

KAMILA MYSZKA, WOJCIECH BIAŁAS, KATARZYNA CZACZYK

**KINETYKA TWORZENIA BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH NA
MATERIAŁACH TECHNICZNYCH W ZALEŻNOŚCI OD
DOSTĘPNOŚCI SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH**

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na adhezję mikroorganizmów do powierzchni użytkowanych w przemyśle spożywczym. W badaniach wykorzystano drobnoustroje, których naturalnym miejscem występowania jest woda (środowisko o ograniczonym dostępie składników odżywczych). Hodowle *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* i *Enterococcus faecalis* prowadzono na pożywkach o optymalnej oraz zredukowanej dostępności składników odżywczych. Stopień adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni teflonu, szkła oraz stali nierdzewnej (typ 304L i 316L) oceniano techniką mikroskopii fluorescencyjnej wg 9-stopniowej skali.

Przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni wpływ dostępności składników odżywczych oraz rodzaju badanego drobnoustroju na efektywność tworzenia się biofilmu bakteryjnego. W większości wariantów doświadczeń redukcja zawartości substratów metabolicznych w pożywce indukowała proces adhezji testowanych szczepów drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Spośród przebadanych powierzchni użytkowych, najbardziej efektywną kolonizację obserwowano w przypadku stali nierdzewnej 304L.

Słowa kluczowe: biofilm, adhezja, teflon, szkło, stal nierdzewna

Wprowadzenie

Mikroorganizmy, osiedlając się na powierzchniach stałych, tworzą zróżnicowane gatunkowo zespoły komórek – biofilmy. Proces powstawania błon biologicznych rozpoczyna się w momencie, gdy pojedyncze komórki osiadają na płaszczyźnie. Zdarzenia fizykochemiczne, zachodzące w trakcie przyłączania się komórki bakteryjnej do powierzchni stałej, są odpowiedzią swoistą danego gatunku na warunki środowiskowe [5]. Interakcja pomiędzy komplementarnymi cząsteczkami powierzchniowymi komórki (adhezynami) a reaktywnymi grupami płaszczyzny kontaktu nadaje każdej błonie biologicznej stabilną strukturę [4]. Rozwój technik

inżynierii genetycznej umożliwił zarysowanie problemu tworzenia się biofilmów i przybliżenie jego biologii molekularnej. Komórki, które ulegają adhezji zmieniają swój metabolizm i ekspresję materiału genetycznego. Transformacje komórek mogą być powiązane z warunkami hodowli i mogą odgrywać istotną rolę w przekazywaniu informacji genetycznej w biofilmie [6].

Dostępność składników odżywczych w środowisku wzrostu jest bezpośrednim induktorem zjawiska tworzenia się biofilmów mikrobiologicznych na powierzchniach użytkowych [2]. Żyjąc w skupiskach, drobnoustroje wytworzyły wielopłaszczyznowe mechanizmy obrony przed degradacyjnym wpływem antybiotyków, środków dezynfekujących czy podwyższonej temperatury [3]. Biofilmy bakteryjne powodują trudne do oszacowania straty w zakładach przemysłu spożywczego. Powstając na powierzchniach produkcyjnych, błony biologiczne stanowią potencjalne zagrożenie mikrobiologicznego skażenia żywności przeznaczonej do spożycia. Problem powszechności i łatwości kolonizacji przez bakterie wszelkich nieosłoniętych powierzchni zainicjował więc poszukiwania skutecznych metod zapobiegających występowaniu tego zjawiska.

Celem badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na kinetykę tworzenia się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach użytkowanych w przemyśle spożywczym (teflon, szkło oraz stal nierdzewna 304L i 316L).

Materiał i metody badań

Drobnoustroje

W badaniach wykorzystano następujące drobnoustroje:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145,
- *Escherichia coli* ATCC 4157,
- *Proteus vulgaris* ATCC 6380,
- *Enterobacter cloacae* ATCC 13047,
- *Enterococcus faecalis* ATCC 7080.

Przed przystąpieniem do badań drobnoustroje trzykrotnie pasażowano na odpowiednie podłoża płynne (bulion do namnażania *Enterobacteriaceae* wg Mossela [12], pożywka ABPG do namnażania *P. aeruginosa* wg Schuberta [17] oraz podłoże z azydkiem sodu i glukozą do namnażania *Enterococcus* spp. zaproponowane przez Burbiankę i wsp. [1]).

