

KATARZYNA CZACZYK, ANNA OLEJNIK, PATRYK MIĘŻAŁ, WŁODZIMIERZ GRAJEK

## **POSZUKIWANIE PROSTYCH MODELI DO BADANIA ADHEZJI BAKTERII PROBIOTYCZNYCH**

### Streszczenie

Przeprowadzono studia porównawcze nad możliwością zastąpienia w badaniach adhezji bakterii mlekowych modelu kultury komórek nabłonka jelitowego innymi uproszczonymi modelami. Badano przyczepność bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1 oraz *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 do membran wykonanych z alginianu, karagenu, żelatyny, kolagenu, szkła, polistyrenu i karboksymetylocelulozy.

Zaobserwowano największy stopień przyczepności bakterii probiotycznych do membran wykonanych z karboksymetylocelulozy i kolagenu. W większości wariantów doświadczeń liczba przyczepionych komórek bakteryjnych wzrastała wraz ze wzrostem czasu ich kontaktu z powierzchnią stałą. Wykazano także różnice w przyczepności komórek do hydrożeli o różnych stężeniach. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że stopień adhezji bakterii probiotycznych do różnych powierzchni organicznych i nieorganicznych jest cechą zależną od szczepu mikroorganizmu. Żaden z prostych modeli adhezyjnych, zastosowanych w tej pracy, nie charakteryzował się adhezyjnością porównywalną z komórkami nabłonka jelitowego Caco-2 i HT-29, stosowanego obecnie jako główny model *in vitro* do badań adhezji bakterii probiotycznych.

**Słowa kluczowe:** adhezja, *Lactobacillus*, alginian, karagen, kolagen, karboksymetyloceluloza.

### Wstęp

Zdolności adhezyjne bakterii probiotycznych są uważane za jedną z najbardziej pożądanych cech tych drobnoustrojów, gdyż warunkują one długotrwałe ich przebywanie w przewodzie pokarmowym człowieka i tym samym przedłużony wpływ na jego zdrowie. Dzieje się tak nawet wówczas, gdy adhezja bakterii ma charakter przejściowy i nie kończy się trwałą kolonizacją jelit [19, 21]. Z tego powodu badania nad zdolnościami adhezyjnymi bakterii, obok badań nad ich przeżywalnością

w środowisku o niskim pH oraz w obecności żółci i enzymów trawiennych, stanowią podstawowy etap w pracach naukowych z tej dziedziny [1, 4, 5, 22].

Najczęściej stosowanym modelem do badań adhezji bakterii są jednowarstwowe kultury nabłonka jelitowego *in vitro*, szczególnie linii komórkowych Caco-2 i HT-29. Kultury nabłonkowe, mimo że są biologicznie najbardziej zbliżone do nabłonka jelitowego *in vivo*, trudno uznać za łatwy model badawczy. Ich hodowla wymaga specjalistycznej aparatury, jest długotrwała i bardzo kosztowna [4, 22]. Stąd od dawna poszukiwane są modele, które cechuje prostota i niskie koszty badań, a przy tym możliwie wiernie imitujące adhezję w przewodzie pokarmowym. Zagadnieniom związanym z adhezją mikroorganizmów do różnorodnych powierzchni poświęcono bogate piśmiennictwo naukowe [2, 6, 14, 18]. W tym kontekście można wymienić badania nad adhezją drobnoustrojów do powierzchni zębów, skóry, implantów, osadu czynnego, gleby, urządzeń inżynierskich, opakowań, produktów spożywczych i wielu innych. Część zjawisk związanych z adhezją mikroorganizmów do ciał stałych należy uznać za zjawisko niekorzystne (korozja mikrobiologiczna, skażenie powierzchni kontaktujących się z żywnością, zakażenia szpitalne), natomiast część można uznać za zjawisko pożądane (kolonizacja jelit, fermentacja żywności i pasz, udział mikroorganizmów w tworzeniu próchnicy w glebie) [6, 9, 12].

