

KAMILA MYSZKA, KATARZYNA CZACZYK

## ROLA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH BIAŁEK W PROCESIE ADHEZJI *PROTEUS VULGARIS* DO POWIERZCHNI STALI NIERDZEWNEJ

### Streszczenie

Celem badań było określenie roli zewnątrzkomórkowych białek w procesie adhezji *Proteus vulgaris* do powierzchni stali nierdzewnej. Zbadano również zależności pomiędzy zawartością ATP w komórkach bakteryjnych, zmianami w profilu zewnątrzkomórkowych białek a adhezją *Proteus vulgaris* do powierzchni abiotycznych. Hodowle mikroorganizmów prowadzono na pożywce o optymalnej oraz zredukowanej zawartości składników pokarmowych. W przeprowadzonych eksperymentach warunki głodowe środowiska wzrostu indukowały zjawisko adhezji komórek do płaszczyzn stałych. Trwała kolonizacja powierzchni stali nierdzewnej występowała już w początkowych etapach badania adhezji. Bakterie *Proteus vulgaris* narażone na oddziaływanie stresu głodowego charakteryzowały się wyższym stanem energetycznym, co skutkowało wyraźnym ograniczeniem lub nawet brakiem syntezy części egzogennych białek o względnej masie cząsteczkowej mieszczącej się w zakresie  $14,2 \times 10^3$  Da -  $36 \times 10^3$  Da.

**Słowa kluczowe:** biofilm, adhezja, *Proteus vulgaris*, stal nierdzewna, SDS-PAGE

### Wprowadzenie

Bakterie *Proteus vulgaris* są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym. Mogą także powodować psucie się żywności. Dotyczy to zwłaszcza produktów o wysokiej zawartości białka (głównie mięsa, ryb i jaj). Komórki *Proteus* spp. poddane oddziaływaniu stresu głodowego uruchamiają szereg mechanizmów umożliwiających efektywną kolonizację powierzchni stałych. Biofilm bakteryjny utworzony na płaszczyznach abiotycznych stanowi potencjalne zagrożenie mikrobiologicznego skażenia żywności.

---

Mgr inż. K. Myszka, dr hab. inż. K. Czaczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

Tworzenie błon biologicznych rozpoczyna się w momencie osadzania się pojedynczych komórek na powierzchni stałej. Fizykochemiczne interakcje, zachodzące w trakcie przyłączania się komórki bakteryjnej do płaszczyzny abiotycznej, są odpowiedzią swoistą danego gatunku na warunki środowiskowe [13]. Zmniejszona zawartość składników pokarmowych w środowisku wzrostu determinuje zarówno sposób, jak i szybkość przyczepiania się komórek bakteryjnych do powierzchni nieożywionych [18]. W warunkach głodowych na skutek ograniczenia syntezy części zewnątrzkomórkowych białek, zmieniają się właściwości błony zewnętrznej bakterii G (-) [1, 8]. Zmodyfikowana struktura błony zewnętrznej skutecznie chroni komórki bakteryjne przed działaniem antybiotyków oraz detergentów [1]. Takich właściwości nie wykazują komórki *Proteus vulgaris* inkubowane na pożywkach o optymalnej zawartości substancji pokarmowych. Poznanie mechanizmu syntezy zewnątrzkomórkowych cząsteczek w warunkach głodowych i określenie ich roli w procesie tworzenia się biofilmu bakteryjnego na powierzchniach abiotycznych ma więc istotne, aplikacyjne znaczenie.

Celem badań było określenie roli zewnątrzkomórkowych białek w procesie adhezji *Proteus vulgaris* do powierzchni stali nierdzewnej typu 316L. Zbadano również zależności pomiędzy zawartością ATP w komórkach bakteryjnych, zmianami w profilu zewnątrzkomórkowych białek a adhezją *Proteus vulgaris* do powierzchni abiotycznych.

## **Materiał i metody badań**

### *Drobnoustroje i warunki hodowli*

W badaniach wykorzystano gatunek *Proteus vulgaris* ATCC 6380. W czasie prowadzenia hodowli drobnoustroje trzykrotnie pasażowano na podłoże płynne zaproponowane przez Mossela [15]. Hodowle mikroorganizmów prowadzono w temp. 35°C w warunkach dynamicznych na podłożu o optymalnej oraz zredukowanej (o 90%) dostępności składników odżywczych, przy pH = 7 pożywki. Czas prowadzenia hodowli wynosił 151 h.

### *Przygotowanie powierzchni stali nierdzewnej do badań*

Płytki ze stali nierdzewnej (typ 316L) o wymiarach 1 cm x 6,5 cm x 1 mm, traktowano 50% roztworem HNO<sub>3</sub> w temp. 70°C przez 10 min. Po dokładnym wypłukaniu w wodzie destylowanej płytki umieszczano w szklanych naczyniach i autoklawowano w temp. 121°C przez 15 min [16].