Warunki hodowli

Hodowle mikroorganizmów prowadzono w temp. 35°C w warunkach dynamicznych na podłożach o optymalnej oraz zredukowanej (o 90%) dostępności

składników odżywczych, przy pH = 7 pożywki. Czas prowadzenia hodowli wynosił 144 h.

Przygotowanie powierzchni płytek do badań

Przed przystąpieniem do badań płytki o wymiarach 10 x 65 x 1 [mm] przygotowywano następująco:

- płytki ze stali nierdzewnej (typ 304L oraz 316L) traktowano 50% roztworem HNO₃ w temp. 70°C przez 10 min [13];
- powierzchnie płytek teflonowych czyszczono miękką gąbką;
- płytki szklane gotowano w płatkach szarego mydła (1 h), a następnie moczo w 0,1 N roztworze NaOH (24 h) oraz 0,2% roztworze Na₃PO₄ (24 h) [11].

Po dokładnym wypłukaniu w wodzie destylowanej, wszystkie badane płytki umieszczano w szklanych naczyniach i autoklawowano w temp. 121°C przez 15 min.

Badanie adhezji

Badanie adhezji prowadzono przez pierwsze 8 h każdego eksperymentu. W płynnych hodowlach *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* oraz *E. faecalis* umieszczano badane płytki. Po 2 i 8 h płytki ze stali nierdzewnej, płytki teflonowe i szklane wyjmowano i przemywano roztworem PBS (o pH 7,2) celem usunięcia komórek nietrwale związanych z daną powierzchnią. Powierzchnie zabarwiano następnie oranżem akrydyny (0,01%) i prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym (CARL - ZEISS, Axiovert 200, Niemcy). Adhezję badanych drobnoustrojów do powierzchni szkła, teflonu oraz stali nierdzewnej określano na podstawie obserwacji preparatów w 50 polach widzenia. W doświadczeniach zastosowano metodę polegającą na przyporządkowaniu obrazów poszczególnych pól widzenia 9 stopniom adhezji, odpowiadającym następującym stadiom rozwojowym bakterii [10]:

- 1 stopień – od 0 do 5 komórek w polu widzenia;
- 2 stopień – od 5 do 50 komórek w polu widzenia;
- 3 stopień – tylko pojedyncze komórki, brak mikroskopisk;
- 4 stopień – pojedyncze komórki + małe mikroskopiska;
- 5 stopień – duże skupiska, ale nie łączące się + pojedyncze komórki;
- 6 stopień – łączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki;
- 7 stopień – ¼ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 8 stopień – ½ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 9 stopień – całe pole widzenia pokryte biofilmem.

Do określenia efektywności kolonizacji danej płaszczyzny wybrano 4. i 7. stopień adhezji.

Każdy wariant eksperymentu powtórzono dwukrotnie.

Celem przybliżenia rozkładu badanych zmiennych do rozkładu normalnego, uzyskane wyniki przekształcono za pomocą funkcji $y = \arcsin(x) + 0,000001$ (gdzie x

oznacza procentowy udział danego stopnia adhezji). Dane te następnie poddano wieloczynnikowej oraz wielowymiarowej analizie wariancji (MANOVA) w programie Statistica wersja 6.0 (PL). Oceniano wpływ następujących czynników doświadczalnych:

- dostępność składników pokarmowych w pożywce,
- badany gatunek mikroorganizmu,
- rodzaj badanej powierzchni użytkowej,
- czas prowadzenia eksperymentu.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych w środowisku na kinetykę tworzenia się biofilmów: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* i *E. faecalis*, przedstawiono na rys. 1 - 4.