Adhezją w sensie biologicznym nazywa się trwałe i nieodwracalne połączenie się komórki drobnoustroju z powierzchnią ciała stałego. Pierwszą teorią zastosowaną do wytłumaczenia interakcji występujących w procesie adhezji bakterii była teoria DLVO, której nazwa pochodzi od pierwszych liter nazwisk jej autorów (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) [10]. Teoria ta była pierwotnie sformułowana do wyjaśnienia adhezji koloidów i dopiero później adaptowana do opisu adhezji mikroorganizmów. Teoria ta wskazuje na kluczową rolę dwóch rodzajów oddziaływań: przyciągających sił van der Waalsa oraz odpychających sił elektrostatycznych związanych z podwójną warstwą elektronową wokół komórki. Siły te działają na dystansie od 1 do 50 nm i decydują o zbliżeniu komórek do powierzchni ciał stałych na tyle blisko, aby powstały wiązania chemiczne trwale łączące oba obiekty. Całkowita wolna energia interakcji między komórką a powierzchnią ciała stałego jest wypadkową obu sił i decyduje ona o możliwości zbliżenia komórki bakteryjnej do ciała stałego. Największe przyciąganie występuje w obszarze tzw. pierwszego minimum energetycznego, które występuje na bardzo małej odległości od ciała stałego, rzędu 1 nm. Minimum to jest oddzielone od drugiego minimum energetycznego obszarem dodatniej energii, która odpowiada za odpychanie komórki od obiektu. Pokonanie tego niekorzystnego obszaru zależy w dużym stopniu od kształtu komórek. Im mają one mniejszy promień w miejscu styku obu powierzchni, tym łatwiej pokonać komórce bakteryjnej siły odpychania i przejść z drugiego do pierwszego obszaru minimum energetycznego. Oznacza to faworyzowanie w procesach adhezji komórek o kształtach wydłużonych oraz mających wydłużone struktury powierzchniowe, takie jak fimbrie i rzęski [11, 13]. Wobec powyższego można uznać, że komórki pałeczek bakterii kwasu mlekowego mają kształt ułatwiający

zbliżenie do powierzchni ciała stałego. Podobne znaczenie mają nierówności na powierzchni ciała stałego – ciała szorstkie, o nieregularnej powierzchni są szybciej zasiedlane przez bakterie niż ciała o powierzchni gładkiej [6, 9].

Teoria DLVO nie uwzględnia interakcji występujących na średnich odległościach. Są to głównie siły związane z ruchami Browna oraz interakcje hydrofobowe. Te ostatnie mają szczególnie duże znaczenie w środowisku wodnym. Van Oss [24] zaproponował uogólnioną teorię rozszerzającą teorię DLVO o brakujące oddziaływania na średnich odległościach (teoria ta jest znana pod nazwą XDLVO [3]).

Obok wymienionych interakcji istotną rolę w adhezji komórek do powierzchni ciała stałego odgrywają wydzieliny komórkowe o charakterze polimerów. Składają się one z polisacharydów, glikoprotein, liposacharydów i kwasów uronowych [8, 15]. Tworzą swoistą otoczkę polimerową, która bardzo często utrudnia fizyczne zbliżenie komórki do ciała stałego [3, 23]. Właściwości takie mają niektóre gatunki drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*. Znane są jednak liczne przypadki, w których glikokaliks otaczający komórkę (np. *Pseudomonas fluorescens*) wręcz ułatwia jej „zakotwiczenie” na powierzchni ciała stałego.

W połączeniu komórki bakteryjnej z powierzchnią danego ciała biorą udział swoiste substancje chemiczne, zwane adhezynami. W warunkach naturalnych panujących w przewodzie pokarmowym adhezyny bakteryjne łączą się swoiście z receptorami znajdującymi się na powierzchni enterocytów jelitowych oraz w śluzie jelitowym [22]. Receptory te zawierają zwykle w swej strukturze węglowodany. Adhezyny mają charakter białkowy i najobficiej występują na powierzchni organelli ruchowych (fimbrie) oraz w warstwach powierzchniowych ścian komórkowych [7, 12, 17]. Istotną rolę w adhezji odgrywają także składniki ścian komórkowych, takie jak peptydoglikan lub mureina. Warstwa mureiny może być otoczona ściśle ułożonymi cząsteczkami białka, a w jej wielowarstwową strukturę wplecione są wielocukry mające ładunek elektryczny i kwasy tejchojowe. W ścianie wielu bakterii gramodatnich są też cząsteczki kwasów lipotejchojowych zakotwiczone częścią lipidową w błonie cytoplazmatycznej, leżącą pod mureiną. Uważa się, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mogą przylegać do powierzchni ciał stałych za pośrednictwem struktur powierzchniowych zawierających kwasy tejchojowe i lipotejchojowe związane z peptydoglikanem ściany komórkowej [13, 20, 22].

