

doi: 10.5219/18

MICROBIAL BIOFILMS PRODUCED BY *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ON SOLID SURFACES*Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Pavol Bajzík, Lucia Zeleňáková, Vladimír Vietoris, Dagmar Kozelová***ABSTRACT**

A biofilm is a complex aggregation of microorganisms growing on a solid substrate. Biofilms are characterized by structural heterogeneity, genetic diversity, complex community interactions, and an extracellular matrix of polymeric substances. The experimental part was focused on the adhesion of bacterial cells under static conditions and testing the effectiveness of disinfectants on created biofilm. In laboratory conditions we prepared and formed the bacterial biofilms *Pseudomonas fluorescens* in the four test surfaces of stainless steel, glass and plastic materials - PE (polyethylene) and EPDM (ethylene propylene diene monomer). Over the next 72 hours and 72 hours were observed numbers of adhesion bacterial cells of *P. fluorescens* on solid surfaces of tested materials. The highest values adhesion cells reached *P. fluorescens* cells after 72 hours of cultivation on plastic surfaces, where was increased in adhesion bacterial cells for EPDM in the values of 10^5 CFU/cm² and for PE up to 10^6 CFU/cm². The subsequent repeated 72-hour cultivation *P. fluorescens* was an increase (growth) in the number of adhesion bacterial cells to all tested surfaces.

Keywords: biofilm, microbial attachment, *Pseudomonas fluorescens*.

ÚVOD

Biofilm je definovaný ako matrica uzatvorená bakteriálnou populáciou adherovanou na povrchu alebo na sebe navzájom (**Genigeorgis a Sofos, 1995, Marshall, 1992**). Biofilmy sa vyznačujú charakteristickými biochemickými a biologickými vlastnosťami, odlišnými fyzikálnymi a fyzikálno-chemickými vlastnosťami (**Harrison et al., 2008**). Biofilmy môžu byť vytvorené všetkými typmi mikroorganizmov, vrátane kazenie spôsobujúcich a patogénnych mikroorganizmov za vhodných podmienok (**Nivens et al., 1995**). Niektoré baktérie majú vyššiu tendenciu vytvoriť biofilm. Najbežnejšie z nich sú *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* a *Bacillus* (**Genigeorgis a Sofos, 1995, Mattila-Sandholm a Wirtanen, 1992**). K tvorbe biofilmu dochádza takmer na všetkých materiáloch, povrchoch a akomkoľvek prostredí bohatom na živiny, kde sú prítomné životaschopné mikroorganizmy a biofilm predstavuje tak problém i v oblastiach potravinárskeho priemyslu (**Lee Wong, 1998**). *P. fluorescens* je známy ako modelový organizmus pre skúmanie tvorby biofilmu, pretože bolo preukázané, že vytvára mikrobiálny biofilm na rôznych povrchoch (**Carpentier a Chassaing, 2004**).

MATERIÁL A METODIKA

K príprave biofilmu sme použili mikroorganizmus *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7141, Česká zbierka mikroorganizmov). Na experimenty sme vybrali materiály vo forme platničiek z nerezovej ocele - STN 17 240, 17 241 W Nr. 1.4301 AISI 304, z polyetylenu - PE, laboratórneho skla (mikroskopické podložné sklo) a z etylén propylén dién monoméru - EPDM.

Na prípravu štandardizovanej suspenzie mikroorganizmu bola použitá čistá kultúra modelovej baktérie *P. fluorescens*. Pripravená kultúra bola kultivovaná 24 h na trepačke o frekvencii 130 min^{-1} pri laboratórnej teplote 22 – 25 °C. Pripravená suspenzia