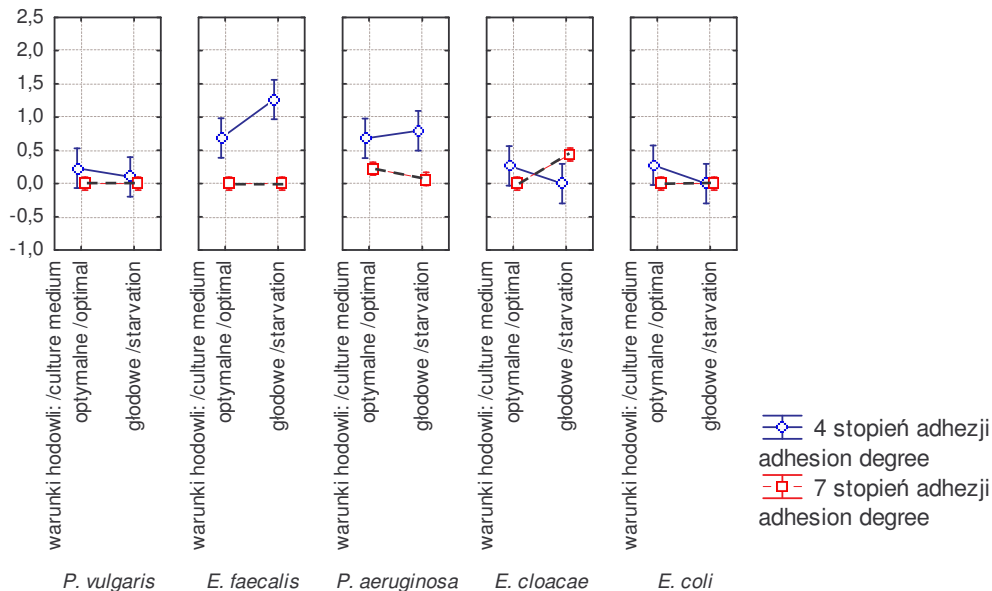
W obrębie analizowanego układu największy wpływ miał użyty w badaniach gatunek mikroorganizmu, następnie interakcje pomiędzy warunkami prowadzenia hodowli a zastosowanymi w doświadczeniach powierzchniami użytkowymi oraz interakcja pomiędzy wykorzystanym w badaniach szczepem bakterii a zastosowanym rodzajem powierzchni użytkowej ($p < 0,0001$).

Na powierzchni szkła, w warunkach stresowych środowiska, jakim był deficyt substratów metabolicznych w pożywce, zaobserwowano wyraźną dominację 4. stopnia adhezji (rys 1 A i B). W większości wariantów tego eksperymentu, było to widoczne zarówno w 2., jak i w 8. h prowadzenia doświadczenia. Siódmego stopnia adhezji komórek *P. vulgaris*, *E. coli* oraz *E. faecalis* nie zaobserwowano i było to skorelowane z rodzajem analizowanej powierzchni użytkowej. Udział tej zaawansowanej formy kolonizacji powierzchni szkła przez badane drobnoustroje odnotowano jedynie u szczepów odznaczających się szybkim wzrostem (gatunki: *P. aeruginosa* i *E. cloacae*).

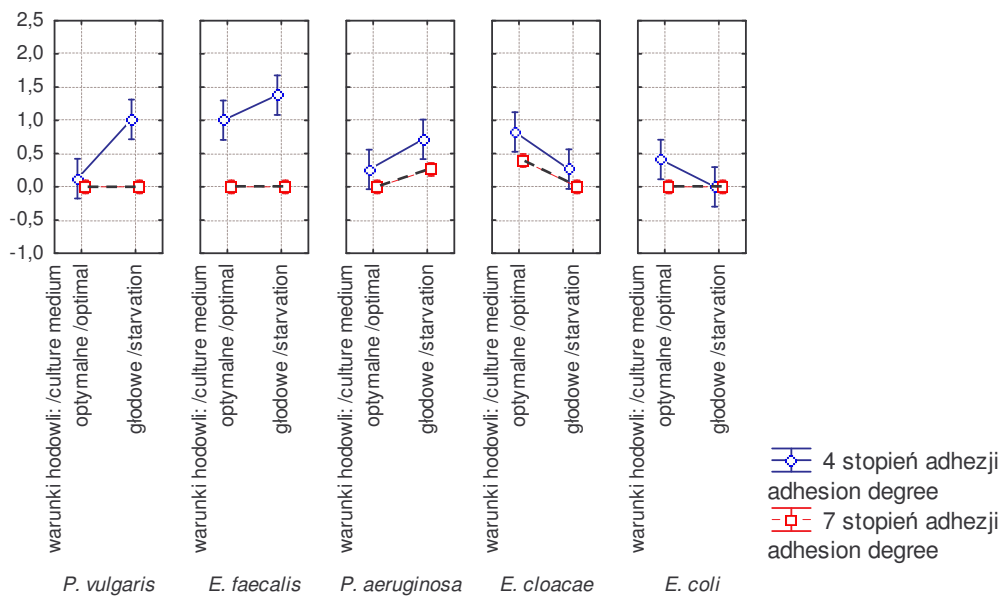
Analogiczne zależności zaobserwowano badając zjawisko tworzenia się biofilmów na powierzchni teflonu (rys. 2 A i B). Dominację 4. stopnia adhezji odnotowano w hodowlach: *P. vulgaris*, *E. faecalis* oraz *P. aeruginosa*, prowadzonych na pożywkach o silnie zredukowanej dostępności związków węgla i azotu. Dojrzałą matrycę biofilmu (7. stopień adhezji) utworzyły komórki *E. cloacae* narażone na oddziaływanie stresu głodowego już w 2. h doświadczenia.