Proces adhezji mikroorganizmów do powierzchni stałych przebiega w sposób wielostopniowy. Pierwszy etap, poprzedzający właściwą adhezję drobnoustrojów, stanowi przyłączanie się substancji organicznych i nieorganicznych do miejsc obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Są to różne grupy polarne lub jony metali występujących na powierzchni ciała stałego. Gromadzenie się substancji organicznych tworzy swoisty gradient pokarmowy skoncentrowany przy powierzchni ciała stałego, co stwarza dogodne warunki do rozwoju bakterii i w konsekwencji sprzyja adhezji bakterii i tworzeniu biofilmu [23, 24].

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie prostego modelu do badań nad adhezją bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym człowieka. W tym celu przeprowadzono badania nad adhezją komórek trzech znanych szczepów bakterii probiotycznych do powierzchni różnych ciał stałych i porównano ją z adhezją tych samych mikroorganizmów do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*.

## **Materiał i metody badań**

### *Mikroorganizmy*

W badaniach zastosowano trzy szczepy bakterii probiotycznych: *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1 i *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Bakterie hodowano w warunkach względnie beztlenowych na pożywce MRS w temp. 30°C przez 20 h. Do badań nad adhezją wykorzystano komórki z logarymicznej fazy wzrostu po ich odwirowaniu (5000 g, 10 min).

### *Komórki nabłonkowe i metoda ich hodowli*

Komórki nabłonka jelitowego linii Caco-2 (ATTC HTB 37) hodowano w pożywce DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Sigma), wzbogaconej w 20% płodową surowicę bydlęcą (FBS, Gibco BRL), inaktywowaną termicznie (56°C, 30 min.), 1% zestaw aminokwasów endogennych 100X (NEAA, Sigma) i 50 mg l<sup>-1</sup> gentamycyny (Gibco BRL). Komórki nabłonka jelitowego linii HT-29 (ATTC HTB 38) hodowano w pożywce bezsurowiczej, wzbogaconej w 10% dodatek płodowej surowicy bydlęcej. W trakcie hodowli pożywkę wymieniano na świeżą co drugi dzień. Hodowlę komórek Caco-2 prowadzono przez 21 dni, a HT-29 przez 10 dni w 6-dołkowych płytkach polistyrenowych (Nunc), w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza. Eksperymenty prowadzono w trzech powtórzeniach.

### *Przygotowanie powierzchni stałych*

1. Płytki polistyrenowe, firmy Becton Dickinson and Company (Multiwell™), pakowane sterylne, stosowano bezpośrednio, bez dodatkowej obróbki wstępnej.
2. Mikroskopowe szkiełka nakrywkowe, wykonane ze szkła borosilikatowego, odtłuszczano przez gotowanie z dodatkiem mydła szarego przez 1 h, przepłukiwano kilkakrotnie wodą destylowaną, moczone w roztworze 0,1 N NaOH przez 24 h, ponownie przepłukiwano wodą destylowaną, po czym moczone w 0,02% fosforanie trójsodowym przez 24 h, przepłukiwano wodą [16] i umieszczano w dołkach płytki polistyrenowej.
3. Karagen (Sigma) przygotowywano w formie 1, 2 i 3% roztworów, którymi zalano dołki płytki polistyrenowej, uzyskując jednolitą powierzchnię żelu karagenowego do badań nad adhezją.
4. Alginian (Sigma) przygotowano przez wprowadzenie 0,5 i 1% roztworów alginianu sodowego do dołków płytki polistyrenowej i zestalenie ich do postaci

- żelu poprzez zalanie 4% roztworem chlorku wapnia. Nadmiar roztworu wapnia usuwano, a powierzchnie przemywano jałową wodą destylowaną.
5. Kolagen (Millicell-PCF, Millipore), naniesiony na membranę poliwęglanową, umieszczano w dołkach płytki polistyrenowej.
  6. Karboksymetylocelulozę (Millicell-CM, Millipore) stosowano w formie krążków umieszczonych w dołkach płytki polistyrenowej.
  7. Żelatyna (Sigma) była przygotowana w formie 5 i 10% roztworów, które w temp. 37 i 20°C zachowały formę lepkiej cieczy bez widocznego żelowania.

