 6873–6882 (2015)
78. Palmer K.L., Kos V.N., Gilmore M.S.: Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, **13**, 632–639 (2010)
79. Park S.Y., Kim K.M., Lee J.H., Seo S.J., Lee I.H.: Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun*, **75**, 1861–1869 (2007)
80. Pedicord V.A., Lockhart A.A.K., Rangan K.J., Craig J.W., Loschko J., Rogoz A., Hang H.C., Mucida D.: Exploiting a host-commensal interaction to promote intestinal barrier function and enteric pathogen tolerance. *Sci Immunol*, **1**, eaai7732 (2016)
81. Pillai S.K., Sakoulas G., Gold H.S., Wennersten C., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Inouye R.T.: Prevalence of the fsr Locus in *Enterococcus faecalis* Infections. *J Clin Microbiol*, **40**, 2651–2652 (2002)
82. Przybylski M.: Vancomycin-resistant enterococci. I. Pathogenicity. *Postepy Mikrobiologii*, **46**, 301–316 (2007)
83. Qin X., Singh K.V., Weinstock G.M., Murray B.E.: Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, **68**, 2579–2586 (2000)
84. Rakita R.M., Vanek N.N., Jacques-Palaz K., Mee M., Mariscalco M.M., Dunny G.M., Snuggs M., Van Winkle W.B., Simon S.I.: *Enterococcus faecalis* Bearing Aggregation Substance Is Resistant to Killing by Human Neutrophils despite Phagocytosis and Neutrophil Activation. *Infect Immun*, **67**, 6067–6075 (1999)
85. Rangan K.J., Pedicord V.A., Wang Y.C., Kim B., Lu Y., Shaham S., Mucida D., Hang H.C.: A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens. *Science*, **353**, 1434–1437 (2016)
86. Reid K.C., Cockerill F.R. III, Patel R.: Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. *Clinical Infectious Diseases*, **32**, 1540–1546 (2001)
87. Rezasoltani S., Asadzadeh Aghdaei H., Dabiri H., Akhavan Sepahi A., Modarressi M.H., Nazemalhosseini Mojarad E.: The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb Pathog*, **124**, 244–249 (2018)
88. Rice L.B., Carias L., Rudin S., Vael C., Goossens H., Konstabel C., Klare I., Nallapareddy S.R., Huang W., Murray B.E.: A potential virulence gene, *hlyEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis*, **187**, 508–512 (2003)
89. Rich R.L., Kreikemeyer B., Owens R.T., LaBrenz S., Narayana S.V., Weinstock G.M., Murray B.E., Höök M.: Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*, **274**, 26939–26945 (1999)
90. Rosvoll T.C.S., Pedersen T., Sletvold H., Johnsen P.J., Sollid J.E., Simonsen G.S., Jensen L.B., Nielsen K.M., Sundsfjord A.: PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **58**, 254–268 (2010)
91. Salvatore S., Salvatore S., Cattoni E., Siesto G., Serati M., Sorice P., Torella M.: Urinary tract infections in women. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, **156**, 131–136 (2011)
92. Sánchez Valenzuela A., Benomar N., Abriouel H., Pérez Pulido R., Martínez Cañamero M., Gálvez A.: Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **101**, 701–711 (2012)
93. Sava I.G., Heikens E., Huebner J.: Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*, **16**, 533–540 (2010)
94. Savini V., Manna A., D'Antonio F., Talia M., Catavittello C., Balbinot A., Febbo F., Carlino D., Fioritoni F., Di Bonaventura G., D'Antonio D.: First report of vaginal infection caused by *Enterococcus raffinosus*. *Journal of Medical Microbiology*, **57**, 672–673 (2008)
95. Schlievert P.M., Gahr P.J., Assimacopoulos A.P., Dinges M.M., Stoehr J.A., Harmala J.W., Hirt H., Dunny G.M.: Aggregation and Binding Substances Enhance Pathogenicity in Rabbit Models of *Enterococcus faecalis* Endocarditis. *Infect Immun*, **66**, 218–223 (1998)
96. Semedo T., Almeida Santos M., Martins P., Silva Lopes M.F., Figueiredo Marques J.J., Tenreiro R., Barreto Crespo M.T.: Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, **41**, 2569–2576 (2003)
97. Semedo T., Santos M.A., Lopes M.F.S., Figueiredo Marques J.J., Barreto Crespo M.T., Tenreiro R.: Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*, **26**, 13–22 (2003)
98. Shankar N., Lockett C.V., Baghdayan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S., Johnson D.E.: Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*, **69**, 4366–4372 (2001)
99. Shankar N., Baghdayan A.S., Gilmore M.S.: Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, **417**, 746–750 (2002)
100. Shankar N., Coburn P., Pillar C., Haas W., Gilmore M.: Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol*, **293**, 609–618 (2004)
101. Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lindahl G., Gilmore M.S.: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, **67**, 193–200 (1999)
102. Shiono A., Ike Y.: Isolation of *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates That Efficiently Adhere to Human Bladder Carcinoma

- T24 Cells and Inhibition of Adhesion by Fibronectin and Trypsin Treatment. *Infect Immun*, **67**, 1585–1592 (1999)
103. Sienko A., Wieczorek P., Majewski P., Ojdana D., Wieczorek A., Olszańska D., Tryniszewska E.: Comparison of antibiotic resistance and virulence between biofilm-producing and non-producing clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Acta Biochim Pol*, **62**, 859–866 (2015)
 104. Sillanpää J., Nallapareddy S.R., Prakash V.P., Qin X., Höök M., Weinstock G.M., Murray B.E.: Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology*, **154**, 3199–3211 (2008)
 105. Singh K.V., Pinkston K.L., Gao P., Harvey B.R., Murray B.E.: Anti-Ace monoclonal antibody reduces *Enterococcus faecalis* aortic valve infection in a rat infective endocarditis model. *Pathog Dis*, **76**, (2018)
 106. Soheili S., Ghafourian S., Sekawi Z., Neela V., Sadeghifard N., Ramli R., Hamat R.A.: Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Scientific World Journal*, 623174 (2014)
 107. Somarajan S.R., Roh J.H., Singh K.V., Weinstock G.M., Murray B.E.: CcpA is important for growth and virulence of *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, **82**, 3580–3587 (2014)
 108. Stehr F., Kretschmar M., Kröger C., Hube B., Schäfer W.: Microbial lipases as virulence factor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22**, 347–355 (2003)
 109. Strateva T., Atanasova D., Savov E., Petrova G., Mitov I.: Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis*, **20**, 127–133 (2016)
 110. Strzelecki J., Hryniewicz W., Sadowy E.: Gelatinase-associated phenotypes and genotypes among clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland. *Pol J Microbiol*, **60**, 287–292 (2011)
 111. Su Y.A., Sulavik M.C., He P., Makinen K.K., Makinen P.L., Fiedler S., Wirth R., Clewell D.B.: Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun*, **59**, 415–420 (1991)
 112. Süßmuth S.D., Muscholl-Silberhorn A., Wirth R., Susa M., Marre R., Rozdzinski E.: Aggregation Substance Promotes Adherence, Phagocytosis, and Intracellular Survival of *Enterococcus faecalis* within Human Macrophages and Suppresses Respiratory Burst. *Infect Immun*, **68**, 4900–4906 (2000)
 113. Śledzińska A., Samet A., Gładysz A.: Enterokoki jako bakterie zakażeń szpitalnych. Continuo, Wrocław (2009)
 114. Taglialegna A., Matilla-Cuenca L., Dorado-Morales P., Navarro S., Ventura S., Garnett J.A., Lasa I., Valle J.: The biofilm-associated surface protein Esp of *Enterococcus faecalis* forms amyloid-like fibers. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **6**, 15 (2020)
 115. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N.: Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2622–2636 (2003)
 116. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N.: The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, **187**, 6213–6222 (2005)
 117. Teng F., Kawalec M., Weinstock G.M., Hryniewicz W., Murray B.E.: An *Enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth. *Infect Immun*, **71**, 5033–5041 (2003)
 118. Thomas V.C., Thurlow L.R., Boyle D., Hancock L.E.: Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development. *J Bacteriol*, **190**, 5690–5698 (2008)
 119. Toc D.A., Pandrea S.L., Botan A., Mihaila R.M., Costache C.A., Colosi I.A., Junie L.M.: *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* Isolated from a Tertiary Care Hospital in Romania Retrospective Study and Brief Review. *Biology*, **11**, 598 (2022)
 120. Todd E.W.: A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal hæmolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **39**, 299–321 (1934)
 121. Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penadés J.R., Lasa I.: The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 4538–4545 (2001)
 122. Top J., Paganelli F.L., Zhang X., van Schaik W., Leavis H.L., van Luit-Asbroek M., van der Poll T., Leendertse M., Bonten M.J.M., Willems R.J.L.: The *Enterococcus faecium* enterococcal biofilm regulator, EbrB, regulates the esp operon and is implicated in biofilm formation and intestinal colonization. *PLoS One*, **8**, e65224 (2013)
 123. Van Tyne D., Martin M.J., Gilmore M.S.: Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, **5**, 895–911 (2013)
 124. Van Wamel W.J.B., Hendrickx A.P.A., Bonten M.J.M., Top J., Posthuma G., Willems R.J.L.: Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun*, **75**, 924–931 (2007)
 125. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D., Goossens H.: Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, **42**, 4473–4479 (2004)
 126. Vergis E.N., Shankar N., Chow J.W., Hayden M.K., Snyderman D.R., Zervos M.J., Linden P.K., Wagener M.M., Muder R.R.: Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis*, **35**, 570–575 (2002)
 127. Vickerman M.M., Flannagan S.E., Jesionowski A.M., Brossard K.A., Clewell D.B., Sedgley C.M.: A genetic determinant in *Streptococcus gordonii* Challis encodes a peptide with activity similar to that of enterococcal sex pheromone cAM373, which facilitates intergeneric DNA transfer. *J Bacteriol*, **192**, 2535–2545 (2010)
 128. Vignaroli C., Zandri G., Aquilanti L., Pasquaroli S., Biavasco F.: Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*, **62**, 1438–1447 (2011)
 129. Vijaykrishnan R., Rapose A.: Fatal *Enterococcus durans* aortic valve endocarditis: a case report and review of the literature. *BMJ Case Rep*, bcr0220125855 (2012)
 130. Waar K., Muscholl-Silberhorn A.B., Willems R.J.L., Slooff M.J.H., Harmsen H.J.M., Degener J.E.: Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J Infect Dis*, **185**, 1121–1127 (2002)
 131. Wang X., Yang Y., Huycke M.M.: Commensal-infected macrophages induce dedifferentiation and reprogramming of epithelial cells during colorectal carcinogenesis. *Oncotarget*, **8**, 102176–102190 (2017)
 132. Waters C.M., Antiporta M.H., Murray B.E., Dunne G.M.: Role of the *Enterococcus faecalis* GelE Protease in Determination of