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem, który zależy częściowo od właściwości podłoża, a częściowo od właściwości komórek, które go tworzą. Kolonizacja tych płaszczyzn użytkowych zależy od cech powierzchniowych komórek. Występująca w warunkach głodowych synteza egzogennych białek oraz polisacharydów inicjuje zjawisko autoagregacji komórek na powierzchniach

A



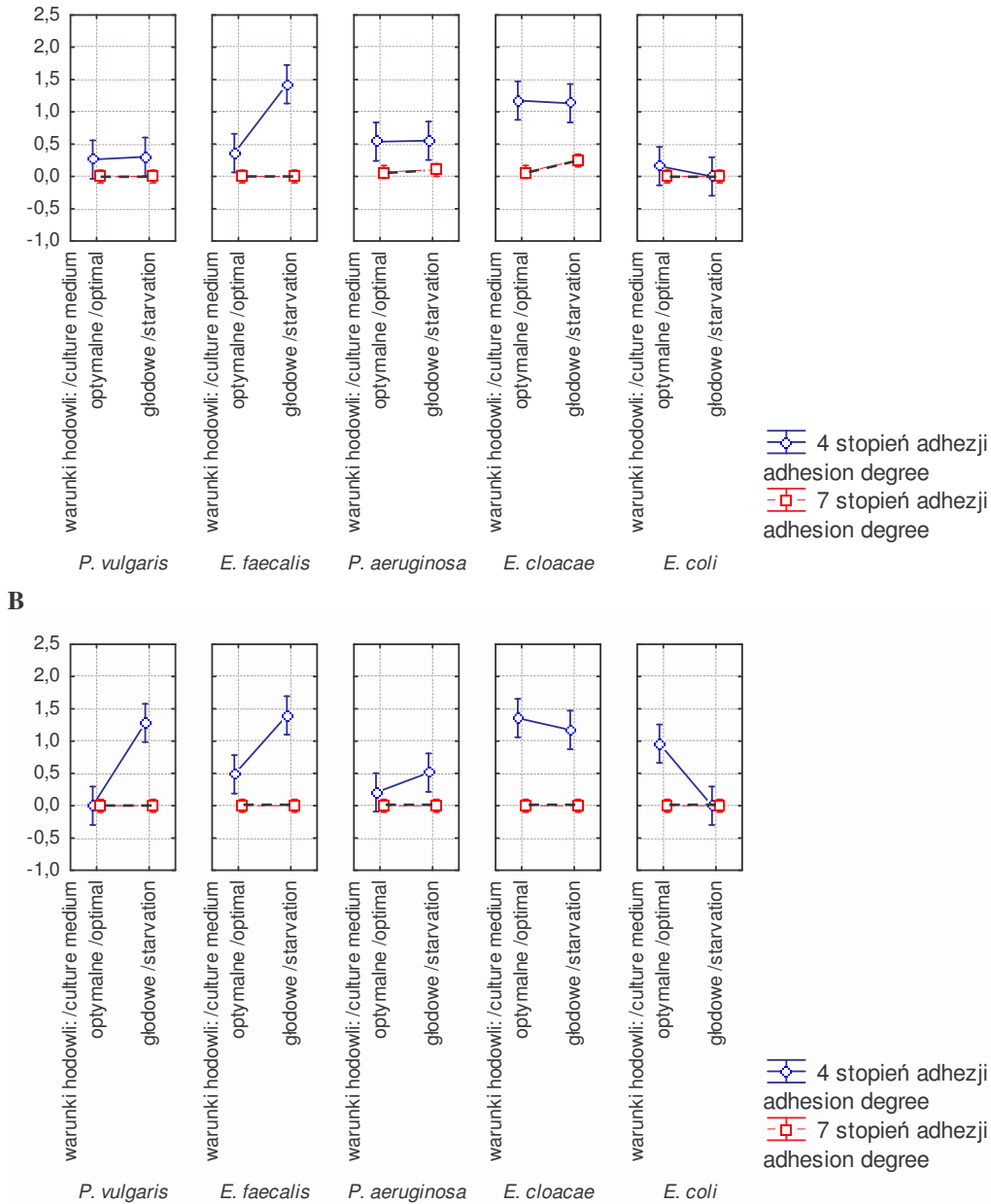
B



Rys. 1. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni szkła (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 1. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the glass surface (A – after the 2 h incubation; B – after the 8 h incubation).

A



Rys. 2. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni teflonu (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 2. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the teflon surface (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