### Badanie adhezji

Badanie adhezji rozpoczynano w 143. h każdego doświadczenia. W płynnych hodowlach *Proteus vulgaris* umieszczano płytki ze stali nierdzewnej. W 144., 145., 147. oraz 151. h płytki usuwano i przemywano roztworem PBS (pH = 7,2) celem usunięcia komórek nietrwale związanych z badanymi powierzchniami. Płytki zabarwiano następnie 0,01% roztworem oranżu akrydyny i prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym (CARL-ZAISS, Axiovert 200, Niemcy). Określenia stopni adhezji komórek *Proteus vulgaris* do powierzchni stali nierdzewnej dokonano metodą opisaną przez Le Thi i wsp. [12]. 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, niełączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki;
- 6 stopień - łączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki;
- 7 stopień - ¼ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 8 stopień - ½ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 9 stopień - całe pole widzenia pokryte biofilmem.

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

### Bioluminescencyjny pomiar ATP

Pomiaru stężenia ATP w komórkach *Proteus vulgaris* dokonywano w 4., 24., 72., 120. oraz 144. h każdego eksperymentu. Płynne hodowle wirowano w temp. 20°C przez 20 min (3000 g). Uzyskany osad zawieszano w sterylnej dejonizowanej wodzie i ustalano gęstość optyczną (OD<sub>540nm</sub>) odpowiadającą  $1 \times 10^8$  jtk/ml. Celem ekstrakcji komórkowego ATP do 100 µl próby wprowadzono 200 µl buforu litycznego (Lumitech, Holandia). Po dokładnym wymieszaniu, do prób wprowadzono następnie 100 µl kompleksu lucyferyna-lucyferaza (Lumitech, Holandia). Zawartość ATP w komórkach bakteryjnych oznaczano lumenometrem Cesis-Lumac Lumenometr Biocounter M1500 (Lumitech, Holandia). Uzyskane wyniki przekształcono wg zależności: 7200 RLU (ang. Relative Light Unit) odpowiada 200 pg ATP komórkowego.

### *Ekstrakcja zewnątrzkomórkowych białek*

W badaniach zastosowano metodę ekstrakcji zewnątrzkomórkowych białek zaproponowaną przez Tavares i Sellstedt [19]. Płynne hodowle wirowano w temp. 20°C przez 20 min (3000 g). Uzyskany osad zawieszano w dejonizowanej wodzie i ustalano gęstość optyczną ( $OD_{540nm}$ ) odpowiadającą  $1 \times 10^8$  jtk/ml. Celem usunięcia niezwiązanych z powierzchnią komórki zewnątrzkomórkowych białek, komórki przemywano 62,5 mM roztworem Tris- HCl (pH 6,8). Osad komórkowy następnie zawieszano w 1 ml 62,5 mM roztworu Tris- HCl (pH 6,8), zawierającym 0,1% (v/v) Triton- X 100 (Serva) i 1% (v/v) Pmsf (Sigma, USA). Próby ostrożnie mieszano i wirowano w temp. 4°C przez 20 min (15000 g). Zawartość wyekstrahowanych białek zewnątrzkomórkowych w próbce oznaczano spektrofotometrycznie metodą Bradforda [3]. Jako wzorzec zastosowano roztwory BSA (Sigma USA) o stężeniu 0,1 - 1 mg/ml.

### *SDS - PAGE*

Roztwór zewnątrzkomórkowych białek wprowadzono do buforu denaturującego, zawierającego: 62,5 mM Tris- HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -merkaptotanol, 0,025% (m/v) bromofenol blue oraz 10% (v/v) glicerol. Przed nałożeniem na żel, próby ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej (100°C) przez 3 min [19].

Rozdziału wyekstrahowanych zewnątrzkomórkowych molekuł dokonywano techniką jednokierunkowej elektroforezy w obecności 0,1% roztworu SDS przy napięciu 100 V [11]. W doświadczeniu zastosowano 12% żel poliakrylamidowy. Czas trwania eksperymentu wnosił 5 h. Jako wzorzec zastosowano mieszaninę białek o znanym ciężarze cząsteczkowym (Sigma, USA).

