

Tworzenie biofilmu przez patogeny układu oddechowego w obecności solanek tężniowych

Biofilm Formation by Pathogens of the Respiratory Tract in the Brines Used in Graduation Towers

Aleksandra Burkowska-But, Natalia Jarzab, Maciej Walczak

Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

STRESZCZENIE

Wstęp: Patogeny układu oddechowego są w stanie przeżyć przez długi czas nawet w bardzo niesprzyjających warunkach środowiskowych, również w solankach wykorzystywanych w balneologii. Jednocześnie niesprzyjające warunki środowiskowe mogą stymulować tworzenie przez drobnoustroje biofilmów na różnych powierzchniach.

Materiały i metody: Sprawdzono możliwość tworzenia biofilmu przez potencjalne patogeny układu oddechowego (*Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*) na powierzchni płytek titracyjnych oraz na powierzchni gałązek tarniny, stanowiących element konstrukcyjny tężni. Badanie przeprowadzono w obecności solanek tężniowych czystych (5–27% NaCl) oraz wzbogaconych substancjami organicznymi (glukoza 0,25%, wyciąg drożdżowy 0,25%).

Wyniki: Zarówno *S. aureus* jak i *P. aeruginosa* tworzyły biofilm w solankach tężniowych na powierzchni płytek titracyjnych. W tych samych warunkach środowiskowych *P. aeruginosa* tworzył biofilm intensywniej niż *S. aureus*. Ilość wytworzonego biofilmu zmniejszała się wraz ze wzrostem zasolenia, natomiast obserwowano wzrost ilości wytworzonego biofilmu w solankach wzbogaconych w substancje odżywcze. W badanym czasie (24 godziny) *S. aureus* nie wytwarzał biofilmu na gałązkach tarniny. *P. aeruginosa* tworzył biofilm na gałązkach inkubowanych w solankach, ale tylko w warunkach zanieczyszczenia solanki substancjami organicznymi i w ograniczonym zakresie zasolenia.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykluczyły możliwość tworzenia biofilmu bakteryjnego przez badane patogeny układu oddechowego (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) na gałązkach tarniny w solankach tężniowych. Prawdopodobnie obecność garbników wyklucza możliwość formowania się biofilmu w warunkach otwartego inhalatorium.

Słowa kluczowe: tworzenie biofilmu, solanki, otwarte inhalatoria, patogeny, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Introduktion: The present study was aimed at determining whether *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, pathogens of the respiratory tract, can form a biofilm in mineral brines distributed in open inhalatoria in spa towns.

Material and Methods: The objective was to investigate biofilm formation on microtiter plates and on blackthorn twigs, construction elements of graduation towers. The research involved investigating pure brines (5–27% NaCl) and the brines supplemented with organic compounds (glucose 0.5% and yeast extract 0.5%). The general hydrolytic activity of biofilm was determined using fluorescein diacetate (FDA).

Results: Both *S. aureus* and *P. aeruginosa* formed a biofilm on the surface of microtiter plates in the brines collected from graduation towers. Under the same conditions *P. aeruginosa* formed a substantially higher amount of biofilm than *S. aureus*. The biofilm formation decreased with increasing salinity but increased in the environment supplemented with nutrients. Only *P. aeruginosa* formed a biofilm on blackthorn twigs incubated in the brines, and only when the brine was contaminated with organic compounds and had limited salinity (<9%).

Conclusions: The results of this research almost entirely excluded the possibility of biofilm formation by pathogenic *S. aureus* and *P. aeruginosa* on blackthorn twigs in the brines collected in spa towns Ciechocinek.