#### *Test na adhezję bakterii do ciał stałych*

Ciała stałe i hydrożele umieszczano w 6-dołkowych płytkach polistyrenowych i zalewano zawiesiną komórek bakteryjnych o gęstości  $1 \cdot 10^6$  jtk/ml, pozostawiając je w temp. 37°C przez 1, 2 i 8 h. W celu ograniczenia zakażeń zewnętrznych płytki pokrywano parafilmem. Po czasie inkubacji dołki przemywano dwukrotnie 2 ml buforu PBS i dokonywano liczenia przyczepionych komórek. W tym celu powierzchnię wraz z drobnoustrojami wybarwiano oranżem akrydyny (0,01%) przez 2 min i przemywano wodą destylowaną. Bakterie przyczepione do badanej powierzchni liczono z 10 pól widzenia za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (CARL-ZEISS, Axiovert 200, Niemcy).

#### *Test na adhezję bakterii do komórek nabłonka jelitowego in vitro*

Komórki bakteryjne hodowane w pożywce MRS wirowano (5000 g, 10 min), dwukrotnie przemywano buforem PBS (pH = 7,2) i rozcieńczano do gęstości populacji  $1 \cdot 10^6$  jtk/cm<sup>3</sup> w pożywce DMEM bez dodatku antybiotyku. Do każdego dołka w płytce, do kultur tkankowych dodawano 1 ml zawiesiny bakteryjnej. 21-dniowa kultura Caco-2 i 10-dniowa kultura HT-29, wyhodowane w dołkach 6-dołkowej płytki, były dwukrotnie przemywane buforem PBS. Do każdego z dołków w płytce dodawano 1 ml inoculum bakteryjnego i płytkę inkubowano w warunkach beztlenowych w temp. 37°C przez 1h. Następnie usuwano pożywkę DMEM i monowarstwę enterocytów przemywano trzykrotnie buforem PBS w celu usunięcia niezwiązanych bakterii. Po ostatnim przemyciu komórki Caco-2 zostały delikatnie odklejone przez trypsynizację i odwirowane oraz poddane działaniu 1% Triton X-100 przez 5 min w celu przeprowadzenia lizy komórek enterocytów. Bakterie przyczepione do enterocytów były oznaczane metodą płytkową po odpowiednim dziesiętnym rozcieńczeniu. Hodowlę bakterii prowadzono w warunkach względnie beztlenowych, na podłożu MRS, w temp. 30°C.

#### **Wyniki i dyskusja**

W przedstawionej pracy zbadano adhezję bakterii probiotycznych do powierzchni ciał stałych, takich jak: hydrożele typu alginian, karagen, żelatyna, kolagen oraz szkło,

polistyren i karboksymetyloceluloza. Stopień adhezji bakterii kwasu mlekowego oceniano na podstawie liczebności komórek bakteryjnych przyczepionych do 1 cm<sup>2</sup> powierzchni po 1, 2 i 8 h inkubacji. Określono także stopień adhezji badanych szczepów bakterii do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*.

*Adhezja bakterii z rodzaju Lactobacillus do powierzchni polistyrenu i szkła*

W pierwszym etapie badań określono możliwości adhezji dwudziestogodzinnej hodowli komórek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* oraz *Lactobacillus rhamnosus* do powierzchni polistyrenu i szkła. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Wyniki doświadczeń wskazują jednoznacznie, że badane szczepy bakterii mlekowych nie wykazały adhezji do powierzchni polistyrenu. Również adhezja do szkła borosilikatowego została oceniona jako bardzo mała. Komórki *L. casei* w ogóle nie przyłączyły się do powierzchni szkła, a pozostałe dwa szczepy wykazały adhezję rzędu 13–26 komórek/cm<sup>2</sup>.

Tabela 1

Adhezja bakterii do powierzchni polistyrenu i szkła.  
Bacterial adhesion to polystyrene and glass surfaces.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to a given surface (after 1h of exposure) [jtk/cm <sup>2</sup> ] / [cfu/cm <sup>2</sup> ]	
	Polistyren Polystyrene	Szkło Glass
<i>L. casei</i> Shirota	0	0
<i>L. acidophilus</i> LC1	0	26 (± 7)
<i>L. rhamnosus</i> GG	0	13 (± 3)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Podobne badania prowadzili Boonaert i wsp. [5], którzy testowali zdolności adhezyjne bakterii *Lactococcus lactis* do powierzchni polistyrenu i szkła. Autorzy ci wykazali, że adhezja tych bakterii kształtowała się na poziomie 10<sup>6</sup> jtk/cm<sup>2</sup>, a decydujący wpływ na zjawisko miała faza wzrostu mikroorganizmów (większa w fazie stacjonarnej w porównaniu do logarytmicznej fazy wzrostu). W naszych badaniach w ogóle nie stwierdzono przyczepności badanych szczepów *Lactobacillus* do tego materiału. W przypadku adhezji bakterii *L. lactis* do szkła nie obserwowano już zależności związanej z wiekiem populacji bakteryjnej. Autorzy ci wskazali także na niekorzystny wpływ przemywania komórek buforem PBS, wynikający z ekstrakcji białek i kwasów nukleinowych. W rezultacie dochodziło do lizy części komórek bakteryjnych. Zagadnienie to wymaga jednak wyjaśnienia, gdyż PBS jest powszechnie stosowany do przemywania komórek bakteryjnych, szczególnie przy wykorzystaniu nabłonkowych kultur komórkowych. W pracy tej zwrócono także uwagę na istotną