- Cellular Chain Length, Supernatant Pheromone Levels, and Degradation of Fibrin and Misfolded Surface Proteins. *J Bacteriol*, **185**, 3613–3623 (2003)
133. Willems R.J., Homan W., Top J., van Santen-Verheuevel M., Tribe D., Manzioros X., Gaillard C., Vandenbroucke-Grauls C.M., Mascini E.M., van Kregten E., van Embden J.D., Bonten M.J.: Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*, **357**, 853–855 (2001)
134. Wojnicz D., Tichaczek-Goska D., Korzekwa K., Kicia M., Hendrich A.B.: Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections. *Int J Food Sci Nutr*, **67**, 1005–1016 (2016)
135. Wróblewska J., Kozusko S., Gospodarek E.: The evaluation of lipolytic activity of strains of *Enterococcus faecium*. *Med Dosw Mikrobiol*, **65**, 87–91 (2013)
136. Yoshino Y.: *Enterococcus casseliflavus* Infection: A Review of Clinical Features and Treatment. *Infection and Drug Resistance*, **16**, 363–368 (2023)
137. Zarzecka U., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W.: Effects of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among *Enterococcus* spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiology*, **102**, 103900 (2022)
138. Zeana C., Kubin C.J., Della-Latta P., Hammer S.M.: Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Meningitis Successfully Managed with Linezolid: Case Report and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, **33**, 477–482 (2001)
139. Zheng J.X., Wu Y., Lin Z.W., Pu Z.Y., Yao W.M., Chen Z., Li D.Y., Deng Q.W., Qu D., Yu Z.J.: Characteristics of and Virulence Factors Associated with Biofilm Formation in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in China. *Front Microbiol*, **8**, 2338 (2017)
140. Ziarno M.: Bakterie rodzaju *Enterococcus* w mleku i przetworach mleczarskich. *Medycyna Weterynaryjna*, **62**, 145–148 (2006)
141. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016> (14.7.2021); European Centre for Disease Prevention and Control.

GALLERIA MELLONELLA LARVAE AS AN *IN VITRO* MODEL FOR TESTING MICROBIAL PATHOGENICITY

Dawid Gniazdo, Wanesa Sasal, Aleksandra Omelaniuk, Weronika Brudz, Wiesław Kaca*

Department of Microbiology, Institute of Biology, Jan Kochanowski University, Kielce, Poland

Submitted in July 2023, accepted in September 2023

Abstract: The larvae of the insect *Galleria mellonella* have gained wide acceptance as an *in vivo* model for the study of virulence in Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. Importantly, *G. mellonella* offers an alternative, low-cost, and ethically acceptable method of assessing pathogens. These insects have a number of advantages, including ease of breeding, a rapid developmental cycle, low maintenance costs, and ease of experimental manipulation. Most importantly, *G. mellonella* larvae have a complete immune system and a nonspecific immune response similar to that of humans, making them a valuable model for studying pathogen-host interactions. Furthermore, using this model, it is possible to test the efficacy of various chemical compounds or natural substances that show antimicrobial activity. In this literature review, we provide a comprehensive overview of recent studies of the use of *G. mellonella* in virulence analyses and as a platform for testing the efficacy of new drugs.

1. Introduction. 2. Immune system of *G. mellonella*. 3. *Galleria mellonella* humoral immune response. 4. *Galleria mellonella* larval AMPs. 5. Insect metalloproteinase inhibitor (IMPI) and lysozymes. 6. Melanization. 7. Selected studies of Gram-negative bacterial virulence in the *G. mellonella* larval model. 8. *Galleria mellonella* larva as a model organism in which to study Gram-positive bacteria. 9. *Galleria mellonella* larvae a model organism in which to study fungal pathogenicity. 10. Efficacy of antibacterial and antifungal compounds tested in *G. mellonella* larvae. 11. Conclusion.

Keywords: *Galleria mellonella*, microbial pathogenesis, model

1. Introduction

Galleria mellonella is a cosmopolitan insect species that occurs on all continents except Antarctica (Kwadha *et al.* 2017; Wojda *et al.* 2020). Because it feeds on beeswax, it is considered a pest. As a holometabolous species, it is characterized by the four phases in its life cycle: egg, larva, pupa and adult or moth stage (Fasasi and Malaka 2006; Kwadha *et al.* 2017; Pereira *et al.* 2018; Piatek *et al.* 2021). The larval form has been used as a model organism in which to study host-pathogen relationships, to test new drugs, and to identify virulence factors of bacterial pathogens (Pereira *et al.* 2018; Piatek *et al.* 2021; Chen and Keddie 2021; Ménard *et al.* 2021).

The *G. mellonella* larval model is becoming ever more popular, as reflected in the increasing number of incoming publications containing the term “*Galleria mellonella*” cited on PubMed (61 publications in 2010

compared with 348 in 2022). The insects used can be divided into two classes. The so-called ‘research’ class is reared without hormones or antibiotics and has a standardized microbiome, whereas the ‘bait’ class is commercially available and is used as bait in fisheries or as pet food (Kwadha *et al.* 2017; Allonsius *et al.* 2019; Wojda *et al.* 2020). The larvae range in size from 1 to 3 cm, which facilitates the injection of compounds and the recovery of organs, tissues and hemolymph for further study (Fasasi and Malaka 2006; Kwadha *et al.* 2017). *G. mellonella* is characterized by a short life cycle of approximately 5 weeks from the egg to the adult form (Fasasi and Malaka 2006; Ramarao and Lereclus 2012; Firacative *et al.* 2020). Larvae are faster growth, cheaper, and easier to house over model mice. Moreover, *G. mellonella* larvae do not have nociceptors, so *in vitro* studies can be undertaken without the approval of a bioethics committee (Ménard *et al.* 2021).

* Corresponding Author: Wiesław Kaca, Department of Microbiology, Institute of Biology, Jan Kochanowski University, ul. Uniwersytecka 7, Kielce, Poland; e-mail: wieslaw.kaca@ujk.edu.pl

© 2023 Dawid Gniazdo et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Cite as:

Galleria mellonella larvae as an *in vitro* model for testing microbial pathogenicity, Dawid Gniazdo et al., ADV MICROBIOL-NY, 2023, 62, 3/4, <https://doi.org/10.2478/am-2023-0015>

Table I.
Scoring system for *G. mellonella* larvae, modified from
(Loh *et al.* 2013).