Key words: biofilm formation, brine, open inhalatoria, pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

WSTĘP

Drobnoustroje w środowisku naturalnym rzadko występują w postaci pojedynczych rozproszonych komórek. Najczęściej obserwowanym zjawiskiem jest tworzenie skupisk zwanych biofilmem lub też błoną biologiczną. Struktura ta przylega do powierzchni stałych lub powierzchni komórek innych organizmów. Taka forma bytowania drobnoustrojów stwarza im możliwość łatwiejszego dostępu do składników odżywczych, a także chroni komórki przed niekorzystnym wpływem szkodliwych czynników środowiskowych [1, 2]. Dlatego też biofilm może funkcjonować w warunkach, w których przetrwanie pojedynczych komórek byłoby trudne, a w wielu przypadkach nawet niemożliwe [3]. Zdolność do tworzenia biofilmu posiadają zarówno organizmy autotroficzne, jak i heterotroficzne, wśród których znajdują się także drobnoustroje chorobotwórcze [4].

W dostępnej literaturze wiele publikacji opisuje powstawanie biofilmów mikrobiologicznych w medycynie, ekosystemach wodnych czy sieciach wodociągowych i wynikających z tego potencjalnych zagrożeń. Brakuje jednak badań mających na celu analizę zagrożenia biofilmem mikrobiologicznym w obrębie szeroko rozumianej balneologii. Jest to samodzielna dziedzina wiedzy medycznej wykorzystująca do leczenia, profilaktyki, rehabilitacji i częściowo diagnostyki naturalne surowce lecznicze m.in. wody mineralne [5].

Na terenie Polski najpopularniejszym uzdrowiskiem opierającym się na leczeniu balneologicznym jest Ciechocinek, w którym jednymi z najlepiej rozpoznawalnych obiektów są tężnie solankowe. Są to unikatowe konstrukcje drewniane służące do odparowywania wody z solanki. Wokół tężni tworzy się bogaty w jod mikroklimat tworzący naturalne, lecznicze inhalatorium. Leczy się tutaj choroby narządów ruchu i reumatyczne, choroby układu krążenia, układu oddechowego i obwodowego układu nerwowego oraz choroby kobiece. Dla kuracjuszy przebywających każdego roku na terenie uzdrowiska mikrobiologiczna czystość emitowanego przez tężnie aerozolu jest bardzo istotna. Solanki rozprowadzane na tężniach, jak wszystkie wody głębinowe nie są wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych. W wodach głębinowych notuje się 10^3 - 10^7 bakterii/ml. Również w środowiskach silnie zasolonych, gdzie stężenie jonów NaCl przekracza 30%

notuje się obecność halofilnych archeonów oraz bakterii [6, 7, 8]. Dodatkowo podczas procesu transportu solanki ze źródła do tężni, rozprowadzania solanki po konstrukcji tężni, a także podczas spływu po gałązkach tarniny solanka ma nieustanny kontakt z mikroorganizmami znajdującymi się w środowisku, w tym również patogennymi.

Patogeny układu oddechowego są w stanie przeżyć przez długi czas nawet w bardzo niesprzyjających warunkach środowiskowych, w tym przy dużym zasoleniu środowiska. Jednocześnie niesprzyjające warunki środowiskowe mogą stymulować tworzenie przez drobnoustroje biofilmów na różnych powierzchniach. Przedstawione w niniejszej pracy badania są pierwszą próbą oceny, czy patogeny układu oddechowego – *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* – są zdolne do tworzenia biofilmu w środowisku leczniczych solanek stosowanych w otwartych inhalatoriach – tężniach ciechocińskich.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły wody lecznicze używane w otwartych inhalatoriach Ciechocinka. Bezpośrednio ze źródła nr 11 solanka pompowana jest do fontanny „Grzybek”. Tężnie stanowią drugi etap w procesie zateżniania solanki i produkcji soli. Wszystkie obiekty – fontanna i tężnie stanowią otwarte inhalatoria odwiedzane przez ponad 70 tys. kuracjuszy rocznie. Charakterystykę obiektów, z których pobierano solanki oraz solanek przedstawiono w tabeli 1.

Ideą eksperymentu była ocena wpływu stopnia zasolenia na powstawanie i rozwój struktury biofilmu tworzonej przez potencjalne patogeny układu oddechowego. W badaniach użyto dwa szczepy, potencjalne patogeny układu oddechowego: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (gronkowiec złocisty) i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (pałeczka ropy błękitnej).

Ocenie poddano także wpływ substancji odżywczych oraz rodzaj kolonizowanej powierzchni na proces powstawania biofilmu.

