

KATARZYNA CZACZYK, KAMIŁA MYSZKA

**BIOSYNTeza EGZOPOLISACHARYDÓW I ICH ROLA  
W ADHEZJI *BACILLUS MEGATERIUM*  
DO POWIERZCHNI STALI NIERDZEWNEJ**

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na biosyntezę egzopolisacharydów (EPS) przez *Bacillus megaterium*. Określano także zależność pomiędzy ilością produkowanych EPS a adhezją bakterii do powierzchni stali nierdzewnej (304L). W celu oszacowania ilości syntetyzowanych egzopolisacharydów zastosowano metodę polegającą na oddzieleniu ich za pomocą fal ultradźwiękowych i spektrofotometrycznym oznaczeniu po kwaśnej hydrolizie. Badanie adhezji *Bacillus megaterium* przeprowadzono nową, nieopisywaną dotąd w literaturze, metodą szacowania stopnia adhezji wg 9-stopniowej skali.

Wykazano, że w większości wariantów doświadczenia biosynteza egzopolisacharydów wystąpiła w największym stopniu w początkowych etapach hodowli (4. i 8. godzina). Przy braku źródła azotu w pożywce, przez pierwsze 24 godz. hodowli nie stwierdzono obecności pozakomórkowych węglowodanów. Ich wzmożoną produkcję odnotowano dopiero w 48 godzinie trwania procesu i to na bardzo wysokim poziomie (0,035 mg EPS/10<sup>6</sup> jtk). W większości wariantów doświadczenia wykazano korelację pomiędzy ilością syntetyzowanych egzopolisacharydów na poszczególnych etapach hodowli a adhezją komórek *Bacillus megaterium* do powierzchni stali nierdzewnej. Zaobserwowano także pojawienie się wyższych stopni adhezji przy niskiej produkcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów, co może świadczyć o tym, że w takich warunkach inne czynniki, oprócz biosyntezy egzopolisacharydów, odgrywają istotną rolę w procesie adhezji drobnoustrojów do powierzchni nieożywionych.

**Słowa kluczowe:** egzopolisacharydy (EPS), biofilm, adhezja.

## Wprowadzenie

Egzopolisacharydy są integralną częścią błon biologicznych. Powstałe na drodze asocjacji lub polimeryzacji skupiska tych biopolimerów wypełniają puste przestrzenie między komórkami w każdym biofilmie. Substancje EPS (ang. extracellular polymeric substances) należą do czynników strukturalnych, nadających błonom biologicznym

trójwymiarową, heterogenną postać. Synteza pozakomórkowych polisacharydów przez drobnoustroje osiadłe na powierzchni sprzyja tworzeniu się populacji złożonych z kilku bądź kilkunastu różnych gatunków (w tym z mikroorganizmów niewytwarzających EPS).

Zewnątrzkomórkowe polisacharydy warunkują szybką adaptację komórek do danych warunków otoczenia [1, 10]. Powyższe substancje zabezpieczają dojrzałą postać biofilmu przed zmianami ciśnienia osmotycznego i pH środowiska. Matryca węglowodanowa skutecznie chroni mikrokolonie przed działaniem promieniowania UV, niszczącym DNA komórek [2]. Egzopolisacharydy, na drodze wymiany jonowej, utrudnionej dyfuzji czy poprzez zjawisko adsorpcji, inaktywują bądź zmniejszają wrażliwość drobnoustrojów na działanie środków antymikrobiologicznych (głównie antybiotyków).

Sacharydowe substancje polimerowe odgrywają także istotną rolę w adhezji mikroorganizmów do powierzchni i są często określane mianem „polisacharydów adhezyjnych” [6]. Największa produkcja tych substancji występuje we wczesnych etapach tworzenia się biofilmu, co wspomaga przyczepianie się komórek do płaszczyzn stałych [9]. Literatura dostarcza również przeciwnych informacji, negujących wpływ egzopolisacharydów na adhezję komórek do powierzchni ciał stałych. Parkar i wsp. [11] badając adhezję termofilnych szczepów *Bacillus* sp. do powierzchni nierdzewnej stali, nie stwierdzili zależności pomiędzy ilością syntetyzowanych na zewnątrz komórek polisacharydów a adhezją. Stwierdza się, iż usunięcie zewnętrznej warstwy polisacharydowej może jedynie ułatwić interakcje pomiędzy innymi komponentami EPS a daną powierzchnią. Ponadto niektóre z egzopolisacharydów nie uczestniczą w tworzeniu się biofilmu. Ich obecność w pustych przestrzeniach między komórkami drobnoustrojów sprzyja tylko wytworzeniu jego trójwymiarowej struktury.