hydrofobowych [5]. Gilbert i wsp. [8] oraz Doyle i wsp. [7] wskazali na korelację pomiędzy hydrofobowością powierzchni komórek *Staphylococcus epidermidis* oraz

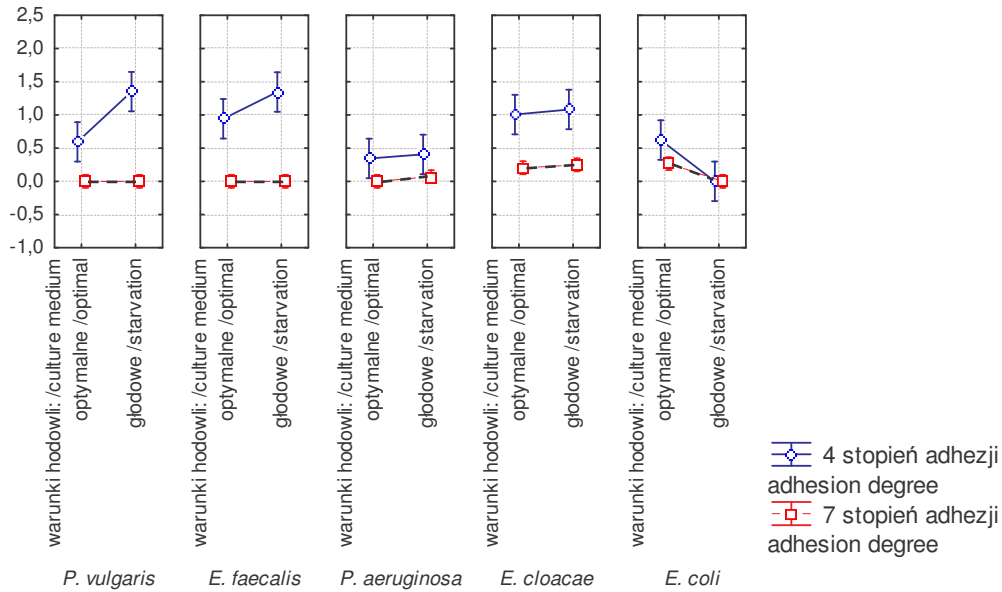
szczepów *Streptococcus* spp. a adhezją tych drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Badania wskazują, że adsorpcja *Pseudomonas fluorescens* do powierzchni szkła jest blisko 5 razy wolniejsza niż komórek *Pseudomonas aeruginosa*, odznaczających się wysoką produkcją hydrofobowych egzopolisacharydów w warunkach głodowych środowiska wzrostu [15].

Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych na kinetykę tworzenia się biofilmów przez badane szczepy drobnoustrojów na powierzchni stali nierdzewnej, typ 304L oraz 316L, przedstawiono na rys. 3. i 4.