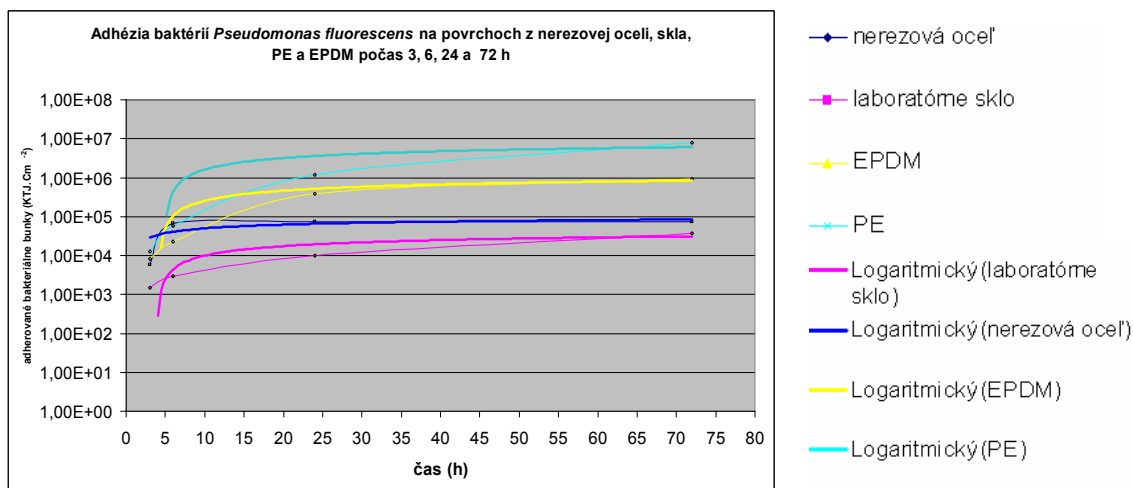
baktérií bola zriadená sterilným bujónom tak, aby ich hodnota OD₆₁₅ sa rovnala 0,32 čo zodpovedá počtu 10^8 KTJ.cm⁻³. Testované povrchy boli umiestnené do sklenenej vaničky a zaliate štandardizovanou suspenziou tak, aby v nej boli ponorené. Inkubácia prebiehala pri teplote 25 °C po dobu 3, 24 a 72 h za občasného premiešavania. Povrchy boli potom z roztoku vybraté a premyté sterilným fyziologickým roztokom fosfátového pufru (PBS pH 7,4), aby sa odstránili nezadržané bunky. Následne boli povrchy po 72 h kultivácii opláchnuté prúdom sterilnej vody, zaliate pripravenou štandardizovanou suspenziou a kultivované opäť ďalších 72 hodín.

Účinnosť sterovej metódy a následného uvoľňovania zachytených bakteriálnych buniek z tampónu do roztoku (počas pretrepávania pomocou vortexu) bola porovnávaná s metódou využívajúcou kombinované pôsobenie vortexu a ultrazvuku. Testované povrchy po 3 a 24 h kultivácii pri teplote 25 °C boli umyté roztokom fosfátového pufru a spracované sterovou metódou. Časť tampónu so zotretými bakteriálnymi bunkami bola po použití vortexu vložená na 3 minúty do ultrazvukového kúpeľa. Rozdiely v počte prežívajúcich životaschopných mikroorganizmov boli vyhodnotené kultiváciou na živnom médiu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obrázku 1 je možné vidieť, že počet adherovaných bakteriálnych buniek *P. fluorescens* presiahol už po 3 h 10^3 KTJ.cm⁻² u troch testovaných materiáloch z nerezovej ocele, skla, EPDM a u PE sme dosiahli hodnoty až $1,3 \cdot 10^4$ KTJ.cm⁻².

Najlepšie sa *P. fluorescens* adheroval na materiály z PE a EPDM, kde počas 72 h adhézie došlo k nárastu adherovaných bakteriálnych buniek u EPDM na hodnotu 10^5 KTJ.cm⁻² a u PE až na hodnotu 10^6 KTJ.cm⁻². Výnimku tvorili testované povrchy z nerezovej ocele,



Obrázok 1 Adhézia baktérií *P. fluorescens* na povrchoch z nerezovej ocele, skla, PE a EPDM po 72 hodinovej kultivácii

kde bol najväčší nárast po 6 h adhézie, potom začal rast stagnovať a zostal približne rovnaký.

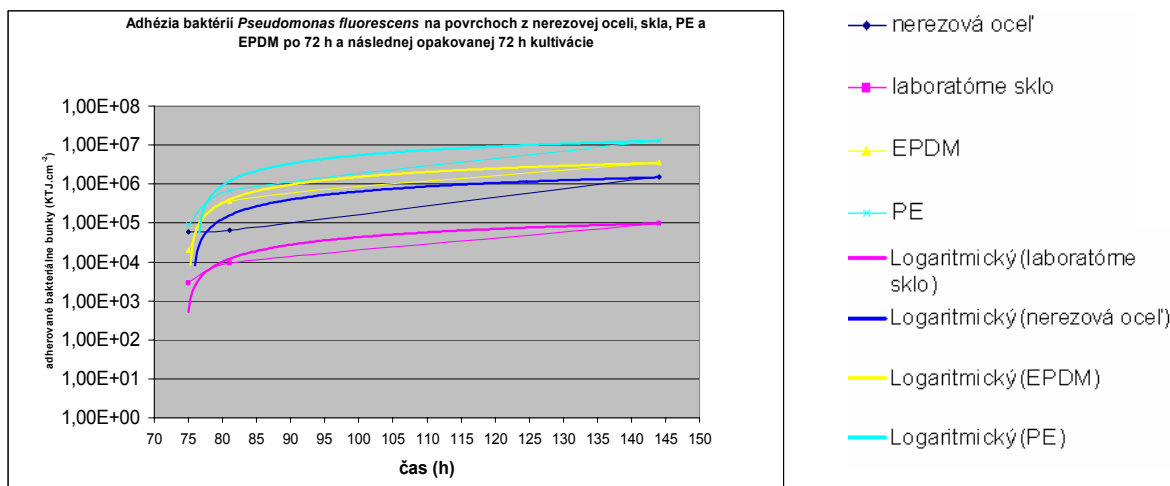
Po 72 h adhézii môžeme u všetkých testovaných povrchoch hovoriť o vzniku bakteriálneho biofilmu.