rolę w adhezji metabolitów wydzielanych przez komórki, czego nie uwzględnia model DLVO [3]. Należy podkreślić także, że adhezja *L. lactis* do szkła była mniejsza niż do polistyrenu. Flint i wsp. [9] określili wydajność adhezji bakterii *Streptococcus thermophilus* do szkła na poziomie  $10^7$  jtk/cm<sup>2</sup> i była ona większa niż do różnych rodzajów stali kwasoodpornych. Studia nad adhezją ośmiu szczepów bakterii należących do rodzajów *Escherichia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Bacillus* do szkła borosilikonowego wykazały, że wydajność adhezji wynosiła  $10^5$ – $10^7$  jtk/cm<sup>2</sup> [14].

#### Adhezja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do powierzchni membrany karboksymetylocelulozowej, kolagenu i żelatyny

W kolejnym etapie doświadczeń określono adhezję badanych mikroorganizmów do powierzchni membrany wykonanej z karboksymetylocelulozy lub z kolagenu. Kontakt bakterii z obu powierzchniami trwał 1 h. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 2.

Uzyskane dane wskazują, że wszystkie trzy badane szczepy probiotyczne wykazały zdolność do przyczepienia się zarówno do karboksymetylocelulozy, jak i do kolagenu. Porównując obie powierzchnie należy stwierdzić, że adhezja do karboksymetylocelulozy była zdecydowanie większa niż do kolagenu. Obserwacja ta dotyczyła szczególnie *L. rhamnosus* GG, gdyż przyczepność tych bakterii do karboksymetylocelulozy była 25-krotnie większa od przyczepności do kolagenu. W przypadku *L. casei* Shiota różnica była 10-krotna. Najmniejszą przyczepność do kolagenu wykazał szczep *L. acidophilus*. Większa przyczepność bakterii do powierzchni karboksymetylocelulozy może być tłumaczona większą porowatością jego powierzchni. Ciekawe badania nad adhezją bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* prowadzili Aleljun i wsp. [1]. Przetestowali oni przyczepność ponad stu szczepów bakteryjnych do kolagenu typu I i wykazali, że zdolność tę wykazało ok. 75% badanych szczepów, w tym również szczepy należące do gatunków *L. casei*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*. Autorzy ci wskazali także na zależność między właściwościami adhezyjnymi a wiekiem kultury u niektórych szczepów. Maksimum przyczepności obserwowali we wczesnej fazie stacjonarnej. Nieznaczny wpływ na adhezję bakterii miała także pożywka hodowlana i jej pH. Autorzy ci zwracają uwagę na powszechną zdolność pałeczek mlekowych do adhezji do kolagenu, co jest cechą inwazyjnych szczepów bakterii chorobotwórczych. Zwracają oni przy tym uwagę na fakt, że badane przez nich szczepy nie przyczepiały się do fibronektyny.

Tabela 2

Adhezja bakterii do powierzchni karboksymetylocelulozy i kolagenu.  
Bacterial adhesion to carboxymethylcellulose and collagen surfaces.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to a given surface (after 1h of exposure) [jtk/cm <sup>2</sup> ] / [cfu/cm <sup>2</sup> ]
------------------	--

	Karboksymetyloceluloza Carboxymethylcellulose	Kolagen Collagen
<i>L. casei</i> Shirota	12568 (± 1756)	1211 (± 98)
<i>L. acidophilus</i> LC1	4764 (± 1430)	737 (± 56)
<i>L. rhamnosus</i> GG	36953 (± 4680)	1474 (± 102)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Próba przeprowadzenia doświadczeń nad adhezją bakterii do żelatyny nie powiodła się z uwagi na trudności w uzyskaniu struktury żelowej w temperaturze 20°C i 37°C.