Category	Description	Score
Activity	No activity	0
	Active	3
Melanization	Complete melanization	0
	Single dark spots on larvae	2
	No melanization	4

It is noteworthy that the entire genome of the insect has been sequenced, which opens the possibility of its use in research based on genetic modification (Lange *et al.* 2018). Another major advantage of the organism is the insect's immune system, specifically its humoral response. This, combined with the fact that *G. mellonella* larvae can be raised at 37°C, allows the temperature conditions in the human body to be simulated, affording an excellent model organism that is capable of simulating infections by human pathogens (Desalermos *et al.* 2012; Sheehan *et al.* 2018).

Aims of presented review are to inform potential *G. mellonella* larvae model users about exemplars of Gram-negative, Gram-positive, fungus pathogenicity and antimicrobials studies. Basic information about *G. mellonella* immune system are provided.

A scoring system based on several health indices is applicable in studies of human pathogens in *G. mellonella* larvae (Table I) (Loh *et al.* 2013).

2. Immune system of *G. mellonella*

The nonspecific immune responses of invertebrates protect them from adverse external factors and pathogens. Studies of the genome of *G. mellonella* larvae have shown that their humoral immunity shares similarities with the human humoral system, which involves pathogen recognition patterns and the body's defense responses. The immune system of *G. mellonella* consists of the cuticle and the cellular and humoral immune responses. The cuticle is the organism's first line of defense. It is composed of chitin, matrix proteins, and lipids, and its main function is to protect the organism against the entry of pathogens. If the structure of the cuticle is damaged, the cellular and humoral defense factors of the organism are activated (Tao *et al.* 2021). The cellular immune response is characterized by the involvement of hemocytes, which are phagocytic cells. Hemocytes occur in the insect hemolymph, which has a similar function to vertebrate blood, and are involved in phagocytosis, encapsulation, and nodulation. There are six types of hemocytes in *G. mellonella* larvae: granulocytes, coagulocytes, plasmocytes, spher-

ulocytes, oenocytoids, and prohemocytes. Granulocytes first attack any microorganism that has entered the body, after which plasmocytes trigger cell layering, resulting in the encapsulation and nodulation of the pathogen. The mechanism of phagocytosis is similar to the cellular immune response of human blood cells (Tsai *et al.* 2016). The humoral immune response is mainly regulated by soluble effectors, including melanin, opsonins, and antimicrobial peptides (AMPs), which mediate melanization and hemolymph coagulation (Tao *et al.* 2021).

3. *G. mellonella* humoral immune response

G. mellonella produces plasma proteins that function in opsonization, and recognition, and bind to microbial structures. Apolipoprotein III (apoLp-III) is one of such proteins, and plays a key role in the innate immune response of invertebrates. It has high affinity for bacterial lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA), and shares high homology with the mammalian protein E (apoE), responsible for phagocytosis, the detoxification of LPS, and the release of nitric oxide (NO) from thrombocytes. ApoLp-III binds to fungal conidia and β -1,3-glucans to facilitate cell encapsulation. The protein has other important functions in the immune response, including in stimulating hemocytes to secrete superoxide, enhancing the antimicrobial effect of hemolymph, and stimulating the activity of cercopin, another AMP. ApoLp-III influences the permeabilization of the bacterial cell membrane, particularly of Gram-negative bacteria, by interacting with the lysozyme found in *G. mellonella* larvae (Tsai *et al.* 2016).

4. *G. mellonella* larval AMPs

AMPs are important factors in the specific immune response of *G. mellonella*. They are present at various concentrations in both healthy and infected larvae, primarily in the salivary glands, gastrointestinal and reproductive tracts, fat body, and hemocytes (Ménard *et al.* 2021). Both cationic and anionic AMPs are present (Trevijano-Contador and Zaragoza 2018). Cationic AMPs can be divided into three groups: peptides with glycine and/or proline residues (gloverin), α -helical linear peptides (morcin, cecropin), and peptides with disulfide bridges (galiomycin, galerimycin) (Ménard *et al.* 2021). Anionic AMPs are classified as either peptide 1 (AP1) or peptide 2 (AP2). AP2 is present in the hemolymph of both infected and uninfected larvae, and in both cases, the amount of AP2 is constant and relatively high. The efficacy of AP2 against yeast and

Micrococcus luteus is low (Sowa-Jasiłek *et al.* 2020). AMPs induce the efflux of ions from the bacterial cell, which leads to its lysis. Each type of peptide has a different mechanism of action. For example, moricins and cercopins determine the formation of pores in the cytoplasmic membrane, whereas proline- and glycine-rich peptides contribute to the inhibition of the synthesis of key membrane-associated proteins, increasing membrane permeability (Ménard *et al.* 2021). Undoubtedly, the most important and common feature characterizing AMPs is their ability to destroy microbial cells although AMPs differ in their affinities for filamentous fungi and Gram-positive and Gram-negative bacterial cells (Vertyporokh and Wojda 2017).

5. Insect metalloproteinase inhibitor (IMPI) and lysozymes

Many bacterial pathogens that cause infections in humans are characterized by the secretion of thermolysin-like metalloproteinases (M4 family), which degrade both human and larval defense system proteins. *G. mellonella* larvae produce inhibitors of thermolysin-like metalloproteinases, the production of which is stimulated by the presence of pathogenic microorganisms. Until now, it is the only known insect inhibitor of microorganismal metalloproteinases, and is involved in the immune response of invertebrates to pathogens (Ménard *et al.* 2021).

The lysozymes belong to a family of antimicrobial proteins that are very similar to peptidoglycan-degrading muramidases, and act against Gram-positive bacteria and to a lesser extent against Gram-negative bacteria (Ménard *et al.* 2021). Lysozymes are present in the larval hemolymph, and their concentrations increase after pathogen infection (Sheehan *et al.* 2021). These proteins interact with opsonins (apoLp-III), in a complex that damages *Escherichia coli* cells (Zdybicka-Barabas *et al.* 2013). As well as participating in the immune response, lysozymes also regulate the microbiome of *G. mellonella* larvae. It has been shown that the microbiomes of larvae in which lysozyme production is limited are dominated by Gram-negative *Enterobacteriaceae* species (Johnston and Rolff 2015).

6. Melanization

Another important mechanism involved in the organism's defense against fungi and bacteria is the melanization pathway (Jorjao *et al.* 2018; Pereira 2018). During the body's defense response, bacterial components (LTA, LPS) are bound by soluble effector molecules, leading to the release of pro-phenyl oxidase by

oenocytoids. The pro-phenyl oxidase is then activated via a serine protease cascade to phenyl oxidase, which oxidizes phenolic compounds. The oxidation reaction generates quinone compounds, which are broken down to melanin, leading to the formation of dark spots on infected larvae. Factors affecting the melanization process include the virulence of the bacterial strain and the number of microorganisms present (inoculum). The melanization phenomenon was observed in *G. mellonella* larvae infected with an enterotoxigenic *E. coli* strain, whereas no changes in larval color was observed after infection with a nonpathogenic *E. coli* strain. The infection of larvae with a suspension of *Staphylococcus aureus* (10^6 colony-forming units [CFU]) led to their complete and rapid melanization, although this effect was not observed after infection with 10^4 CFU (Ménard *et al.* 2021).

7. Selected studies of Gram-negative bacterial virulence in the *G. mellonella* larval model

Pseudomonas aeruginosa strain PA14 is characterized by its strong virulence against *G. mellonella* larvae. A few bacterial cells were sufficient to kill half of the organisms tested (LD_{50}) (Jander *et al.* 2000). *P. aeruginosa* strains are human pathogens, responsible for various diseases, including ventilator-associated pneumonia (VAP). The genes expressed in *P. aeruginosa* strains isolated from patients with and without VAP were compared, and no statistically significant differences were detected in the expression of the *P. aeruginosa* genes associated with biofilm formation or virulence. The only difference noted between the strains was in pigment production. In the VAP-associated strain, pyoverdinin was expressed more strongly than pyocyanin, whereas in the non-VAP strain, pyocyanin was expressed more strongly than pyoverdinin. Furthermore, the expression of the *rhlI* and *rhlR* genes was also weaker in non-VAP strain (Alonso *et al.* 2020). Pyoverdinin production is dependent on the exposure time and the concentration of copper and other metal ions in the bacterial environment (Lear *et al.* 2022). *P. aeruginosa* mutants have been tested in the *G. mellonella* model. One study tested the effect of the *lptE* gene on bacterial virulence. About three bacterial cells of wild-type *P. aeruginosa* strain PA01 were required as the 90% lethal dose (LD_{90}), whereas the LD_{90} of the *lptE*-depleted mutant was 9000–10000 times higher than that of the wild type (Lo Sciuto *et al.* 2018). In another study the virulence of *Legionella pneumophila* mutants was tested in the *G. mellonella* model. A mutant depleted of the *flaA* gene, which encodes the flagellin protein, did not differ from the *L. pneumophila* wild-type strain in its replication or virulence in *G. mellonella* larvae (Harding 2013).