Na obrázku 2 je možné vidieť, že sa adherovali bunky po 72 h kultivácie a následnej opakovanej kultivácii ďalších 72 h. Počet adherovaných bakteriálnych buniek *P. fluorescens* na povrchoch z PE a EPDM presiahol rast po opakovanej 72 h kultivácii u EPDM hodnotu 10^7 a u PE hodnotu 10^8 adherovaných bakteriálnych buniek na cm^2 . Počet adherovaných bakteriálnych buniek na povrchoch z nerezovej ocele, skla, EPDM a PE postupne stúpal a môžeme predpokladať, že pri následných opakovanej kultiváciách došlo k rozmnoženiu bakteriálnych buniek biofilmu.

u ostatných testovaných povrchoch a v priebehu oplachu po kultivácii s prídavkom živného média došlo k odplaveniu buniek z povrchu.

Biologické mechanizmy ako je napríklad prítomnosť adhézných molekúl na povrchu buniek by mohli byť hlavným faktorom v procese mikrobiálnej adhézie a tvorby biofilmu (Doyle, 2000). Podľa Pasmore et al. (2002) prítomnosť medzi baktériou a povrchom má dôležitú úlohu v schopnosti odstrániť biofilm z povrchu. Podľa viacerých autorov (Liu et al., 2007), bakteriálny rast a životaschopnosť ovplyvňuje schopnosť buniek adherovať na abiotické povrchy.

Súhlasíme so zisteniami autorov Mosteller a Bishop (1993), ktorí uviedli, že typ a druh kultivačného média rovnako ako koncentrácia mikroorganizmov sú faktory,

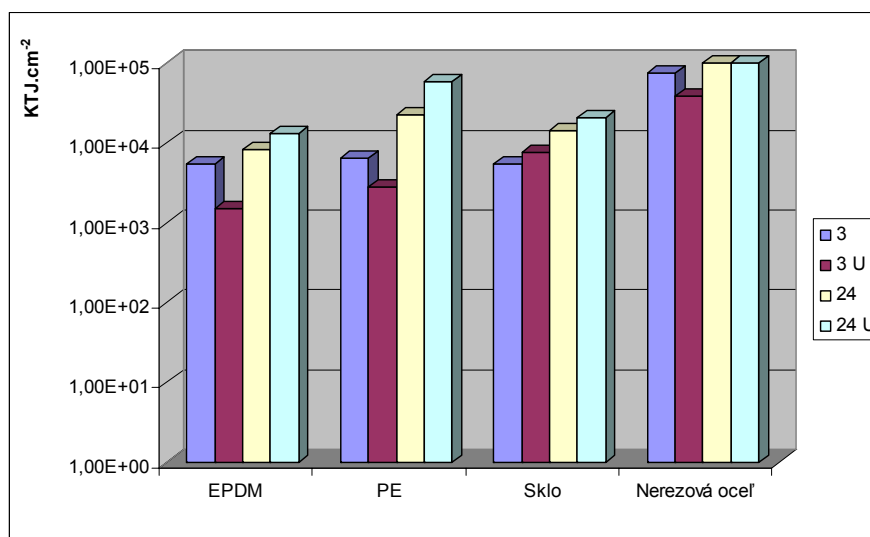


Obrázok 2 Adhézia baktérií *P. fluorescens* na povrchoch z nerezovej ocele, skla, PE a EPDM po 72 h kultivácie a následnej opakovanej 72 h kultivácii