*Adhezja bakterii z rodzaju Lactobacillus do powierzchni żelu karagenowego*

Dogodną powierzchnią do adhezji bakterii mogą być, obok kolagenu, także inne hydrożele. W związku z tym w pracy przebadano zdolność bakterii mlekowych do zasiedlania karagenu. W badaniach tych uwzględniono różny czas ekspozycji oraz różną gęstość hydrożelu. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tab. 3.

Przyczepność badanych szczepów bakterii do karagenu należy ocenić jako małą, rzędu 2-4 cykli logarytmicznych w przeliczeniu na 1 cm<sup>2</sup>. Odnosi się to szczególnie do adhezji szczepów *L. acidophilus* LC1 i *L. rhamnosus* GG do 1% żelu karagenowego. Wyniki badań wskazują jednak, że dużą rolę w adhezji odgrywa czas kontaktu bakterii z zasiedlaną powierzchnią oraz gęstość stosowanego żelu. Przy zastosowaniu 1% karagenu w pierwszych dwóch godzinach ekspozycji liczba przyczepionych bakterii była podobna, jednak po 8 h obserwowano znaczący wzrost adhezji.

Wraz ze wzrostem gęstości żelu wyraźny był wzrost liczby przyczepionych bakterii. Podobną zależność odnotowano w stosunku do czasu ekspozycji, gdyż wydłużenie kontaktu bakterii z powierzchnią karagenu zwiększyło liczbę związanych z nią komórek. Do wyników tych należy jednak podejść z pewną ostrożnością, bowiem zwiększenie liczebności bakterii na powierzchni karagenu po 8 h inkubacji może być wynikiem rozmnażania się bakterii, które przyczepiły się do tej powierzchni w początkowym okresie. Sugeruje to brak różnic w adhezji do 1% żelu między 1. i 2. h ekspozycji, jednakże wyniki uzyskane przy zasiedlaniu 3% żelu wydają się tej hipotezie zaprzeczać, gdyż różnice w liczbie związanych komórek między 1. a 8. h ekspozycji są bardzo małe.

T a b e l a 3

Wpływ gęstości żelu i czasu ekspozycji na adhezję bakterii do powierzchni karagenu.  
The effect of gel concentration and exposure time on the bacterial adhesion to a carrageenan surface.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni Number of bacteria adhering to a given surface [jtk/cm <sup>2</sup> ] / [cfu/cm <sup>2</sup> ]
------------------	--

	1 h	2 h	8 h
	1% karagen 1% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	145 (± 12)	146 (± 15)	711 (± 68)
<i>L. acidophilus</i> LC1	33 (± 5)	39 (± 7)	375 (± 31)
<i>L. rhamnosus</i> GG	26 (± 4)	26 (± 3)	230 (± 19)
	2% karagen 2% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	439 (± 40)	684 (± 59)	1684 (± 113)
<i>L. acidophilus</i> LC1	592 (± 43)	948 (± 102)	1263 (± 120)
<i>L. rhamnosus</i> GG	355 (± 32)	1250 (± 94)	1559 (± 126)
	3% karagen 3% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	1440 (± 105)	1487 (± 100)	1531 (± 150)
<i>L. acidophilus</i> LC1	853 (± 62)	1238 (± 109)	2171 (± 113)
<i>L. rhamnosus</i> GG	753 (± 33)	1341 (± 110)	2421 (± 201)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

#### Adhezja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do powierzchni żelu alginianowego

Drugim badanym hydrożelem roślinnym był alginian. Doświadczenia objęły dwie zmienne: stężenie alginianu oraz czas ekspozycji. W przypadku alginianu zależności nie były tak jednokierunkowe, jak to miało miejsce w przypadku karagenu, niemniej odnotowano wiele podobieństw. W zdecydowanej większości przypadków zwiększenie stężenia alginianu z 0,5% do 1% spowodowało zwiększenie liczby bakterii, które uległy adhezji (tab. 4).