Celem przedstawionych badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na biosyntezę egzopolisacharydów przez *Bacillus megaterium* i ich roli w adhezji do powierzchni stali nierdzewnej.

## **Materialy i metody badań**

### *Mikroorganizmy*

W badaniach wykorzystano szczep *Bacillus megaterium*, pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademii Rolniczej w Poznaniu. Przed przystąpieniem do badań drobnoustroje dwukrotnie pasażowano.

### *Podłoża hodowlane*

*Bacillus megaterium* hodowano w temp. 37°C w warunkach dynamicznych (100 obr./min) na podłożu o stałej zawartości peptonu kazeinowego (10 g/l) i zmieniającym się udziale glukozy (0; 5 i 10 g/l) oraz na pożywce o stałej dostępności glukozy (5 g/l) i zmieniającym się udziale peptonu kazeinowego (0; 10 i 20 g/l) przy pH=7 pożywki w każdym wariancie doświadczenia. Czas prowadzenia hodowli wyniósł 96 godz.

### *Oznaczanie egzopolisacharydów*

Poziom wytwarzanych egzopolisacharydów oznaczano w 4, 8, 24, 48, 72 i 96 godz. trwania procesu. Płynną hodowlę *Bacillus megaterium* w ilości 100 ml wirowano przez 20 min (1000 g). Uzyskany osad zawieszano w 100 ml dejonizowanej wody i ustalano gęstość optyczną ( $OD_{540nm}$ ) odpowiadającą  $1 \times 10^6$  jtk. Komórki traktowano następnie ultradźwiękami (2 min/200 W) i wirowano przez 10 min (1000 g). Następnie 1 ml supernatantu (kroplami) wprowadzono do probówek zawierających 8 ml 99,8% roztworu alkoholu etylowego. Próby przechowywano w temp. 4°C przez 24 godz. i ponownie wirowano przez 20 min (5500 g) w temp 4°C. Po zlanii supernatantu osad egzopolisacharydów zawieszano w 1 ml wody destylowanej. Kwaśnej hydrolizy dokonywano z użyciem 7 ml 77% roztworu  $H_2SO_4$ , schładzając jednocześnie próby w łaźni lodowej. Po dodaniu 1 ml 1% roztworu tryptofanu i ogrzewaniu prób w łaźni wodnej w temp. 100°C przez 20 min, dokonywano pomiaru ilości syntetyzowanych egzopolisacharydów metodą spektrofotometryczną ( $\lambda=500$  nm). Jako wzorzec zastosowano dekstran (Mp. 48000, Fluka, Szwajcaria) [3, 11].

### *Przygotowanie powierzchni do badań*

Płytki ze stali nierdzewnej (typ 304L) o wymiarach 1 cm x 6,5 cm x 1 mm, traktowano 50% roztworem  $HNO_3$  w temp. 70°C przez 10 min. Po dokładnym wypłukaniu w wodzie destylowanej płytki umieszczano w szklanych naczyniach i autoklawowano (121°C, 15 min) [11].

### *Badanie adhezji*

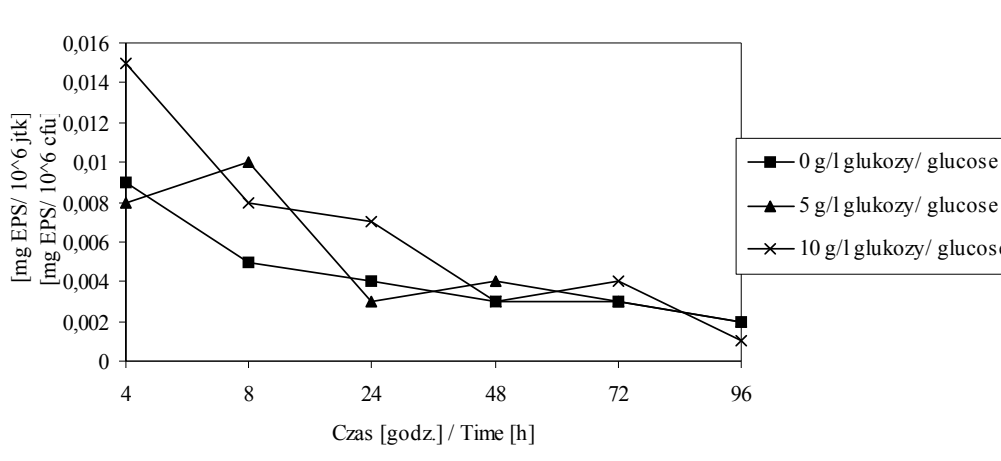
W płynnych hodowlach *Bacillus megaterium* po 4, 8, 24 i 48 godz. umieszczano płytki ze stali nierdzewnej. Po 1 godz. płytki usuwano i przemywano roztworem buforu (pH 7,2) celem usunięcia komórek nietrwale związanych z powierzchnią. Płytki zabarwiano oranżem akrydyny (0,01%) i prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym (CARL-ZEISS, Axiovert 200, Niemcy). Określenia stopni adhezji komórek *Bacillus megaterium* do powierzchni stali nierdzewnej dokonano metodą opisaną przez Le Thi i wsp. [7]. Technika ta polega na oszacowaniu 50 pól widzenia wg 9-stopniowej skali:

- 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 (powyżej 50 w polu widzenia), 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 –  $\frac{1}{4}$  pola widzenia pokryta biofilmem;
- 8 stopień –  $\frac{1}{2}$  pola widzenia pokryta biofilmem;
- 9 stopień – całe pole widzenia pokryte biofilmem.

Każdy wariant eksperymentu składał się z dwóch doświadczeń, które przeprowadzano w dwóch powtórzeniach.

### Wyniki i dyskusja

Kinetykę produkcji egzopolisacharydów przez *Bacillus megaterium*, w zależności od dostępności glukozy oraz peptonu kazeinowego w podłożu hodowlanym, przedstawiono na rys. 1. i 2. Niezależnie od zawartości glukozy w pożywce, największą intensywność syntezy pozakomórkowych polisacharydów przez badane drobnoustroje zaobserwowano w początkowych etapach hodowli (4–8 godz.) i kształtowała się ona na poziomie 0,01–0,015 mg EPS/10<sup>6</sup> jtk (rys. 1).

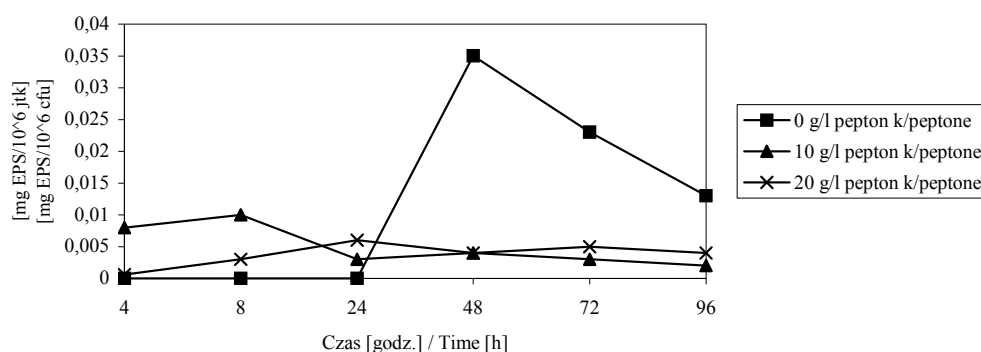


Rys. 1. Wpływ dostępności glukozy na kinetykę produkcji egzopolisacharydów przez *Bacillus megaterium*.

Fig. 1. Effect of the glucose availability on the production kinetics of exopolysaccharides by *Bacillus megaterium*.

W każdym wariantcie doświadczenia odnotowano wyraźne zmniejszenie poziomu produkcji polisacharydów po 24 godz. prowadzenia eksperymentu.

Na rys. 2. przedstawiono produkcję EPS w zależności od zawartości peptonu kazeinowego w podłożu hodowlanym. Bardzo wysoki poziom syntetyzowanych egzopolisacharydów (0,035 mg/10<sup>6</sup> jtk) zaobserwowano w 48 godz. procesu przy braku źródła azotu w środowisku hodowlanym. W pozostałych wariantach doświadczenia synteza pozakomórkowych węglowodanów była znacznie mniejsza i osiągnęła maksymalną wartość 0,01 mg/10<sup>6</sup> jtk w 8 godz. procesu (10 g/l peptonu kazeinowego) i 0,006 mg/10<sup>6</sup> jtk w 24 godz. procesu (20 g/l peptonu kazeinowego).