A virulence analysis of 71 *E. coli* isolates from urinary-tract infections was performed in *G. mellonella* larvae. The LD₅₀ for each isolate was determined. A low LD₅₀ correlated positively with the expression of the *papAH*, *papC*, *papEF*, *sfaS*, *bmaE*, *gafD*, and *kpsMTIII* genes (Algoribi *et al.* 2014). Expression of the *afa/dra*, *ompT*, *fimH*, *fyuA*, *usp*, *traT*, *pap*, *kpsII*, and *malx* genes correlated with higher mortality (Ciesielczuk *et al.* 2015). Mutation of the *cpx* gene, responsible for the stress response, reduced the virulence potential of the bacterium (Leuko and Raivio 2012).

Acinetobacter baumannii strains, which are responsible for infections in healthcare facilities, have also been tested in the *G. mellonella* model. The most virulent strains are characterized by an enhanced capacity for biofilm formation (Khalil *et al.* 2021). The expression of *A. baumannii* virulence factors was shown to be temperature-dependent (Peleg *et al.* 2009). No differences in insect mortality after infection with several *A. baumannii* strains were observed in the *G. mellonella* model, suggesting the rapid adaptability of the bacteria to new environmental conditions (Chapartegui-González and Lázaro-Díez 2018). *G. mellonella* has been used as a model organism to compare the virulence of two strains of *Klebsiella pneumoniae*, with or without carbapenemase activity. Observation for 24 h showed that the strains that produced carbapenemases were responsible for the death of 50% of larvae, whereas only 25% of larvae were killed by carbapenemase-negative strains (McLaughlin *et al.* 2014). *Francisella* sp. are nonmotile, nonsporulating, gram-negative coccobacilli. causes a zoonotic disease by inhalation of an extremely low infectious dose of bacterial cells (Ahmad *et al.* 2010). *Francisella*-infected *G. mellonella* larvae were used as a model in which to study the efficacy of the antibiotic azithromycin. *Galleria mellonella* larvae were infected with *F. tularensis* or *F. novicida* strains. After incubation for 2 h, the caterpillars were injected with phosphate-buffered saline (PBS), ciprofloxacin, or azithromycin. None of the *Francisella*-infected insects survived beyond 100 h, whereas survival in the uninfected control group was > 300 h. The mean survival time of larvae administered ciprofloxacin was > 74 h, whereas in the group treated with azithromycin, the mean survival time increased to > 160 h. The study clearly demonstrated the efficacy of azithromycin in the treatment of *Francisella* infection (Ahmad *et al.* 2010).

8. *G. mellonella* larva as a model organism in which to study Gram-positive bacteria

Enterococci have been recognized as being among the most common hospital-acquired pathogens. *G. mellonella* was used to assess the pathogenic potential of

the *Enterococcus faecalis* proteins extracellular gelatinase (GelE) and serine protease (SprE). To analyze the bacterial virulence mechanisms, purified GelE and SprE enzymes were injected directly into the insect hemolymph. GelE showed lytic activity against the AMP cecropin of *G. mellonella*, a defense factor that acts in the early stages of microbial infection. In contrast to GelE, the SprE protease showed no activity against the insect immune system (Park *et al.* 2007).

Staphylococcus aureus the Gram-positive opportunistic pathogen, is one of the most common causatives of nosocomial infections. Study virulence of *S. aureus* were done in a dose-effect manner. The infection of *G. mellonella* larvae with 1×10^7 CFU cells of *S. aureus* in suspension resulted in 100% mortality after 24 h. When the dose was reduced by two orders of magnitude (1×10^5), mortality was reduced to 80%. The survival of test insects was also shown to decrease with increasing temperature (Peleg *et al.* 2009). *S. aureus* can also exist as small-colony variant (SCVs), which are essential in establishing antibiotic resistance. SCVs have an intracellular survival pattern that allows them to evade the host immune system and antibacterial substances (Zheng *et al.* 2021). However, they grow more slowly and have lower virulence than prototype *S. aureus*, as demonstrated in studies in the *G. mellonella* model. In one study, tests were performed on three *S. aureus* strains (JP310, JP1450, and JP1486) and their SCV counterparts (Zheng *et al.* 2021). The survival of *G. mellonella* larvae after inoculation for 120 hours with the SCV of strain JP310 was reduced to 50% of that of larvae injected with the native prototype; with strains JP1450 and JP1486, larval survival reduction, after injection with the corresponding SCVs, was about 40% and 50%, respectively, after observation for 5 days (Zheng *et al.* 2021).

Listeria monocytogenes is an invasive foodborne Gram-positive pathogen. *G. mellonella* has also proved a useful model for the virulence analysis of *L. monocytogenes*. A suspension of the bacterium (1×10^7 cells) showed 100% reproducible lethality against *G. mellonella* larvae. The virulence of *L. monocytogenes* was also temperature-dependent, and increasing the temperature from 30°C to 37°C increased in the average survival rate of *G. mellonella* larvae. A kinetic analysis indicated that in the first 2 h of the experiment, the number of bacteria decreased, but increased rapidly thereafter. Above results were observed when bacteria were injected to hemolymph not for oral application. An expression analysis of the genes responsible for virulence in *L. monocytogenes* showed that they were expressed at similar levels in *G. mellonella* larvae as in mammalian organisms after infection (Joyce and Gahan 2010).

9. *G. mellonella* larvae – a model organism in which to study fungal pathogenicity

G. mellonella larvae have been used to analyze the virulence of the fungus *Metarhizium robertsii*, a microorganism capable of producing proteases that are resistant to inhibitors present in the host. These enzymes include chymotrypsin-like and subtilisin-like proteases and metalloproteases. The immune response of larvae to infection with *M. robertsii* is regulated by epigenetic processes, including the expression of microRNAs, which are responsible for controlling posttranscriptional protein synthesis, histone deacetylation by histone deacetylases, and histone acetylation by histone acetyltransferases. *M. robertsii* produces toxic thermolysin, a member of the M4 family of metalloproteinases, which includes a number of virulence factors responsible for infections. Several genes of *Metarhizium* are responsible for thermolysin biosynthesis. Small amounts of fungal thermolysin are sufficient to activate the immune system of *G. mellonella* larvae, and this thermolysin induces the formation of larval peptides that induce inflammation (Mukherjee and Vilcinskis 2018).

Candida albicans strains are present in the microbiomes of the gastrointestinal tract. It is an opportunistic pathogen. The cell wall of *C. albicans* is composed of chitin, mannoproteins, phospholipomannan, and β -1,6- and β -1,3-glucans. The chitin and glucans form an internal rigid protective layer, which gives shape to the cell. Mannoproteins, in contrast, are present in the outer layer of the cell wall and are involved in the adhesion of the fungus to host tissues, leading to the activation of the host's immune system. During invasion by *C. albicans*, both the cellular and humoral immune response mechanisms are activated in the host. The key proteins and peptides involved in this process include defensins, LL-37, histatins, and lysozyme. *G. mellonella* larvae are increasingly used as a model organism in which to study the pathogenicity of *C. albicans* and the efficacy of antifungal preparations. Several studies have shown that the exposure of the larvae to the fungus triggers the activation of the humoral immune response, including the production of defense proteins and peptides, which are also involved in the formation of immune memory (Sowa-Jasilek *et al.* 2016).

10. Efficacy of antibacterial and antifungal compounds tested in *G. mellonella* larvae

In an era of increasing antibiotic resistance, new antibacterial compounds are urgently required. The activities of 90 extracts from native Atlantic Forest tree species were tested against *S. aureus* in *G. mellonella*

larvae. The results suggested that prenylated flavonoids and isoflavones are effective anti-staphylococcal agents (Chagas Almeida *et al.* 2019). In another study, compound HEScL from the leaves of *Syzygium cumini*, combined with silver nanoparticles, exerted both time- and dose-dependent bactericidal and antibiofilm effects (Kaul *et al.* 2022).