Wpływ czasu ekspozycji na adhezję bakterii był już bardziej złożony. Na ogół obserwowano zwiększenie adhezji w drugiej godzinie ekspozycji, natomiast po 8 h liczba przyłączonych komórek wyraźnie się zmniejszyła i to wielokrotnie. Trudno wskazać przyczynę tego zjawiska, albowiem w literaturze nie ma informacji o szkodliwym działaniu alginianu na komórki bakteryjne, a polimer ten jest powszechnie używany jako nośnik do immobilizacji mikroorganizmów. Można jedynie przypuszczać, że pewną rolę w osłabieniu adhezji mogła odgrywać translokacja jonów dwuwartościowych, wapnia i magnezu, z powierzchni kontaktu w głąb hydrożelu. Jony te są odpowiedzialne za stabilizację struktury żelowej alginianu.

T a b e l a 4

Wpływ gęstości żelu i czasu ekspozycji na adhezję bakterii do powierzchni alginianu.  
The effect of gel concentration and time exposition on the bacterial adhesion to an alginate surface.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni Number of bacteria adhering to a given surface [jtk/cm <sup>2</sup> ] / [cfu/cm <sup>2</sup> ]
------------------	--

	1 h	2 h	8 h
	0,5 % alginian / 0,5% alginate		
<i>L. casei</i> Shirota	172 (± 10)	407 (± 38)	58 (± 7)
<i>L. acidophilus</i> LC1	692 (± 41)	809 (± 74)	53 (± 5)
<i>L. rhamnosus</i> GG	245 (± 21)	602 (± 53)	87 (± 4)
	1% alginian / 1% alginate		
<i>L. casei</i> Shirota	222 (± 21)	505 (± 51)	305 (± 30)
<i>L. acidophilus</i> LC1	689 (± 39)	739 (± 62)	192 (± 18)
<i>L. rhamnosus</i> GG	499 (± 27)	405 (± 38)	226 (± 20)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

#### Adhezja bakterii do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*

Pomimo odmiennej charakterystyki morfologicznej i funkcjonalnej obu linii komórkowych, przeprowadzone doświadczenia wykazały, że przyczepność bakterii do badanych tkanek jest zbliżona (tab. 5). Największe zróżnicowanie wykazał szczep *L.*

T a b e l a 5

Adhezja bakterii do komórek nabłonka jelitowego.

Bacterial adhesion to intestinal epithelial cells.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni nabłonka (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to intestinal epithelial cells (after 1h) [jtk/cm <sup>2</sup> ] / [cfu/cm <sup>2</sup> ]	
	Caco-2	HT-29
<i>L. casei</i> Shirota	4328 (± 1500)	3490 (± 750)
<i>L. acidophilus</i> LC1	10427 (± 1600)	10680 (± 2510)
<i>L. rhamnosus</i> GG	74211 (± 7800)	6980 (± 2931)

*rhamnosus* GG, którego adhezja do linii Caco-2 była 10-krotnie większa niż w stosunku do linii HT-29. Wynika z tego, że ten sam mikroorganizm może wykazywać zupełnie odmienne zdolności do przyczepiania się do poszczególnych linii komórek nabłonkowych. Najmniejszymi właściwościami adhezyjnymi odznaczał się *L. casei* Shirota. W porównaniu do pozostałych rodzajów powierzchni, bakterie probiotyczne silniej adherowały do komórek nabłonkowych, a liczba komórek przyczepionych do 1 cm<sup>2</sup> powierzchni tkanki sięgała 3–4 cykli logarytmicznych bakterii.

#### Wnioski

1. Wykazano brak adhezji badanych szczepów bakterii probiotycznych do polistyrenu, a ich przyczepność do szkła była dużo mniejsza niż innych gatunków mikroorganizmów.

2. Na przyczepność bakterii probiotycznych wpływ wywierał czas ekspozycji oraz stężenie stosowanych hydrożeli.
3. Porównanie efektywności przyłączania komórek bakteryjnych do różnych powierzchni stałych i odniesienie rezultatów tych badań do danych uzyskanych w badaniach nad adhezją komórek bakteryjnych do nabłonka jelitowego *in vitro* jest trudne, bowiem występuje zróżnicowanie w adhezji bakterii już na poziomie linii komórek nabłonka jelitowego. Trudno w tym przypadku określić, która z tych linii jest bardziej reprezentatywna dla warunków *in vivo*.
4. Najbardziej zbliżone wyniki do adhezji na Caco-2 i HT-29 stwierdzono w przypadku adhezji na membranie karboksymetylocelulozowej, chociaż nie może być ona uznana jako model zbliżony do modelu nabłonka jelitowego

*Praca naukowa finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 1999–2004 jako projekt badawczy zamawiany PBZ-KBN/020/P06/1999/01.*