Najmenší nárast už adherovaných bakteriálnych buniek je spozorovaný na sklenenom povrchu, kde po 3 h u opakovanej 72 h kultivácii bola hodnota adherovaných bakteriálnych buniek $2,9 \cdot 10^3$ $\text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$, po šesť hodinovej opakovanej kultivácii bola hodnota adherovaných buniek $9,3 \cdot 10^3$ $\text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ a na konci opakovanej 72 h kultivácie bola hodnota adherovaných buniek $9,8 \cdot 10^4$ $\text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Môžeme predpokladať, že v priebehu následnej opakovanej kultivácie síce došlo k rastu adherovaných bakteriálnych buniek, ale väzba nebola natoľko pevná ako

ktoré môžu mať vplyv na proces adhézie mikrobiálnych buniek na povrchy, preto sme na zabezpečenie adhézie bakteriálneho druhu *P. fluorescens* starostlivo vybrali živné médium selektívny agar pre pseudomonády a taktiež súhlasíme s autormi

Vadillo-Rodriguez et al. (2004), ktorí uviedli že pri tvorbe mikrobiálneho biofilmu musí byť počet adherovaných buniek v intervale od 10^6 alebo až 10^8 $\text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$, pričom v našom experimente sme zvolili počiatočnú hodnotu bakteriálnej suspenzie aplikovanej na



Obrázok 3 Uvoľňovanie bakteriálnych buniek *P. fluorescens* z vatových tampónov po pôsobení vortexu a po pôsobení kombinácie vortexu a ultrazvuku (U – ultrazvuk)

testované povrchy 10^8 KTJ.cm⁻³. Autori ďalej uvádzajú, že nižšie hodnoty ako 10^6 iba indikujú adhéziu mikrobiálnych buniek. Dôležitý pozorovaný ukazovateľ, ktorý sme zistili v našom experimente pri produkcii značného množstva exopolysacharidovej matrice buniek *P. fluorescens* na testovaných povrchoch zo skla, nerezovej ocele, gummy a plastu je obdobný poznatkom, ktorí potvrdili **Tsuneda et al. (2003)**, produkciu značného množstva exopolysacharidovej matrice buniek *S. aureus* rastúcich na povrchoch zo skla, z nerezovej ocele a z plastových materiálov.

Autori poukázali na to, že príľnavosť heterotrofnej baktérie izolovanej z povrchov bola inhibovaná elektrostatickou interakciou, čo má relevantný význam, pretože takouto interakciou sú ovplyvnené fyzikálno-chemické vlastnosti povrchu ako napríklad náboj, hydrofóbnosť a polymérne vlastnosti. Na obr. 3 je vidieť, že uvoľňovanie bakteriálnych buniek *P. fluorescens* z vatových tampónov po pôsobení vortexu a po pôsobení kombinácie vortexu a ultrazvuku. Počty uvoľnených bakteriálnych buniek *P. fluorescens* pomocou vortexu korešpondujú s počtami bakteriálnych buniek uvoľnených kombináciou vortexu a ultrazvuku, čo znamená, že rozdiely medzi počtami uvoľnených buniek sú minimálne. Vatové tampóny používané na odber sterov z povrchov by mali byť schopné udržať životaschopnosť prítomných mikroorganizmov a tampón by mal umožniť uvoľnenie dostatočnej reprezentatívnej časti vzorky materiálu a zachovanie integrity nukleových kyselín pre účinné testovanie (**Drake et al., 2005**, **Österblad et al., 2003**, **Roelofsen et al., 1999**). Využitie ultrazvukového vlnenia sa v mikrobiológii využíva pre uvoľňovanie, rozbíjanie buniek a bakteriálnych kultúr (**Mott et al., 1998**).

ZÁVER

Sledovali sme vplyv štyroch rôznych povrchov a času ich statického kontaktu s bakteriálnou suspenziou na podiel adherovaných bakteriálnych buniek. Preukázala sa relatívne dobrá schopnosť adhézie bakteriálnych buniek na povrchy, pričom najlepšie sa *P. fluorescens* adheroval na materiály z PE a EPDM, kde počas 72 h adhézie došlo