### *Wizualizacja rozdzielonych zewnątrzkomórkowych białek w żelach SDS-PAGE*

Wizualizacji rozdzielonych biopolimerów na żelach poliakrylamidowych dokonywano techniką wybarwienia pasm związkami srebra [4]. Żel przetrzymywano w mieszaninie 40% roztworu etanolu i 10% roztworu kwasu octowego przez 12 h. Żel następnie przetrzymywano w 30% roztworze etanolu (20 min), w wodzie (20 min) oraz 1,6 mmol/l roztworze  $Na_2S_2O_3$  (1 min). Żel 3-krotnie przepłukiwano w wodzie (20 s) i zanurzano na 20 min w mieszaninie: 0,2% roztworu azotanu srebra i 0,007% roztworu formaldehydu. Żel przepłukiwano 3-krotnie w wodzie (20 s), a następnie zanurzano na 5 min w mieszaninie: 280 mmol/l węglanu sodu, 0,018% roztworze formaldehydu, 40  $\mu$ mol/l tiosiarczanu sodu. Zanurzenie żelu w 133 mmol/l glicyny (5 min) zatrzymywało proces wybarwienia rozdzielonych pasm.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej na kinetykę tworzenia się biofilmu przez komórki *Proteus vulgaris* na powierzchni stali nierdzewnej, typ 316L, przedstawiono w tab. 1. Jako dominujące stopnie adhezji uznano te, których udział wynosił minimum 20%. Badano również pojawianie się wyższych stopni adhezji (6-9 stopień). We wszystkich wariantach przeprowadzonych doświadczeń liczba komórek *Proteus vulgaris* w płynie hodowlanym kształtowała się na poziomie średnio  $10^5$ - $10^6$  jtk/ml.

Tabela 1

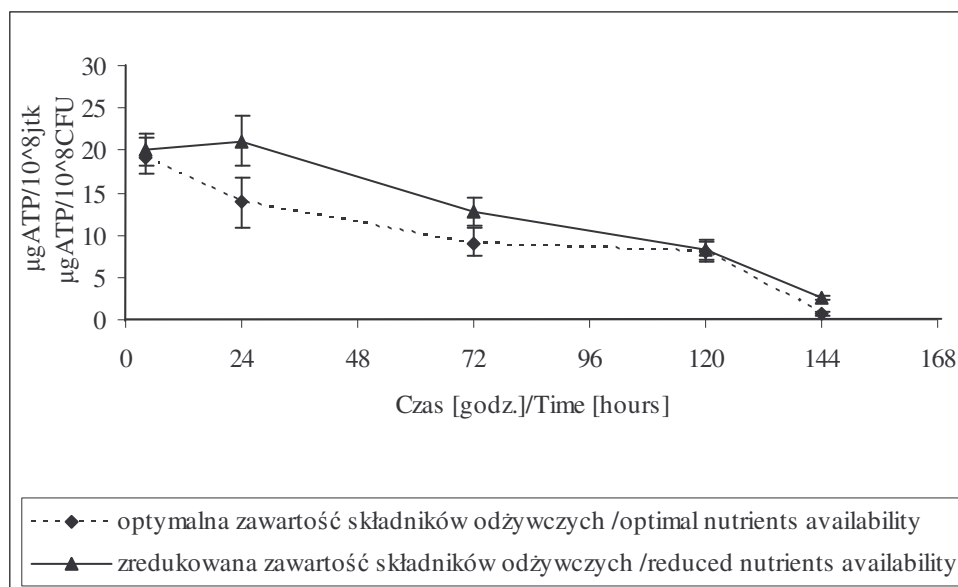
Stopień adhezji komórek *Proteus vulgaris* do powierzchni stali nierdzewnej 316L w zależności od dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej

*Proteus vulgaris* adhesion degree to the surface of stainless steel 316L in dependence on nutrients availability in the culture medium

Czas hodowli [h] Time of incubation [hours]	Dostępność składników pokarmowych w pożywce Nutrients availability in the culture medium					
	Optymalna Optimal			Zredukowana Reduced		
	Liczba komórek w płynie hodowlanym [jtk/ml] Cell number in the medium [CFU/ml]	Dominujące stopnie adhezji Dominant adhesion degrees	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (6,7,8,9) Appearance of higher adhesion degrees (6,7,8,9)	Liczba komórek w płynie hodowlanym [jtk/ml] Cell number in the medium [CFU/ml]	Dominujące stopnie adhezji Dominant adhesion degrees	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (6,7,8,9) Appearance of higher adhesion degrees (6,7,8,9)
144	$1,4 \times 10^6$	1, 2	-	$4,6 \times 10^5$	3	6
145	$1,5 \times 10^6$	2, 1	-	$8,2 \times 10^5$	3	6
147	$1,6 \times 10^6$	2, 1	-	$4,7 \times 10^5$	3	6
151	$2,0 \times 10^6$	3, 1	-	$4,7 \times 10^5$	3	6

Powierzchnie ze stali nierdzewnej typu 316L efektywnie zasiedlane były przez komórki *Proteus vulgaris* w warunkach głodowych środowiska wzrostu (tab.1). We wszystkich wariantach przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano wyraźną dominację 3. stopnia adhezji oraz pojawienie się 6. stopnia adhezji. W hodowlach *Proteus vulgaris* prowadzonych na pożywkach o optymalnej dostępności substancji pokarmowych odnotowano dominację głównie 1. oraz 2. stopnia adhezji i nie stwierdzono obecności wyższych stopni adhezji (6-9 stopień).