Rys. 2. Wpływ dostępności peptonu kazeinowego na kinetykę produkcji egzopolisacharydów przez *Bacillus megaterium*.

Fig. 2. Effect of the casein peptone availability on the production kinetics of the exopolysaccharides by *Bacillus megaterium*.

W obu wariantach doświadczeń po 48 godz. hodowli produkcja egzopolisacharydów przez *Bacillus megaterium* ustabilizowała się na stałym, niskim poziomie.

Mechanizmy warunkujące syntezę EPS w komórce są bardzo złożone i obejmują zarówno regulacje pozytywne, jak i negatywne. Odpowiedzialne są za to białka obecne w środowisku wzrostu drobnoustrojów (ang. environmental sensor protein, effector protein). Zależy to także od stanu fizjologicznego komórek. Sekrecja EPS wzrasta w warunkach głodowych i spada, gdy dostępne są źródła węgla i azotu, które wykorzystywane są na wzrost i regenerację komórki. Wg Wai i wsp. [13] w warunkach głodowych następuje sekrecja amorficznych polisacharydów i ekspresja adhezyjnych EPS.

Gandhi i wsp. [5], prowadząc badania nad czynnikami determinującymi wysoką produkcję zewnątrzkomórkowych węglowodanów przez *Bacillus megaterium*, wykazali istotny wpływ związków azotu (tj. siarczanu amonu, chlorku amonu i azotu amonu) na przyrost biomasy komórek i wzrost syntezy polisacharydów. Indukujący wpływ źródła węgla (sacharozy) na syntezę egzopolisacharydów udowodniono także w badaniach prowadzonych przez Gandhi i wsp. [5], Galas i wsp. [4] oraz Lindsay i wsp. [8].

Sutherland [12] wykazał, że wpływ czasu hodowli na wytwarzanie polisacharydów drobnoustrojowych jest cechą gatunkową, a nawet szczepową. Badane szczepy

*Pseudomonas aeruginosa* prowadziły największą syntezę biopolimerów na etapie adaptacji komórek do danych warunków środowiska, a więc w początkowych godzinach trwania procesu. Podobne zależności zaobserwowano w niniejszej pracy, gdzie w większości wariantów doświadczeń największą syntezę egzopolisacharydów zaobserwowano w początkowych etapach hodowli (4 i 8 godzina).

W przedstawionej pracy badano także rolę zewnątrzkomórkowych polisacharydów w początkowych etapach tworzenia się biofilmu bakteryjnego. Zastosowanie metody opracowanej przez Le Thi i wsp. [7] pozwoliło wyeliminować błędy występujące w czasie określania liczebności przyczepionych do danych płaszczyzn komórek innymi metodami. Możliwe było także dokonanie oceny stopnia zaawansowania zjawiska powstawania biofilmu. Badanie adhezji komórek drobnoustrojów za pomocą skali 9-stopniowej jest nową metodą, dotąd nieopisywaną w literaturze. Techniki badania adhezji drobnoustrojów do powierzchni, poprzez bezpośrednie liczenie komórek pod mikroskopem, nie znajdują zastosowania przy bardziej zaawansowanych etapach tego procesu. Również metody polegające na odrywaniu komórek mikroorganizmów od badanych powierzchni i określaniu ich liczby w tradycyjnych posiewach mikrobiologicznych budzą wiele wątpliwości (możliwość uszkodzenia komórek, konieczność potwierdzenia skuteczności odczepiania).

Wyniki oceny stopnia adhezji komórek *Bacillus megaterium* przedstawiono w tab. 1. i 2.

Jako dominujące stopnie adhezji uznano te, których udział wynosił minimum 20% oraz odnotowano pojawienie się wyższych stopni adhezji. We wszystkich doświadczeniach przeważał 2. i 4. stopień adhezji, ale w poszczególnych przypadkach obserwowano także pojawienie się wyższych stopni adhezji (5–8). W większości wariantów było to wyraźnie skorelowane ze zwiększoną produkcją egzopolisacharydów przez komórki *Bacillus megaterium*. Substraty metaboliczne dostępne w środowisku wzrostu drobnoustrojów są również bezpośrednim induktorem syntezy określonego rodzaju polisacharydu zewnątrzkomórkowego. Te ściśle zdefiniowane pod względem struktury makrocząsteczki uczestniczą w powstawaniu stabilnych mechanicznie stadiów biofilmu, odpowiadających 4. oraz 5. stopniowi adhezji. Z danych przedstawionych w tab. 2. wynika, że nawet przy niskiej biosyntezie egzopolisacharydów, pojawiające się stopnie adhezji były stosunkowo wysokie. Wskazuje to na fakt, że przy obniżonej produkcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów inne czynniki odgrywają istotną rolę w procesie adhezji drobnoustrojów do powierzchni nieożywionych. Może to być również cechą charakterystyczną dla określonego gatunku czy szczepu mikroorganizmu.