Both natural and synthetic compounds have been studied in the *G. mellonella* larval model. The low-molecular-weight peptide NapFFKK-OH forms a hydrogel, the toxicity properties of which were tested *in vivo* in the *G. mellonella* model. No *in vivo* toxicity or death was observed in *G. mellonella* larvae within the 5 days of the experiment at NapFFKK-OH concentrations of $\leq 2\%$ w/v. However, treatment with 2% (w/v) NapFFKK-OH reduced *S. aureus* by 4.4 log₁₀ CFU/mL after 72 h (McCloskey *et al.* 2019). Another study showed that chromone 5-maleimide substitution compound CM3a is toxic to both *S. aureus* and *G. mellonella* larvae. CM3a effectively eradicated an *S. aureus* biofilm by reducing bacterial cell viability and exerting low-level toxicity. Therefore, chromium derivatives of CM3a may offer an alternative treatment for infections caused by *S. aureus* (Qing *et al.* 2021). New antimicrobial molecules are being sought with various approaches, including the dual-host method, which is used to identify and validate new anti-methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) compounds. In one study, five new compounds, PPT, NNC, TBB, GW4064, and PD198306, positively affected the survival of the test organisms. The dual-host method can be used to identify compounds with both antimicrobial activity and relatively low toxicity against the eukaryotic cells of *G. mellonella* larvae, which are potentially very valuable therapeutic agents (Khader *et al.* 2020).

The utility of a staphylococcal phage (monophage Sb-1) and a mixture of bacteriophages (PYO) has also been demonstrated in the *G. mellonella* model. The authors suggested that bacteriophages are effective against infections of MRSA strains. PYO was more effective than Sb-1 against *S. aureus*, with a higher survival rate among the infected insects. The timing of bacteriophage injection also influenced the efficacy of the therapy. Bacteriophages were injected 1 h before or after infection. There was less mortality in the infected larvae in which the bacteriophages were injected before infection (Tkhaishvili *et al.* 2020). *G. mellonella* larvae were also used to assess the activity of bacteriophage 191219 against an *S. aureus* biofilm. This phage effectively destroyed the bacterial cells *in vitro*, depending on the dose used (Mannala *et al.* 2022). The study also confirmed the utility of a preparation of *Staphylococcus* monophage Sb-1, which is highly efficacious against *S. aureus*, including antibiotic-resistant isolates. In another study, the efficacy of this preparation in controlling or preventing

Table II.
Antibacterial substances tested in *G. mellonella* larvae

Bacterial species	Studies	References
<i>Staphylococcus aureus</i>	prevention of colonisation on medical foreign bodies (in vivo model of implant infection)	(Materazzi <i>et al.</i> 2020)
	virulence	(Andrade <i>et al.</i> 2022; Golla <i>et al.</i> 2021; Gomez <i>et al.</i> 2022; Mishra <i>et al.</i> 2021; Oyama <i>et al.</i> 2022; Rao <i>et al.</i> 2022; Wang <i>et al.</i> 2021; Zheng <i>et al.</i> 2021)
	testing an antibacterial hydrogel containing the peptide (Naphthalene-2-ly)-acetyl-diphenylalanine-dilysine-OH (NapFFKK-OH)	(McCloskey <i>et al.</i> 2019)
	in vivo antimicrobial activity	(Chagas Almeida <i>et al.</i> 2019)
	in vivo efficacy of ceftazolin and fosfomicin in the treatment of MRSA infections	(Kusmann <i>et al.</i> 2021)
	in vivo efficacy of phage preparations: staphylococcal bacteriophage (containing monophage Sb-1) and bacteriophage mixture (PYO)	(Tkhaishvili <i>et al.</i> 2020)
	infection model associated with biofilm on stainless steel and titanium implants	(Mannala <i>et al.</i> 2021)
	biofilm formation inside the larvae	(Campos-Silva <i>et al.</i> 2019)
	resistance to infection	(Sheehan <i>et al.</i> 2021)
	regulation of humoral immunity by photodynamic therapy (PDT)	(Huang <i>et al.</i> 2020)
	maximum tolerated dose (MTD) of PPT, NNC, TBB, GW4064 and PD198306	(Khader <i>et al.</i> 2020)
	toxicity of CM3a (5-maleimide-substituted chromone compounds)	(Qing <i>et al.</i> 2021)
	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	production of compounds with antimicrobial activity
evaluation of the activity of bacteriophage 191219 against biofilm on metal implants with and without antibiotics		(Mannala <i>et al.</i> 2022)
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	antimicrobial activity of diethyldithiocarbamate and copper ions	(Kaul <i>et al.</i> 202)
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	virulence	(Andrade <i>et al.</i> 2022)
<i>Staphylococcus coagulans</i>	virulence	(Andrade <i>et al.</i> 2022)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	testing of an antibacterial hydrogel containing a peptide (Naphthalene-2-ly)-acetyl-diphenylalanine-dilysine-OH (NapFFKK-OH)	(McCloskey <i>et al.</i> 2019)
	antimicrobial activity of diethyldithiocarbamate and copper ions	(Kaul <i>et al.</i> 2022)
<i>Escherichia coli</i>	testing of an antibacterial hydrogel containing a peptide (Naphthalene-2-ly)-acetyl-diphenylalanine-dilysine-OH (NapFFKK-OH)	(McCloskey <i>et al.</i> 2019)
	virulence	(Antoine <i>et al.</i> 2021; Duan <i>et al.</i> 2020; Wojda <i>et al.</i> 2020)
	in vivo antimicrobial efficacy of lactoferricin	(Vergis <i>et al.</i> 2020)
	in vivo antimicrobial efficacy of indolicidin	(Vergis <i>et al.</i> 2019)
	microRNA expression (miRNA)	(Mukherjee <i>et al.</i> 2020)
	photodynamic therapy activity (PDT)	(Garcez <i>et al.</i> 2023)
antimicrobial activity of the combination of PMB and LL-37	(Ridyard <i>et al.</i> 2023)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	testing of an antibacterial hydrogel containing a peptide (Naphthalene-2-ly)-acetyl-diphenylalanine-dilysine-OH (NapFFKK-OH)	(Piatek <i>et al.</i> 2021)
	virulence	(Alonso <i>et al.</i> 2020; Calcagnile <i>et al.</i> 2023; Fraser-Pitt <i>et al.</i> 2021)
	antimicrobial activity of silver nanoparticles against UCBPP-PA14 strain	(Thomaz <i>et al.</i> 2020)
	antimicrobial activity of pyokines S5 and AP41	(Six <i>et al.</i> 2021)
	antimicrobial activity of the combination of PMB and LL-37	(Ridyard <i>et al.</i> 2023)
<i>Bacillus cereus</i>	iron homeostasis	(Consentino <i>et al.</i> 2021)

Table III.
Antifungal compounds tested in *G. mellonella* larvae

Fungus species	Research carried out	References
<i>Candida albicans</i>	resistance to infection	(Sheehan <i>et al.</i> 2021)
	antifungal activity of zinc oxide nanoparticles	(Xu <i>et al.</i> 2021)
	antifungal activity of 4-chloro-3-nitrophenyl-difluorodimethylsulfone	(Staniszewska <i>et al.</i> 2020)
	antifungal activity of <i>Origanum majorana</i> essential oil	(Kaskatepe <i>et al.</i> 2022)
	study of <i>R. officinalis</i> extract as an agent against fungal infections	(Meccatti <i>et al.</i> 2022)
<i>Candida auris</i>	virulence	(Maione <i>et al.</i> 2022)
<i>Conidiobolus coronatus</i>	study on linking infection to apoptosis and changes in caspase activity in hemocytes	(Wrońska <i>et al.</i> 2022)
<i>Aspergillus niger</i>	study of the immune response to α -1,3-glucan	(Stączek <i>et al.</i> 2020)
<i>Coccidioides posadasii</i>	virulence	(Garcia <i>et al.</i> 2022)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	virulence	(Thomaz <i>et al.</i> 2013)
	study of the effect of Hsp60 protein on biofilm	(Fregonezi <i>et al.</i> 202)
<i>Paracoccidioides lutzii</i>	virulence	(Thomaz <i>et al.</i> 2013)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	study on the role of melanin during infection	(Smith <i>et al.</i> 2021)
	virulence	(Benaducci <i>et al.</i> 2016)
	testing the innate immune response	(Trevijano-Contador <i>et al.</i> 2015)
<i>Cryptococcus gattii</i>	virulence	(Benaducci <i>et al.</i> 2016)
<i>Candida glabrata</i>	study on the role of <i>C. glabrata</i> in enhancing host immunity against infections	(Huang <i>et al.</i> 2020)

S. aureus colonization of medical foreign bodies (K-wires) was tested in *G. mellonella* larvae. The bacteria were reduced in preparations treated with the Sb-1/daptomycin combination and the Sb-1 preparation prevented the colonization of K-wires by *S. aureus*, as did vancomycin (Materazzi *et al.* 2022).