W tym celu przygotowano 3 warianty analizowanej solanki:

– czysta solanka (pozbawiona dodatkowej puli substancji odżywczych),

Tabela 1. Charakterystyka obiektów

| Obiekt | Długość [m] | Wysokość [m] | Szerokość [m] | Pojemność [m ³] | Koncentracja NaCl w solance [%] | Ruch kuracjuszy |
|---------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Fontanna „Grzyb” | 5 (średnica) | 3 | | 38 | 5 | bardzo intensywny |
| Tężnia numer 1 (T1) | 648 | 14 | 9 | 5 800 | do 9 | bardzo intensywny |
| Tężnia numer 2 (T2) | 719 | 16 | 9 | 6 300 | 22- 27 | umiarkowany |
| Tężnia numer 3 (T3) | 333 | 12 | 9 | 2 900 | do 16 | intensywny |

- solanka z dodatkiem wyciągu drożdżowego (źródło węgla i azotu) – końcowe stężenie 0,25%,
- solanka z dodatkiem glukozy (źródło węgla) – końcowe stężenie 0,25%.

Ilość powstałego biofilmu badano na typowej do tego celu powierzchni (płytki titracyjne) oraz na powierzchni gałązek tarniny, czyli na materiale, który stanowi wypełnienie tęźni.

Tworzenie biofilmu na powierzchni płytek titracyjnych oznaczano ilościowo stosując metodę opisaną przez Fleminga i wsp. (2009) oraz Kim i wsp. (2009) [9, 10]. Ilość wytworzonego biofilmu oznaczano z użyciem 1% fioletu krystalicznego i mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm. Wynik podano jako wielkość absorbancji.

Klasyfikację obfitości biofilmu wykonano zgodnie z propozycją Stepanovic (2007) [11].

Gałązki użyte do oceny tworzenia biofilmu bakteryjnego pochodziły z krzewu tarniny (*Prunus spinosa*). Fragmenty gałązek o długości 2 cm i średnicy 3 mm umieszczano w studzienkach 24-dołkowej płytki titracyjnej, napełniano odpowiednią zawiesiną bakteryjną w solance w objętości równej 2 ml. W celu zapobiegania wnikaniu solanki do wewnętrznych tkanek badanego materiału końce każdej z gałązek zaślepiono parafiną. Płytki następnie inkubowano statycznie w temperaturze 20°C przez 24h. Po inkubacji gałązki przenoszono do nowej sterylnej płytki i przeprowadzono analizę tworzenia biofilmu na powierzchni gałązki stosując metodę opisaną powyżej.

Dla wszystkich układów doświadczalnych, w których notowano tworzenie biofilmu oznaczano także ogólną aktywność hydrolityczną biofilmu metodą z wykorzystaniem dwuoctanu fluoresceiny (FDA) [12]. Ilość uwolnionej fluoresceiny, która jest miarą aktywności hydrolitycznej biofilmu, mierzono używając spektrofotometru Hitachi F – 2500, przy długości fali emisji 505 nm i fali wzbudzenia 480 nm.

WYNIKI

Analiza powstawania biofilmu na powierzchni płytek titracyjnych potwierdziła zdolność do formowania tej struktury zarówno przez szczep *Staphylococcus aureus*, jak i *Pseudomonas aeruginosa*. W środowisku czystym wytwarzanie biofilmu przez *S. aureus* zaobserwowano jedynie w solance pochodzącej z fontanny „Grzyb”, czyli w próbie o najniższej zawartości NaCl (5%). W środowisku wzbogaconym glukozą i ekstraktem drożdżowym obserwowano we wszystkich rodzajach solanki słabą produkcję biofilmu (ryc. 1).

Bakterie *P. aeruginosa* były zdolne do wytwarzania biofilmu we wszystkich badanych solankach – zarówno wzbogaconych w substancje organiczne, jak i czystych. W solankach pochodzących z fontanny „Grzyb” oraz z T1 wzbogaconych w glukozę notowano biofilm na średnim poziomie. Natomiast w solance z fontanny „Grzyb” wzbogaconej o ekstrakt drożdżowy stwierdzono silne wytwarzanie biofilmu.