Tabela 1

Adhezja *Bacillus megaterium* do powierzchni stali nierdzewnej w zależności od dostępności glukozy w podłożu hodowlanym.  
Adhesion of *Bacillus megaterium* to a stainless steel surface depending on the glucose availability in a culture medium.

Czas hodowli [godz.] Time of incubation [h]	Stężenie glukozy [g/l] Glucose concentration [g/l]								
	0			5			10		
	mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development higher adhe- sion degrees (5,6,7,8,9)	mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhe- sion degrees (5,6,7,8,9)
4	0,009 <sup>a</sup>	2,4	5,6	0,008 <sup>a</sup>	2,1	5	0,015 <sup>a</sup>	4,2,5	5,6,8
8	0,005 <sup>b</sup>	4,2	6	0,01 <sup>a</sup>	1,2,4	6	0,008 <sup>b</sup>	1,4	–
24	0,004 <sup>b</sup>	2	5	0,003 <sup>b</sup>	4,2	5	0,007 <sup>b</sup>	2,4,1	–
48	0,003 <sup>b</sup>	2,1	-	0,004 <sup>b</sup>	1,4,2	5	0,003 <sup>b</sup>	1	–

a, b – różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$ ;

a, b – Differences between the mean values, which are statistically significant at a level of  $\alpha = 0,05$ .

Tabela 2

Adhezja *Bacillus megaterium* do powierzchni stali nierdzewnej w zależności od dostępności peptonu kazeinowego w podłożu hodowlanym.  
Adhesion of *Bacillus megaterium* to a stainless steel surface depending on the casein peptone availability in a culture medium.

Czas hodowli [godz.] Time of incubation [h]	Stężenie peptonu k [g/l] Casein peptone concentration [g/l]											
	0				10				20			
	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)	Dominujące stopnie adhezji Dominant degrees of adhesion	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (5,6,7,8,9) Development of higher adhesion degrees (5,6,7,8,9)
	mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu		mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu		mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu		mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu		mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu		mgEPS/10 <sup>6</sup> jtK mgEPS/10 <sup>6</sup> cfu	
4	0,0 <sup>a</sup>	1	–	0,008 <sup>a</sup>	2,1	5	0,0006 <sup>a</sup>	2,1	–			
8	0,0 <sup>a</sup>	1	–	0,01 <sup>a</sup>	1,2,4	6	0,003 <sup>b</sup>	1	6			
24	0,0 <sup>a</sup>	2,4,1	5	0,003 <sup>b</sup>	4,2	5	0,006 <sup>b</sup>	4,2	5,6			
48	0,035 <sup>b</sup>	2,1	5	0,004 <sup>b</sup>	1,4,2	5	0,004 <sup>b</sup>	2,4	6,5			

a, b – różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$ ;

a, b – Differences between the mean values, which are statistically significant at a level of  $\alpha = 0,05$ .



Największe zaawansowanie procesu adhezji odnotowano w 4. godzinie hodowli prowadzonej na pożywce zawierającej 10 g/l glukozy. Jednym z dominujących był 5. stopień adhezji, a także pojawiły się bardziej zaawansowane etapy przyczepiania się komórek (nawet 8. stopień). W tym samym czasie obserwowano również intensywną produkcję egzopolisacharydów (0,015 mg EPS/10<sup>6</sup> jtk). Mechanizmy tego zjawiska mogą polegać na tworzeniu warstwy kondycjonującej, stwarzając korzystniejsze warunki do adhezji lub pośredniczeniu w kohezji komórek. Biosynteza EPS jest cechą gatunkową. Parkar i wsp. [11] wykazali różnice w ilości produkowanych egzopolisacharydów przez różne szczepy *Bacillus* sp. W powyższych badaniach nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy ilością zewnątrzkomórkowych polisacharydów a adhezją komórek do powierzchni stali nierdzewnej. Podobne zależności obserwowali Flint i wsp. [3]. Znajomość i zrozumienie mechanizmów powstawania błon biologicznych na płaszczyznach użytkowych nadal stanowi aktualny problem, a niniejsza praca jest jedynie częścią badań zmierzających do określenia czynników wpływających na ten proces.