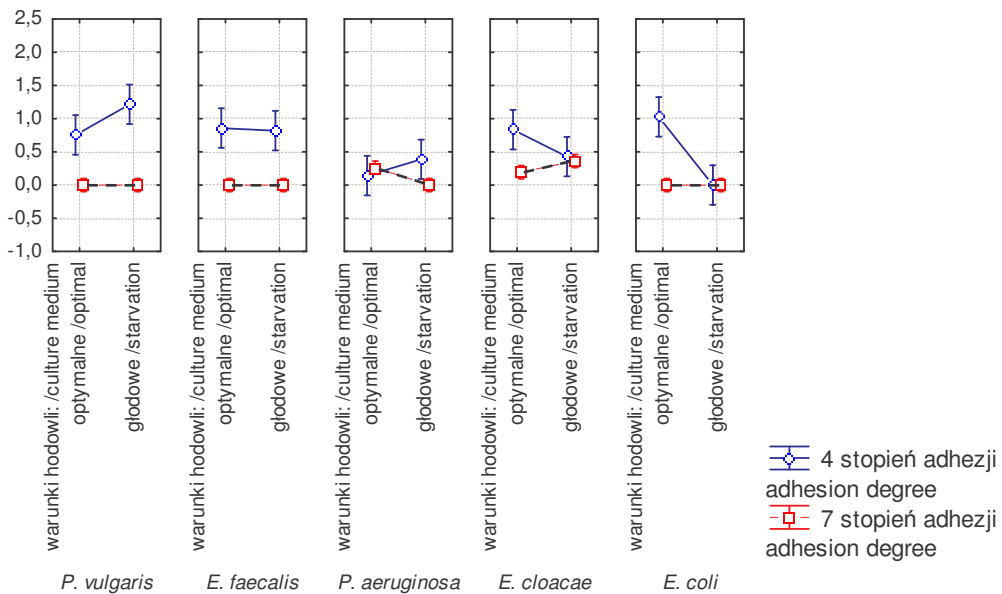
Powierzchnie ze stali nierdzewnej (typ 304L) efektywnie zasiedlane były przez komórki *E. coli* oraz *E. cloacae* w warunkach optymalnej podaży substancji odżywczych, a przez komórki *P. vulgaris*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa* – w warunkach głodowych środowiska wzrostu (rys 3 A i B). W większości wariantów tego doświadczenia zaobserwowano dominację 4. stopnia adhezji. W 2. h trwania procesu zaawansowany etap kolonizacji stali nierdzewnej (typ 304L) odnotowany został w hodowlach: *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* oraz *E. cloacae*, prowadzonych na pożywkach o ograniczonej dostępności składników pokarmowych.

Warunki głodowe w środowisku wzrostu mikroorganizmów indukowały zjawisko adhezji pojedynczych komórek oraz tworzenie się małych mikrokolonii na powierzchniach wykonanych ze stali nierdzewnej typu 316L (rys. 4 A i B). Wyjątek stanowiły komórki *E. coli*, które trwale wiązały się z analizowanym modelem powierzchni użytkowej w warunkach optymalnej podaży substancji odżywczych. W tym wariantcie doświadczenia zaobserwowano przewagę 4. stopnia adhezji w 2. h oraz 7. stopnia adhezji w 8. h trwania eksperymentu.

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchni stali nierdzewnej zależy m.in. od jej porowatości i zdolności adsorpcji wody. Chropowatość oraz ułożenie ziaren stali kwasoodpornej determinuje ilość zatrzymywanej cieczy, stwarzając tym samym korzystniejsze warunki dla rozwoju drobnoustrojów [5]. Badania prowadzone przez Jullien i wsp. [9] wykazały, że nawet minimalna porowatość powierzchni wpływa na zjawisko adhezji komórek. Analogiczne zależności zaobserwowali Peng i wsp. [14], badając kinetykę tworzenia się biofilmu *Bacillus cereus* w warunkach głodowych na powierzchni stali nierdzewnej. Niska koncentracja składników pokarmowych w środowisku wzrostu zwiększała przeżywalność drobnoustrojów tworzących biofilm na powierzchniach produkcyjnych [16]. Wykazano, że zabieg mechanicznego polerowania tych płaszczyzn nie ograniczył występowania w produktach spożywczych drobnoustrojów chorobotwórczych [18].