Przeprowadzone badania wykazały, że na ilość wytwarzanego biofilmu wpływa stężenie solanki oraz obecność substancji organicznych w środowisku. Ilość powstałego biofilmu zmniejsza się wraz ze wzrostem zasolenia, natomiast znaczny wzrost ilości wytwarzanego biofilmu obserwowany jest w środowisku

wodnym wzbogaconym w substancje odżywcze. Dodatkowo wykazano, że w tych samych warunkach środowiskowych ilość biofilmu utworzonego przez *P. aeruginosa* jest większa niż ilość biofilmu zbudowanego przez *S. aureus*.

Również rodzaj podłoża odgrywa istotną rolę podczas tworzenia biofilmu [13]. Wzrost porowatości powierzchni materiału wiąże się bezpośrednio ze zwiększoną adhezją komórek mikroorganizmów [14]. Jednak analiza wyników tworzenia biofilmu na powierzchni gałązek tarniny nie potwierdziła wyżej opisanych założeń. Mimo, iż analizowana powierzchnia cechowała się dużą porowatością ilość powstałego biofilmu była śladowa. W przypadku *S. aureus* minimalną ilość biofilmu utworzył się jedynie na gałązkach tarniny w obecności solanki z tęźni T1 wzbogaconej o glukozę. Bakterie *P. aeruginosa* wykazywały zdolność tworzenia biofilmu na powierzchni tarniny także tylko w środowisku wzbogaconym o składniki odżywcze. W czystej solance tęźniowej nie obserwowano powstawania biofilmu *P. aeruginosa* na tarninie. Prawdopodobnie jest to konsekwencją właściwości tej rośliny.

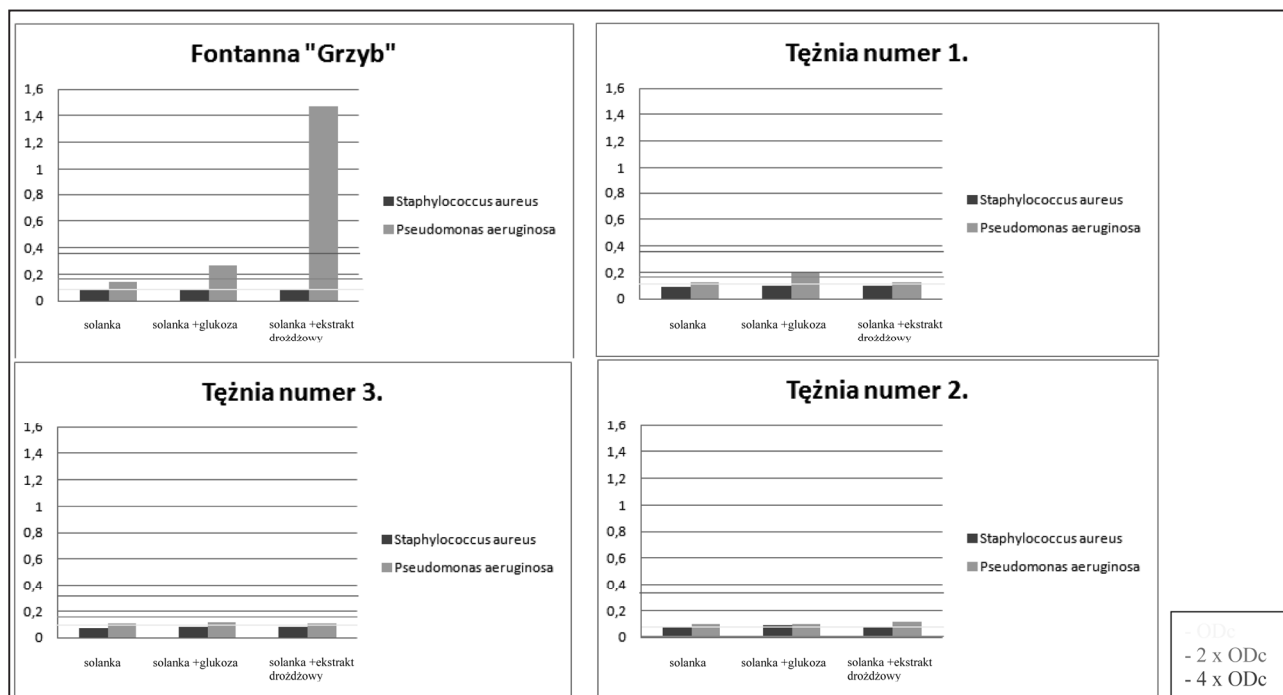
Śliwa tarnina (*Prunus spinosa*) od dawna stosowana jest jako roślina lecznicza [15]. Jej działanie lecznicze jest wynikiem obecności w liściach, korze oraz owocach niskocząsteczkowych związków o charakterze fenolowym, tzw. garbników roślinnych. Fizjologiczna rola garbników nie jest do końca poznana, ale wiadomo, że pełnią one rolę antyseptyków chroniących roślinę przed grzybami i owadami [16, 17]. W tkankach *P. spinosa* stwierdzono obecność m.in. kumaryny, flawonoidów, izoprenoidowych glikozydów, proantocyjanidyn, długołańcuchowych estrów kwasów tłuszczowych i terpenoidów. Jednocześnie stwierdzono, że ekstrakty z tkanek tarniny wykazują aktywność bakteriobójczą przeciwko bakteriom Gram dodatnim (*Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*) oraz Gram ujemnym (*Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*) [18, 19].