### Wnioski

1. W większości wariantów doświadczenia największą intensywność biosyntezy egzopolisacharydów przez komórki *Bacillus megaterium* zaobserwowano w początkowych etapach hodowli (4. i 8. godzina).
2. Największą intensywność biosyntezy pozakomórkowych węglowodanów przez komórki *Bacillus megaterium* odnotowano przy największej zawartości źródła węgla w podłożu hodowlanym (10 g/l).
3. Przy braku źródła azotu, przez pierwsze 24 godziny hodowli nie stwierdzono obecności egzopolisacharydów. Ich wzmożoną produkcję odnotowano dopiero w 48 godzinie trwania procesu (0,035 mg/10<sup>6</sup> komórek).
4. W większości wariantów doświadczenia wykazano, że stopień adhezji *Bacillus megaterium* do powierzchni stali nierdzewnej jest zależny od ilości wytworzonego EPS.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr 3P06T 01024

### Literatura

- [1] Czaczyk K., Wojciechowska K.: Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia*, 2003, **62**, 180-192.
- [2] Davey M. E., Otole G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, **64**, 847-867.
- [3] Flint S. H., Brooks J. D., Bremer P. J.: The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, **83**, 508-517.

- [4] Galas E., Barabasz-Szymańska Ł., Pankiewicz T.: Drobnoustrojowy polisacharyd - pullulan, właściwości, biosynteza i zastosowanie. *Biotechnologia*, 1998, **41**, 57-65
- [5] Gandhi H. P., Ray R. M., Patel R. M.: Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydr. Polym.*, 1997, **34**, 323-327
- [6] Langille S. E., Geesey G. G., Weiner R. M.: Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **25**, 81-85.
- [7] 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.
- [8] Lindsay D., Brözel V. S., Mostert J. F., von Holy A.: Physiology of dairy-associated *Bacillus* ssp. over a wide pH range. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **54**, 49-62.
- [9] Liu Y., Tay J.-H.: Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **17**, 111-117.
- [10] Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.-M., Remaud-Simeon M.: Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 675-685.
- [11] 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.
- [12] Sutherland I. W.: Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. W: *Advances in microbial physiology*. Red: Rose A. H., Morris J. G., Academic Press London, London, 1982, pp. 79-150.
- [13] Wai S. N., Mizunoe Y., Yoshida S.: How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **180**, 123-131.

#### BIOSYNTHESIS OF EXOPOLYSACCHARIDES AND THEIR ROLE IN THE ADHESION OF *BACILLUS MEGATERIUM* TO A STAINLESS STEEL SURFACE

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

The purpose of this investigation was to determine the effect of availability of nutritious components in a culture medium on the biosynthesis of exopolysaccharides (EPS) *Bacillus megaterium*. Furthermore, a dependence between the amount of EPS produced and the adhesion of bacteria to stainless steel surface (304L) was defined. For the purpose of determining the amount of EPS synthesized, they were separated by ultrasonic waves and, after the acid hydrolysis accomplished, a spectrophotometric assay was applied. The adhesion of *Bacillus megaterium* was investigated by an absolutely novel method of estimating degrees of adhesion on a nine-degree scale; so far, this method has not been mentioned in any literature.

It was proved that in the majority of experimental cases, the highest level of the EPS biosynthesis occurred at the beginning of this process (during the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> hour). When the source of nitrogen was unavailable during the initial 24 hours of the process, no extracellular carbohydrates were present. An intensified production of carbohydrates was reported only during the 48<sup>th</sup> hour of the process ensuing, with a very high production level (0,035 mg EPS/ 10<sup>6</sup> cfu). In the majority of experimental cases, it was proved that a correlation existed between the amount of synthesized exopolysaccharides, at each individual stage of development of the bacterial culture, and the adhesion of *Bacillus megaterium* cells to a stainless steel surface. Additionally, it was reported that the adhesion degree of bacteria was higher during a low production of extracellular polysaccharides. This fact shows that, besides the biosynthesis of exopolysaccharides, some other factors play a significant role in the adhesion of micro-organisms to abiotic surfaces.

**Key words:** exopolysaccharides (EPS), biofilm, adhesion. ☒