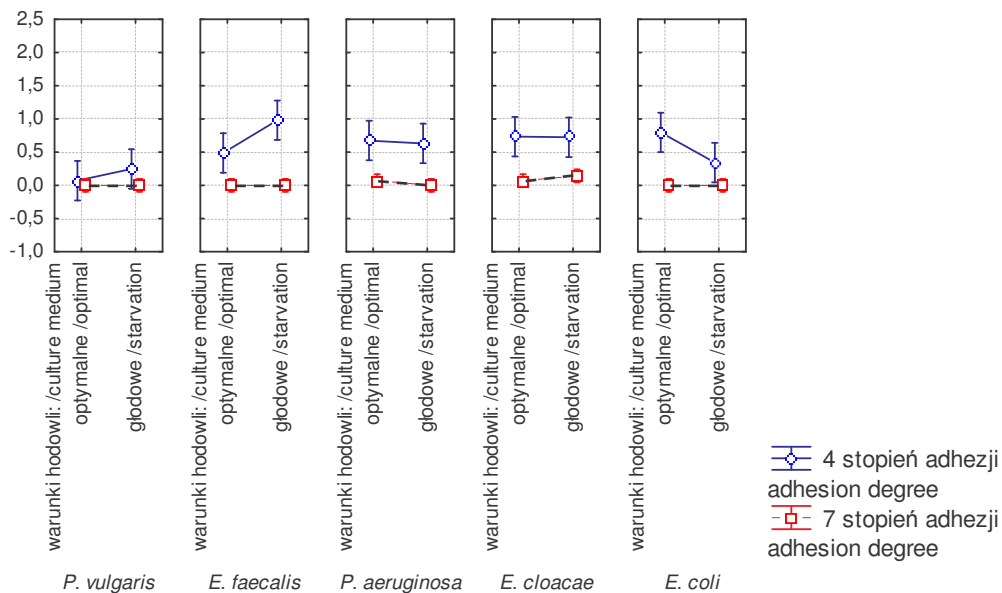
B



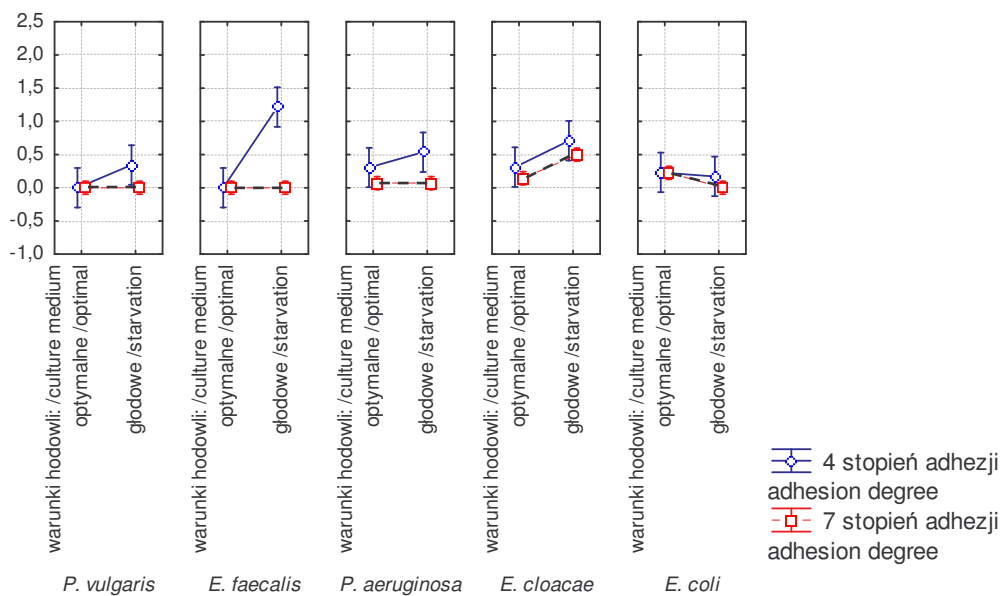
Rys. 3. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni stali nierdzewnej 304L (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 3. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the stainless steel 304L surface (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