Podczas naszych badań pewne związki były uwalniane z kory gałązek do analizowanej solanki, o czym świadczyło czerwone zabarwienie widoczne w studzienkach płytki titracyjnej. W konsekwencji spowodowało to ograniczony rozwój szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa* oraz hamowanie procesu tworzenia biofilmu.

Aktywność hydrolityczną biofilmu wytworzonego przez *S. aureus* zaobserwowano jedynie w solance pochodzącej z fontanny „Grzyb” wzbogaconej o ekstrakt drożdżowy. W pozostałych badanych solankach – zarówno wzbogaconych w substancje organiczne, jak i czystych aktywności hydrolitycznej biofilmu nie odnotowano.

Aktywność hydrolityczną biofilmu wytworzonego przez *P. aeruginosa* na powierzchni płytek titracyjnych stwierdzono w obecności solanki z fontanny „Grzyb” oraz tęźni nr 1 (stężenie NaCl < 9%), wzbogaconych ekstraktem drożdżowym. W pozostałych rodzajach solanki nie zaobserwowano aktywności hydrolitycznej biofilmu. Jednocześnie biofilm wytworzony przez *P. aeruginosa* wykazywał zdecydowanie większą aktywność hydrolityczną niż biofilm *S. aureus* (tab. 2).

Nie notowano natomiast aktywności hydrolitycznej biofilmu utworzonego przez *S. aureus* i *P. aeruginosa* na gałązkach tarniny (tab. 2).



Rycina 1. Ilość biofilmu wytworzonego na powierzchni płytki titracyjnej przez *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 2. Aktywność hydrolityczna biofilmu utworzonego w solankach

| Szczep | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | |
|------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | czysta solanka | solanka + glukoza | solanka + ekstrakt drożdżowy | czysta solanka | solanka + ekstrakt drożdżowy | solanka + ekstrakt drożdżowy |
| Fontanna „Grzyb” | brak aktywności | brak aktywności | 0,016* | brak aktywności | brak aktywności | 1,106 |
| Tężnia numer 1 | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | 0,808 |
| Tężnia numer 2 | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności |
| Tężnia numer 3 | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności | brak aktywności |