With the discovery of potential new therapeutic agents, novel therapies are also being sought. One such therapy is photodynamic therapy (PDT), which shows antimicrobial activity against certain pathogens. In one study, *G. mellonella* larvae were used as the model organism in which to evaluate the effectiveness of PDT and to investigate the regulation of humoral immunity by PDT. 5-Aminolevulinic acid (ALA) was used as the photosensitizer. The study showed that ALA-PDT exerted a defensive effect against bacterial infection by inducing the humoral immune responses in larvae (Huang *et al.* 2020).

The development of novel strategies that increase the efficacy of antibiotics by exerting synergistic effects can lead to the preventing of antibiotic resistance in bacteria. For example, the synergistic effects of the antibiotics cefazolin and fosfomycin against *S. aureus* were investigated in the *G. mellonella* model. The addition of as little as 0.8 mg/kg fosfomycin to cefazolin restored cefazolin sensitivity of MRSA strains (Kusmann *et al.* 2021).

Selected examples of studies of antibacterial and antifungal compounds tested in the *G. mellonella* larvae model are shown in Tables II and III.

11. Conclusion

The use of *G. mellonella* larvae as a model in which to analyze the pathogenicity of microorganisms and to evaluate the efficacy of new drugs has great potential utility and benefits. The literature review presented here shows that *G. mellonella* offers a practical, low-cost, and ethically acceptable research tool that can be used in various fields of medicine and biology. In addition, correlation between bacterial virulence in insects and mammals models can be tested, as was presented with *P. aeruginosa* mutant (Jander *et al.* 2020).

In studies of the pathogenicity of Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *A. baumannii*, and *K. pneumoniae*, the use of the *G. mellonella* model has allowed the analysis of pathogen-host interactions and the impact of virulence factors on larval survival. Similarly, studies of Gram-positive bacteria, such as *S. aureus* and *E. faecalis*, and the fungi *C. albicans* and *M. robertsii* based on this model have provided important information on their pathogenicity.

G. mellonella caterpillars are also used as an *in vitro* model in which to evaluate the efficacy of new drugs and improve existing therapies. This experimental system makes it possible to test the antipathogenic activities of various chemical compounds and natural substances.

From this literature review, it can be concluded that *G. mellonella* is a versatile model for testing microbial pathogenicity and evaluating new drugs. The ease of breeding, rapid developmental cycle, complete immune

system, and fully sequenced genome of *G. mellonella* make it a valuable research tool. Unfortunately, the model still suffers from a lack of standardization. Insects from nonstandardized commercial cultures, which do not have standardized microbiomes, can negatively affect the reproducibility of research. As was pointed out standardized rearing – temperature, humidity, diet, light period are crucial for high quality *G. mellonella* larvae for microbiological studies (De Jong *et al.* 2022).

Acknowledgments

The study was supported by Jan Kochanowski University, Kielce, Poland, grant 2023/24 to WK (SUPB.RN. 236).

References.

- Ahmad S., Hunter L., Qin A., Mann B.J., van Hoek M.L.: Azithromycin effectiveness against intracellular infections of *Francisella*. *BMC Microbiol.* **23**, 123 (2010)
- Alghoribi M.F., Gibreel T.M., Dodgson A.R., Beatson S.A., Upton M.: *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic *E. coli*, **9**, e101547 (2014)
- Allonsius C.N., Van Beeck W., De Boeck I., Wittouck S., Lebeer S.: The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus*. *Animal Microbiome*, **1**, <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0010-6>
- Alonso B., Fernández-Barat L., Di Domenico E.G., Marín M., Cercenado E., Merino I., de Pablos M., Munoz P., Guembe M.: Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infect. Dis.* **1**, 909 (2020)
- Andrade M., Oliveira K., Morais C., Abrantes P., Pomba C., Rosato A.E., Couto I., Costa S.S.: Virulence Potential of Biofilm-Producing *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus coagulans* Causing Skin Infections in Companion Animals. *Antibiotics (Basel)*, **30**, 1339 (2022)
- Antoine C., Laforêt F., Blasdel B., Fall A., Duprez J.N., Mainil J., Delcenserie V., Thiry D.: In Vitro Characterization and In Vivo Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae of Newly Isolated Bacteriophages against *Escherichia coli* K1. *Viruses*, **6**, 2005 (2021)
- Benaducci T., Sardi Jde C., Lourencetti N.M., Scorzoni L., Gullo F.P., Rossi S.A., Derissi J.B., de Avezedo Prata M.C., Fusco-Almeida A. M., Mendes-Giannini M.J.S.: Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front. Microbiol.* **7**, 290 (2016)
- Calcagnile M., Jeguirim I., Tredici S.M., Damiano F., Alifano P.: Spiramycin Disarms *Pseudomonas aeruginosa* without Inhibiting Growth. *Antibiotics (Basel)*, **2**, 499 (2023)
- Campos-Silva R., Brust F.R., Trentin D. S., Macedo A. J.: Microbial Pathogenesis Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microb. Pathog.* **137**, 103756 (2019)
- Chapartegui-González I., Lázaro-Díez M., Bravo Z., Navas J., Icardo J.M., Ramos-Vivas J.: *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One*, **22**, e0201961 (2018)
- Chen R.Y., Keddie B.A.: The *Galleria mellonella* – Enteropathogenic *Escherichia coli* Model System: Characterization of Pathogen Virulence and Insect Immune Responses. *J. Insect. Sci.* **21**, 7 (2021)
- Ciesielczuk H., Betts J., Phee L., Doumith M., Hope R., Woodford N., Wareham D.W.: Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, **6**, 145–151 (2015)
- Consentino L., Rejasse A., Crapart N., Bevilacqua C., Nielsen-LeRoux C.: Laser capture microdissection to study *Bacillus cereus* iron homeostasis gene expression during *Galleria mellonella* in vivo gut colonization. *Virulence*, **12**, 2104–2121 (2021)
- Das Chagas Almeida A., Rodrigues L. A., Dos Santos Paulino G., Aguilar A.P., Almeida A.A., Ferreira S.O., Brandao G.C., Leite J.P.V., de Oliveira Barros Ribon A.: Prenylated flavonoid-enriched fraction from *Maclura tinctoria* shows biological activity against *Staphylococcus aureus* and protects *Galleria mellonella* larvae from bacterial infection. *BMC Complemented Altern Med.*, **29**, 189 (2019)
- De Jong A.W., Van Veldhuizen D., Astrid T. Groot, A.T., Ferry Hagen F.: Standardized methods to rear high-quality *Galleria mellonella* larvae for the study of fungal pathogens. *Entomol Exp Appl.* **170**, 1073–1080. (2022)
- De Siqueira K.A., Liotti R.G., de Sousa J.R., Vendrusculo S.J., de Souza G.B., de Vasconcelos L.G., Januario A.H., de Oliveira Mendes T.A., Soares M.A.: *Streptomyces griseocarneus* R132 expresses antimicrobial genes and produces metabolites that modulate *Galleria mellonella* immune system. *3 Biotech.* **11**, 396 (2021)
- Desalermos A., Fuchs B.B., Mylonakis E.: Selecting an Invertebrate Model Host for the Study of Fungal Pathogenesis. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002451 (2012)
- Duan Y., Gao H., Zheng L., Liu S., Cao Y., Zhu S., Wu Z., Ren H., Mao D., Luo Y.: Antibiotic Resistance and Virulence of Extra-intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Vary According to Molecular Types. *Front. Microbiol.* **11**, 598305 (2020)
- Fasasi K.A., Malaka S.L.O.: Life cycle and impact of Greater waxmoth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) feeding on stored beeswax, *Nigerian Journal of Entomology*, **23**, 13–17 (2006)
- Firacative C., Khan A., Duan S., Ferreira-Paim K., Leemon D., Meyer W.: Rearing and Maintenance of *Galleria mellonella* and Its Application to Study Fungal Virulence. *J. Fungi*, **6**, 130 (2020)
- Fraser-Pitt D.J., O'Neil D.A. et al: Cysteamine Inhibits Glycine Utilisation and Disrupts Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **11**, 718213 (2021)
- Fregonezi N.F., Oliveira L.T., Singulani J.L., Marcos C.M., Dos Santos C.T., Taylor M.L., Mendes-Giannini M.J.S., de Oliveira H.C., Fusco-Almeida A.M.: Heat Shock Protein 60, Insights to Its Importance in *Histoplasma capsulatum*: From Biofilm Formation to Host-Interaction. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10**, 591950 (2021)
- Garcez A.S., Kaplan M., Jensen G.J., Scheidt F.R., Oliveira E.M., Suzuki S.S.: Effects of antimicrobial photodynamic therapy on antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **32**, 102029 (2020)
- Garcia JA, Vu K, Thompson GR 3rd, Gelli A.: Characterization of the Growth and Morphology of a BSL-2 Coccidioides posadasii Strain That Persists in the Parasitic Life Cycle at Ambient CO2. *J. Fungi (Basel)*, **28**, 455 (2022)
- Golla R.M., Mishra B., Dang X., Narayama J.L., Li A., Xu L., Wang G.: Resistome of *Staphylococcus aureus* in Response to Human Cathelicidin LL-37 and Its Engineered Antimicrobial Peptides. *ACS Infect. Dis.* **6**, 1866–1881 (2021)
- Gomez A.C., O'Sullivan T.P. et al.: Synthesis and evaluation of novel furanones as biofilm inhibitors in opportunistic human pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **242**, 114678 (2022)
- Harding C.R., Stoneham C.A., Schuelein R., Newton H., Oates C.V., Hartland E.L., Schroeder G.N., Frankel G.: The