A



B



Rys. 4. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni stal nierdzewnej 316L (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 4. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the stainless steel 316L (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni wpływ rodzaju badanego drobnoustroju oraz dostępności składników odżywczych środowiska na efektywność tworzenia się biofilmu bakteryjnego.
2. Redukcja zawartości substratów metabolicznych w pożywce indukowała proces powstawania błon biologicznych *P. vulgaris*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa*.
3. Trwała kolonizacja badanych powierzchni użytkowych występowała już w początkowych etapach hodowli (2. h).
4. Spośród przebadanych powierzchni użytkowych stal nierdzewna (typ 304L) była najefektywniej kolonizowana przez drobnoustroje.

Literatura

- [1] Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PZWL. Warszawa 1983.
- [2] Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y.: Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipofeum*. FEMS Microbiol. Ecol., 2000, **33**, 1-9.
- [3] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.: Bacterial biofilms: common cause of persistent infections. Science, 1999, **284**, 1318-1320.
- [4] Cunliffe D., Smart C. A., Alexander C., Vulfson E. N.: Bacterial adhesion at synthetic surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **11**, 4995-5002.
- [5] Czaczyk K., Wojciechowska K.: Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. Biotechnologia, 2003, **62**, 180-192.
- [6] Davey M. E., O'Toole G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000, **64**, 847-867.
- [7] Doyle R. J., Rosenberg M., Drake D.: Microbial cell surface hydrophobicity. Am. Soc. Microbiol., 1990, **50**, 387-419.
- [8] Gilbert P., Evans D.J., Duguid I.G., Brown M.R.S.: Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Appl. Bacteriol., 1991, **71**, 72-77.
- [9] Jullien C., Benezech T., Carpentier B., Leuret V., Faile C.: Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. J. Food. Eng., 2002, **56**, 77-87.
- [10] Le Thi T.-T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P.: First stages of biofilm formation: Characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. Met. Enzymol., 2001, **336**, 152-159.
- [11] Lydersen B.K., D'eila N.A.: Bioprocess engineering systems, equipment, and facilities. John Wiley and Sons. New York 1994.
- [12] Mossel D. A. A.: Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all *Enterobacteriaceae*. J. Bact., 1962, **84**, 381-386.
- [13] Parkar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D.: Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. J. Appl. Microbiol., 2001, **90**, 901-908.
- [14] Peng J., Tsai W., Chou Ch.: Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. Int. J. Food. Microbiol., 2001, **65**, 105-111.
- [15] Pringle J.H., Fletcher M.: Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 1986, **51**, 1321-1325.
- [16] Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D.: Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochem., 2003, **38**, 909-914.

- [17] Schubert R.: The use of Arginine Brilliantgreen Glucose Peptone Broth (ABGP Medium) as a Primary Culture Medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Zbl. Bakt. Hyg., 1989, **187**, 266-268.
- [18] Valcarce M.B., Busalmen J.P., de Sanchez S.R.: The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. Inter. Biodeter. Biodegrad., 2002, **50**, 61-66.

THE KINETICS OF BACTERIAL BIOFILM FORMATION ON SOME TECHNICAL MATERIALS DEPENDING ON THE AVAILABILITY OF NUTRIENTS

S u m m a r y

The objective of the research was to determine the effect of availability of nutritious components in a growth environment on the microorganisms adhesion level to surfaces applied in food industry. There were investigated microorganisms whose natural habitat was water (i.e. an environment with a limited availability of nutrients). The following bacterial cultures were grown in special media showing an optimal and a reduced availability of nutrients: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterococcus faecalis*. The levels of bacterial cells adhering to surfaces of teflon, glass, and stainless steel (type 304L and 316L) were assessed according to a 9-degree scale under the application of fluorescent microscopy technique.

The experiments performed indicate the direct influence of both the availability of nutrients and the type of a particular species of microorganisms investigated on the efficiency of the bacterial biofilm formation. In the majority of experiments, the reduction in the content of metabolic substrates in the culture medium induced the species examined to adhere to abiotic surfaces. Among the functional surfaces investigated, the stainless steel (type 304L) appeared to be the most efficiently colonized by the microorganisms examined.

Key words: biofilm, adhesion, teflon, glass, stainless steel ☒