W naszych badaniach ocena aktywności hydrolitycznej z zastosowaniem FDA wykazała obecność biofilmu aktywnego metabolicznie jedynie w próbach o najniższym stężeniu soli (< 9%) i zawierających dodatkową pulę składników odżywczych (wyciąg drożdżowy). Oznacza to, że w pozostałych układach doświadczalnych biofilm powstaje, ale warunki środowiskowe są na tyle niekorzystne (szczególnie stężenie NaCl), że uniemożliwiają aktywne funkcjonowanie komórek bakteryjnych nawet w postaci biofilmu. Może to także oznaczać, że powstający biofilm składa się głównie z martwych lub nieaktywnych komórek.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania w zasadzie wykluczyły możliwość tworzenia biofilmu bakteryjnego przez badane patogeny układu oddechowego (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) na gałązkach tarniny w solankach tężniowych w Ciechocinku. Proces powstawania biofilmu, zaobserwowano głównie na powierzchni płytek titracyjnych. W warunkach takich, jakie występują w naturalnych otwartych inhalatoriach, czyli w solankach czystych na gałązkach tarniny, biofilm nie powstawał. Ma to istotne znaczenie dla funkcjonowania inhalatoriów największego uzdrowiska nizinnego na terenie Polski. Wybór

tarniny jako materiału wypełniającego tężnie jest słuszny, nie tylko ze względów techniczno-konstrukcyjnych. Obecność garbników wyklucza możliwość formowania się biofilmu co sprawia, że otoczenie tężni jest bezpieczne dla kuracjuszy i licznych turystów. Należy jednak zauważyć, że potencjalne zanieczyszczenie solanek stosowanych na tężni może ułatwić formowanie się biofilmu bakteryjnego. Z tego względu konieczna jest stała kontrola solanek tężniowych na terenie uzdrowiska w celu wykluczenia możliwości powstawania biofilmu.

Piśmiennictwo

1. Czaczyk K, Myszk K. Mechanisms determining bacterial biofilm resistance to antimicrobial factors. *Biotechnol.* 2007;1:40-52.
2. Kosikowska U, Malm A. Biofilm *in vivo* – intrygujące wyzwanie dla nauki. *Farm Pol.* 2004;60: 291-297.
3. Furowicz A, Boroń-Kaczmarek A, Ferlas M et al. Bacterial biofilm and other elements and mechanisms for survival of microbes in extreme environments. *Med Wet.* 2010;66:444-448.
4. Kołwzan B. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania, *Ochrona Środowiska.* 2011;33:1-12.
5. Helbin J, Kolarzyk E. Wykorzystanie walorów środowiska naturalnego w wspomaganiu leczenia farmakologicznego. *Probl Hig Epidemiol.* 2005;86:22-26.
6. Anton J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F et al. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar saltern. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:3052-3057.
7. Maturrano L, Santos F, Rosselló-Mora R et al. Microbial diversity in maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:3887-3895.
8. Pappa A, Sánchez-Porro C, Lazoura P et al. *Bacillus halochares* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:1432-1436.
9. Fleming K, Klingenberg C, Cavanagh JP et al. High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:136-145.
10. Kim Y, Wang X, Ma Q et al. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol.* 2009;191:1258-1267.
11. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *AMPIS.* 2007;115:891-899.
12. Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol Biochem.* 2001;33:943-951.
13. Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN et al. Biofilm: Importance and applications. *Indian J of Biotechnol.* 2009;8:59-168.
14. Sawhney R, Berry V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview *Indian J Med Sci.* 2009;63:313-321.
15. Tagarelli G, Tagarelli A, Piro A. Folk medicine used to heal malaria in Calabria (southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomed.* 2010;6:27-43.
16. Veličković JM, Kostić DA, Stojanović GS et al. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijaska industrija.* 2014;
17. Radovanović BC, Milenković Anđelković AS, Radovanović AB et al. Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropic J Pharm Res.* 2013;12:813-819.
18. Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M et al. Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia.* 2004;75: 77-80.
19. Gündüz GT. Antimicrobial activity of sloe berry purees on *Salmonella* spp. *Food Control.* 2013;32:354-358.

Wkład autorów:

Według kolejności

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów

Pracę nadesłano: 07.06.2015

Zaakceptowano: 20.08.2015

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Natalia Jarzab

Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
e-mail: jarzab@doktorant.umk.pl
tel.: 56 611-25-24