k nárastu adherovaných bakteriálnych buniek u EPDM na hodnoty 10^5 KTJ.cm⁻² a u PE až na 10^6 KTJ.cm⁻². Výnimku tvorili testované povrchy z nerezovej ocele, kde bol najväčší nárast po 6 hodinách adhézie, potom začal rast stagnovať a zostal približne rovnaký. Možno sa domnievať, že nižšie počty adherovaných bakteriálnych buniek na povrchu z nerezovej ocele mohli byť spôsobené aj dôsledkom použitej sterovej metódy, kde vzhľadom k drsnejšiemu povrchu materiálu nemuseli byť zotreté všetky adherované bunky. Po 72 h adhézie môžeme u všetkých testovaných povrchoch hovoriť o vzniku bakteriálneho biofilmu. Pri následnej ďalšej 72 h (144 h) kultivácii *P. fluorescens* došlo k zvýšeniu počtu adherovaných bakteriálnych buniek na všetkých testovaných povrchoch v porovnaní len so 72 h kultiváciou. Analyzovaním porovnania vplyvu pôsobenia vortexu a kombinácie vortexu a ultrazvuku na uvoľňovanie bakteriálnych buniek sme potvrdili vhodnosť a dostatočnosť použitej metódy uvoľňovania bakteriálnych buniek z odobratého steru pomocou vortexu, pretože rozdiely medzi oboma metódami boli minimálne pri analyzovaní steru odobratých bakteriálnych buniek adherovaných počas 3 a 24 hodín.

LITERATÚRA

- CARPENTIER, B., CHASSAING, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 97, 2004, p. 111-122.
- DOYLE, R. J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial adhesion, In *Microbes and Infection*, vol. 2, 2000, p. 391-400.
- DRAKE, C., BARENFANGER J., LAWHORN J., VERHULST, S. 2005. Comparison of Easy-Flow Copan liquid Stuart's and Starplex swab transport systems for recovery of fastidious aerobic bacteria. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, 2005, p. 1301-1303.
- GENIGEORGIS, C., SOFOS, J. 1995. Inactivating human pathogens by processing and packaging. In *Proc. Int. Conf. Veterinary Aspects of Meat Production, Processing and*

- Inspection* 11–15 October 1993, Eceamst, Utrecht, In Press 1995, p. 78-79.
- HARRISON, J. J., TURNER, R. J., JOO, D. A., STAN, M. A., CHAN, C. S., ALLEN, N. D., VRIONIS, H. A., OLSON, M. E., CERI, H. 2008. Copper and Quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and anti-biofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Agents and Chemother.*, vol. 52, 2008, p. 2870-2881.
- Lee WONG, A. C. 1998. Biofilms in food processing environments. In *Journal of Dairy Science*, vol. 81, 1998, p. 10.
- LIU, Y., STRAUSS, J., CAMESANO, T. A. 2007. Thermodynamic investigation of *Staphylococcus epidermidis* interactions with protein-coated substrata, In *Langmuir*, vol. 23, 2007, p. 7134-7142.
- MARSHALL, K. C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. In *ASM News*, vol. 58, 1992, p. 202-207.
- MATTILA-SANDHOLM, T., WIRTANEN, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A Review. In: *Food Reviews International*, vol. 8, 1992, p. 573-603.
- MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. In *J. Food Prot.*, vol. 56, 1993, p. 34-41.
- MOTT, I. E. C., STICKLER, D. J., COAKLEY, W. T., BOTT, T. R. 1998. The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84, 1998, p. 509-514.
- NIVENS, D. E., PALMER, R. Jr., WHITE, D. C. 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: A review of analytical techniques. In *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 15, 1995, p. 263-276.
- ÖSTERBLAD, M., JÄRVINEN, H., LÖNNQVIST, K., HUIKKO, S., LAIPPALA, P., VILJANTO J., ARVILOMMI, H., HUOVINEN, P. 2003. Evaluation of a new cellulose spongetipped swab for microbiological sampling: a laboratory and clinical investigation. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, 2003, p. 1894–1900.
- PASMORE, M., TODD, P., PFIEFER, B., RHODES, M., BOWMAN, C. N. 2002. Effect of polymeric surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development, In *Biofouling*, vol. 18, 2002, p. 65-71.
- TSUNEDA, S., AIKAWA, H., HAYASHI, H., YUASA, A., HIRATA, A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. In *Microbiol. Lett.*, 223, vol. 2, 2003, p. 287-292.
- VADILLO-RODRIGUEZ, V., BUSSCHER, H. J., NORDE, W., DE VRIES, J., VAN DER MEI, H. C. 2004. Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata. In *J. Colloid Interface Sc.*, vol. 278, 2004, p. 251–254.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA.3/7255/09.

Contact address:

Ing. Jozef Čapla, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.capla@uniag.sk

Ing. Peter Zajác, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, E-mail: zajac@potravinarstvo.com

doc. Ing. Jozef Golian, Dr., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian.af@uniag.sk

Ing. Pavol Bajzík. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: bajzik2@gmail.com

Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lucia.zelenakova@uniag.sk

Ing. Vladimír Vietoris, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of storing and processing plant products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: vietoris@afnet.uniag.sk

Ing. Dagmar Kozelová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: dagmar.kozelova@uniag.sk