### Literatura

- [1] Aleljung P., Paulsson M., Emödy L., Andersson M., Naidu A.S., Wadström T.: Collagen binding by lactobacilli. *Curr. Microbiol.*, 1991, **23**, 33-38.
- [2] An Y.H., Friedman R.J.: Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Meth.*, 1997, **30**, 141-152.
- [3] Azeredo J., Visser J., Oliviera R.: Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO. *Coll. Surf.*, 1999, **14**, 141-148.
- [4] Blum S., Renerio R., Schirin E.J., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A., Saarela M., Collins K.: Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 405-410.
- [5] Boonaert Ch.J.P., Dufrene Y.F., Derclaye S.R., Rouxhet P.G.: Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2001, **22**, 171-182.
- [6] Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A.: The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trend Food Sci. Technol.*, 1996, **7**, 152-157.
- [7] Fleischer M., Przondo-Mordarska A.: Adhezyny pałeczek z rodzaju *Acinetobacter*. *Med. Doświad. Mikrobiol.*, 1998, **50**, 229-237.
- [8] Fleming H.C., Wingender J.: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.*, 2001, **43**, 1-8.
- [9] Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J.: Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.*, 2000, **43**, 235-242.
- [10] Hermansson M.: The DLVO theory in microbial adhesion. *Coll. Surf.*, 1999, **14**, 105-119.
- [11] Jasiński A., Kilarski W.: *Ultrastruktura komórki*. WSiP. Warszawa 1987.
- [12] Krajewska-Pietrasik D., Różalska B., Różalski A.: Adhezja bakteryjna w świetle najnowszych danych. *Post. Mikrob.*, 1993, **32**, 271-287.
- [13] Kunicki-Goldfinger W.J.: *Życie bakterii*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1998.
- [14] Li B., Logan B.E.: Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Coll. Surf.*, 2004, **36**, 81-90.
- [15] Liu Y.-Q., Liu Y., Tay J.-H.: The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **65**, 143-148.
- [16] Lyndersén B.K., D'eila N.A.: *Bioprocess Engineering Systems, Equipment and Facilities*. Ed. Jon Wiley & Sons, New York 1994.

- [17] Otto K., Elwing H., Hermansson M.: The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Coll. Surf.*, 1999, **15**, 99-111.
- [18] Rijnaarts H.H.M., Norde W., Bourer E.J.: Bacterial adhesion under static and dynamic condition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3255-3265.
- [19] Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K.: Probiotics: how should they be defined?. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 107-110.
- [20] Salyers A. A., Whitt D.: *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003.
- [21] Shortt C.: The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 411-417.
- [22] Strus M., Kukła G., Rurańska-Smutnicka D., Przondo-Morderska A., Heczko P.: Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Adherencja do linii komórkowej. *Med. Dośw. Mikrob.*, 2001, **53**, 253-258.
- [23] Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A.: Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, **223**, 287-292.
- [24] Van Oss C.J.: *Interfacial forces in aqueous media*. Ed. Marcel Dekker, New York 1994.

#### SEARCHING FOR SIMPLE MODELS TO STUDY THE ADHESION OF PROBIOTIC BACTERIA

##### S u m m a r y

Comparative studies were performed on the possibility of replacing intestinal epithelial cells by some other simplified models for the purpose of examining the adhesion of probiotic bacteria. The adhesion of *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1, and *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 to surfaces of alginate, carrageenan, gelatin, collagen, glass, polystyrene, carboxymethylcellulose, and to intestinal epithelial cells (Caco-2 and HT-29 lines) were tested.

Among the examined solid surfaces, the highest degree of adhesion was observed in the case of carboxymethylcellulose and collagen. In the majority of experimental variants, the number of bacterial cells adhering to surfaces increased parallel to the time of their contacting a solid surface. Additionally, there were stated differences in the cell adhesion to hydrogels showing varying concentration rates. On the basis of the experiments performed, it is possible to state that the adhesion degree of probiotic bacteria to various inorganic and organic surfaces is a parameter that depends on the strain of a microorganism. Among all the simplified models applied in the studies in question, no one was marked by an adhesion rate comparable to the adhesion of intestinal epithelial cells Caco-2 and HT-29, which are, nowadays, used as a major model *in vitro* while investigating the adhesion of probiotic bacteria.

**Key words:** adhesion, *Lactobacillus*, alginate, carrageenan, collagen, carboxymethylcellulose. ☒