- Dot/Icm Effector SdhA Is Necessary for Virulence of *Legionella pneumophila* in *Galleria mellonella* and A/J Mice. *Infect Immun.* **81**, 2598–2605 (2013)
28. Huang X.W., Xu M.N., Zheng H.X., Wang M.L., Li L., Zeng K., Li D.D.: Pre-exposure to *Candida glabrata* protects *Galleria mellonella* against subsequent lethal fungal infections. *Virulence*, **11**, 1674–1684 (2020)
 29. Huang X., Xu M., Pan W., Wang M., Wu X., Dai S., Li L., Zeng K.: Antimicrobial and immunomodulatory responses of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* model. *BMC Microbiol.* **6**, 196 (2020)
 30. Vergis J., Malik S.S., Pathak R., Kumar M., Ramanjaneya S., Kurkure N.V., Barbudde S.B., Rawool D.B.: Antimicrobial Efficacy of Indolicidin Against Multi-Drug Resistant Enterococcal *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* Model. *Front. Microbiol.* **10**, 2723 (2019)
 31. Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M.: Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *J. Bacteriol.* **182**, 3843–3845 (2000)
 32. Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M.: Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *J. Bacteriol.* 3843–3845 (2020)
 33. Johnston P.R., Rolff J.: Host and Symbiont Jointly Control Gut Microbiota during Complete Metamorphosis. *PloS Pathogens*, **11**, e1005246 (2015)
 34. Jorjao A.L., Oliveira L.D., Scorzoni L., Figueiredo-Godoi L.M.A., Prata M.C.A., Jorge A.O.C., Junqueira J.C.: From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*, **9**, 383–389 (2018)
 35. Joyce S.A., Gahan C.G.M.: Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology (Reading)*, **156**, 3456–3468 (2010)
 36. Kaskatepe B., Aslan Erdem S., Ozturk S., Safi Oz Z., Subasi E., Koyuncu M., Vlainić J., Kosalec I.: Antifungal and Anti-Virulent Activity of *Origanum majorana* L. Essential Oil on *Candida albicans* and In Vivo Toxicity in the *Galleria mellonella* Larval Model Banu. *Molecules*. **20**, 663 (2022)
 37. Kaul L., Abdo A.I., Coenye T., Krom B.P., Hoogenkamp M.A., Zannettino A.C.W., Suss R., Richter K.: The combination of diethyldithiocarbamate and copper ions is active against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro and in vivo. *Front Microbiol.* **9**, 999893 (2022)
 38. Khader R., Tharmalingham N., Mishra B., Felix L., Ausubel F.M., Kelso M. J., Mylonakis E.: Characterization of Five Novel Anti-MRSA Compounds Identified Using a Whole-Animal *Caenorhabditis elegans*/*Galleria mellonella* Sequential-Screening Approach. *Antibiotics (Basel)*, **27**, 449 (2020)
 39. Khalil M.A.F., Ahmed F.A., Elkhateeb A.F., Mahmoud E.E., Ahmed M.I., Ahmed R.I., Hosni A., Alghamdi S., Kabrah A., Dabool A.S., Hetta H.F., Moawad S.S., Hefzy E.M.: Virulence Characteristics of Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* in Clinical Isolates Using a *Galleria mellonella* Model. *Microorganisms*, **9**(11), 2365 (2021)
 40. Kussmann M., Obermueller M., Karer M., Kriz R., Chen R.Y., Hohl L., Schneider L., Burgmann H., Traby L., Vossen M.G.: Synergistic Effect of Cefazolin Plus Fosfomycin Against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo in an Experimental *Galleria mellonella* Model. *Front. Pharmacol.* **12**, 685807 (2021)
 41. Kwadha C.A., Ong'Amo G.O., Ndegwa P.N., Raina S.K., Fombong A.T.: The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, **8**, 61 (2017)
 42. Lange A., Beier S., Huson D.H., Parusel R., Iglauer F., Stefanie-Crick J.: Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc.* **6**, e01220-17 (2018)
 43. Lear L., Hesse E., Buckling A., Vos M.: Copper selects for siderophore – mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **13**, 303 (2022)
 44. Leuko S., Raivio T. L.: Mutations That Impact the Enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Attenuate Virulence in *Galleria mellonella*. *Infect Immun.* **80**, 3077–3085 (2012)
 45. Lo Sciuto A., Martorana A.M., Fernández-Piñar R., Mancone C., Polissi A., Imperi F.: *Pseudomonas aeruginosa* LptE is crucial for LptD assembly, cell envelope integrity, antibiotic resistance and virulence. *Virulence*, **9**, 1718–1733 (2018)
 46. Loh J.M.S., Adenwalla N., Wiles S., Proft T.: *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *Streptococcus*. *Virulence*, **4**, 419–428 (2013)
 47. Maione A., Pietra A., Salvatore M.M., Guida M., Galdiero E., de Alteriis E.: Undesired Effect of Vancomycin Prolonged Treatment: Enhanced Biofilm Production of the Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*, **11**, 1771 (2022)
 48. Mannala G.K., Rupp M., Alagboso F., Kerschbaum M., Pfeifer C., Sommer U., Kampschulte M., Domann E., Alt V.: *Galleria mellonella* as an Alternative *In Vivo* Model to Study Bacterial Biofilms on Stainless Steel and Titanium Implants. *ALTEX*. **38**, 245–252 (2021)
 48. Mannala G.K., Rupp M., Walter N., Brunotte M., Alagboso F., Docheva D., Brochhausen C., Alt V.: Microbiological and ultrastructural evaluation of bacteriophage 191219 against planktonic, intracellular and biofilm infection with *Staphylococcus aureus*. *Eur Cell Mater*, **43**, 66–78 (2022)
 50. Materazzi A., Bottai D., Campobasso C., Klatt A., Cesta N., De Masi M., Trampuz A., Tavanti A., Di Luca M.: Phage-Based Control of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a *Galleria mellonella* Model of Implant-Associated Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 14514 (2022)
 51. McCloskey A.P., Lee M., Megaw J., McEvoy J., Coulter S.M., Pentlavalli S., Lavery G.: Investigating the In Vivo Antimicrobial Activity of a Self-Assembling Peptide Hydrogel Using a *Galleria mellonella* Infection Model. *ACS Omega*, **4**, 2584–2589 (2019)
 52. McLaughlin M.M., Advincula M.R., Malczynski M., Barajas G. Qi C., Scheetz M.H.: Quantifying the clinical virulence of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* with a *Galleria mellonella* model and a pilot study to translate to patient outcomes. *BMC Infect. Dis.* **15** (2014)
 53. Meccatti V.M., Figueiredo-Godoi L.M.A., Pereira T.C., de Lima P.M.N., Hasna A.A., Senna L.B., Marcucci M.C., Junqueira J.C., de Oliveira L.D.: The biocompatibility and anti-fungal effect of *Rosmarinus officinalis* against *Candida albicans* in *Galleria mellonella* model. *Sci. Rep.* **16**, 15611 (2022)
 54. Ménard G., Rouillon A., Cattoir V., Donnio P.: *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 782733 (2021)
 55. Mishra B., Khader R., Felix L. O., Frate M., Mylonakis E., Meschwitz S., Fuchs B.B.: A Substituted Diphenyl Amide Based Novel Scaffold Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence in a *Galleria mellonella* Infection Model. *Front. Microbiol.* **12**, 723133 (2021)
 56. Mukherjee K., Amsel D., Kalsy M., Billion A., Ulrich D., Vilcinskas A.: MicroRNAs regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like *Escherichia coli* infections in the surrogate insect model *Galleria mellonella*. *Sci. Rep.* **13**, 2570 (2020)
 57. Mukherjee K., Vilcinskas A.: The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence*, **9**, 402–413 (2018)
 58. Oyama L.B., Huws S.A. et al: In silico identification of two peptides with antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **14**, 58 (2022)

59. Park S.Y., Kim K.M., Lee J.H., Seo S.J., Lee I.H.: Extracellular Gelatinase of *Enterococcus faecalis* Destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum. *Infect Immun.* **75**, 1861–1869 (2007)
60. Peleg A.Y., Jara S., Monga D., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Mylonakis E.: *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**, 2605–2609 (2009)
61. Peleg A.Y., Monga D., Pillai S., Mylonakis E., Moellering R.C.Jr., Eliopoulos G.M.: Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* Infection. *J Infect Dis.* **199**, 532–536 (2009)
62. Pereira T.C., de Barros P.P., de Oliveira Fugasaki L.R., Rossoni R.D., de Camargo Ribeiro F., de Menezes R.T., Junqueira J.C., Scorzoni L.: Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J. Fungi*, **4**, 128 (2018)
63. Piatek M., Sheehan G., Kavanagh K.: *Galleria mellonella*: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions, **10**, 1545 (2021)
64. Qing Z., Xu X., Zhan L., Wang B., Guo Y., Wu X., Ai W., Song Z., Yu F.: Chromone Derivatives CM3a Potently Eradicate *Staphylococcus aureus* Biofilms by Inhibiting Cell Adherence. *Infect. Drug Resist.* **11**, 979–986 (2021)
65. Ramarao N., Nielsen-Ieroux C., Lereclus D.: The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J. Vis. Exp.* **70**, e4392 (2012)
66. Rao L., Yu F. et al.: Small-molecule compound SYG-180-2-2 attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by inhibiting hemolysin and staphyloxanthin production. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **13**, 1008289 (2022)
67. Ridyard K. E., Elsayy M., Matrasingh D., Klein D., Strehmel J., Beaulieu C., Wong A., Overhage J.: Synergy between Human Peptide LL-37 and Polymyxin B against Planktonic and Biofilm Cells of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, **15**, 389 (2023)
68. Sheehan G., Garvey A., Croke M., Kavanagh K.: Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*, **9**, 1625–1639 (2018)
69. Sheehan G., Margalit A., Sheehan D., Kavanagh K.: Proteomic profiling of bacterial and fungal induced immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* **131**, 104213 (2021)
70. Six A., Mosbahi K., Barge M., Kleanthous C., Evans T., Walker D.: Pyocin efficacy in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* **12**, 2317–2324 (2021)
71. Smith D.F.Q., Dragotakes Q., Kulkarni M., Hardwick J.M., Casadevall A.: *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection. *Commun. Biol.* **12**, 1364 (2022)
72. Sowa-Jasiłek A., Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Pawlikowska-Pałęga B., Grygorczuk-Pałęta K., Skrzypiec K., Gruszecki W.I., Mak P., Cytryńska M.: Antifungal Activity of Anionic Defense Peptides: Insight into the Action of *Galleria mellonella* Anionic Peptide 2. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1912 (2020)
73. Sowa-Jasiłek A., Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Wydrych J., Skrzypiec K., Mak P., Deryło K., Tchorzewski M., Cytryńska M.: *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells. *Microbiol Res.* **193**, 121–131 (2016)
74. Staniszewska M., Gizińska M., Kazek M., de Jesús González-Hernández R., Ochal Z., Mora-Montes H.M.: New antifungal 4-chloro-3-nitrophenyldifluoriodomethyl sulfone reduces the *Candida albicans* pathogenicity in the *Galleria mellonella* model organism. *Braz. J. Microbiol.* **51**, 5–14 (2020)
75. Stączek S., Zdybicka-Barabas A., Wiater A., Pleszczyńska M., Cytryńska M.: Activation of cellular immune response in insect model host *Galleria mellonella* by fungal α -1,3-glucan. *Pathog. Dis.* **9**, ftaa062 (2020)
76. Tao Y., Duma L., Rossez Y.: *Galleria mellonella* as a Good Model to Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Pathogens*, **10**, 1483 (2021)
77. Thomaz L., García-Rodas R., Guimarães A.J., Taborda C.P., Zaragoza O., Nosanchuk J.D.: *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*, **15**, 139–146 (2013)
78. Thomaz L., Gustavo de Almeida L., Silva F.R.O., Cortez M., Taborda C.P., Spira B.: In vivo Activity of Silver Nanoparticles Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in *Galleria mellonella*. *Front. Microbiol.* **11**, 582107 (2020)
79. Tkhaiashvili T., Wang L., Tavanti A., Trampuz A., Di Luca M.: Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulations, *Staphylococcal* Bacteriophage and PYO Bacteriophage, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm Formation and Control of a Systemic Infection of *Galleria mellonella* Larvae. *Front. Microbiol.* **11**, 110 (2020)
80. Trevijano-Contador N., Herrero-Fernández I., García-Barbazán I., Scorzoni L., Rueda C., Rossi S. A., Garcia-Rodas R., Zaragoza O.: *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence*, **6**, 66–74 (2015)
81. Trevijano-contador N., Zaragoza O.: Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J. Fungi*, **5**, jof5010003 (2018)
82. Tsai C.J., Loh J.M.S., Proft T.: *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, **7**, 214–229 (2016)
83. Vergis J., Malik S.S., Pathak R., Kumar M., Ramanjaneya S., Kurkure N.V., Barbudde S.B., Rawool D.B.: Exploiting Lactoferricin (17–30) as a Potential Antimicrobial and Antibiofilm Candidate Against Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **11**, 575917 (2020)
84. Vertyporokh L., Wojda I.: Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. *Acta. Biochim. Pol.* **64**, 273–278 (2017)
85. Wang B., Duan J., Jin Y., Zhao H., Hu X., Zhao H., Wang X., Rao L., Guo Y., Yu F.: Functional Insights of MraZ on the Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Drug Resist.* **2**, 4539–4551 (2021)
86. Wojda I., Staniec B., Sulek M., Kordaczuk J.: The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog. Dis.* **78**, ftaa057 (2020)
87. Wrońska A.K., Kaczmarek A., Kazek M., Boguś M.I.: Infection of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*) Larvae With the Entomopathogenic Fungus *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales) Induces Apoptosis of Hemocytes and Affects the Concentration of Eicosanoids in the Hemolymph. *Front. Physiol.* **12**, 774086 (2022)
88. Xu M.N., Li L., Pan W., Zhang H.X., Wang M.L., Peng X.M., Dai S.Q., Tang Y.M., Zeng K., Huang X.W.: Zinc Oxide Nanoparticles Prime a Protective Immune Response in *Galleria mellonella* to Defend Against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **12**, 766138 (2021)
89. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M.: Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1449–1456 (2013)
90. Zheng X., Fang R., Wang C., Tian X., Lin J., Zeng W., Zhou T., Xu C.: Resistance Profiles and Biological Characteristics of Rifampicin-Resistant *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *Infect Drug Resist.* **21**, 1527–1536 (2021)

CONTENTS

H. Pandey, D. Lal – Exploring bacterial diversity: how far have we reached?	117
J. Nowicka, A. Janczura, M. Lelonkiewicz – <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> – znaczenie kliniczne, leczenie zakażeń <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> – clinical significance, treatment of infections	133
R. Sohail, N. Jamil – Microbial biosurfactant screening: diversity in assessment methods	145
Z. Kraszewska, I. Skuczyńska, T. Bogiel, E. Gospodarek-Komkowska – Rola wybranych czynników wirulencji w zakażeniach wywołanych przez szczepy <i>Enterococcus</i> spp. The role of selected virulence factors in infections caused by <i>Enterococcus</i> spp.	157
D. Gniazdo, W. Sasal, A. Omelaniuk, W. Brudz, W. Kaca – <i>Galleria mellonella</i> larvae as an <i>in vitro</i> model for testing microbial pathogenicity	173

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Polish Journal of Microbiology
Cena 1 zeszytu 53 zł + VAT 8%

Advancements of Microbiology dawniej *Postępy Mikrobiologii*
Cena 1 zeszytu 48 zł + VAT 8%