Rodzaj powierzchni, do której przyczepiają się drobnoustroje, jest czynnikiem warunkującym tworzenie się błon biologicznych [5]. W adhezji mikroorganizmów do powierzchni stali nierdzewnej istotną rolę odgrywa porowatość płaszczyzny. Han i wsp. [7] odnotowali, że obecność zarysowań, szczelin oraz pęknięć na powierzchni ma wpływ przede wszystkim na początkowe etapy rozwoju biofilmu bakteryjnego w warunkach głodowych. Analogiczne zależności zaobserwowali Julien i wsp. [10], którzy wykazali, że porowatość stali nierdzewnej decyduje także o trudności usuwania mikroorganizmów z danej powierzchni. Jest to związane z redukcją pierwotnych wymiarów i zmianą kształtu komórek bakteryjnych, inkubowanych w warunkach głodowych [20]. Valcarce i wsp. [21] wykazali, że zabieg mechanicznego polerowania płaszczyzn abiotycznych nie ograniczył występowania w żywności bakterii patogennych. Powierzchnie kontaktujące się z żywnością muszą zatem mieć odpowiedni stopień wykończenia, a ich porowatość nie może przekraczać poziomu  $0,8 \mu\text{m}$  [22].



Rys 1. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej na zawartość ATP w komórkach *Proteus vulgaris*.

Fig. 1. The influence of nutrients availability in the culture medium on the ATP content in *Proteus vulgaris* cells.

Istotną rolę w procesie tworzenia się biofilmów na powierzchniach abiotycznych odgrywa synteza przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowych białek. Wstępnej oceny efektywności biosyntezy zewnątrzkomórkowych cząsteczek dokonano na podstawie bioluminescencyjnego pomiaru zawartości ATP w komórkach *Proteus vulgaris*.

Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej na stan energetyczny komórek *Proteus vulgaris* przedstawiono na rys.1. Bakterie *Proteus vulgaris* narażone na oddziaływanie stresu głodowego charakteryzowały się wyższą zawartością ATP. We wszystkich wariantach przeprowadzonych doświadczeń najwyższe stężenie ATP w komórkach *Proteus vulgaris* odnotowano w pierwszych 24 h hodowli. W 120. h trwania procesu poziom ATP w komórkach badanych drobnoustrojów wyraźnie obniżył się do poziomu średnio  $8 \mu\text{g}/10^8$  jtk. Było to widoczne w hodowlach *Proteus vulgaris* prowadzonych zarówno na pożywce o optymalnej, jak i zredukowanej dostępności składników pokarmowych.

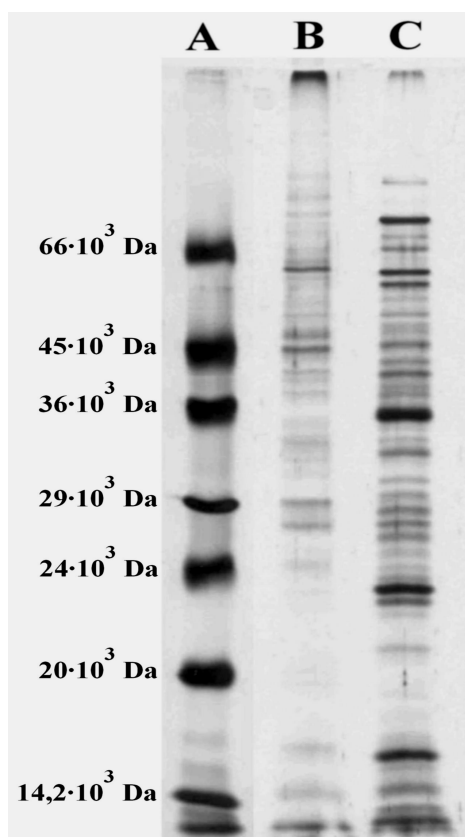
Wysoka zawartość ATP w komórkach bakteryjnych jest odpowiedzią mikroorganizmów na warunki hodowli [2, 17]. W środowisku ograniczonej podaży substancji odżywczych następuje zmiana w budowie przestrzennej membran powierzchniowych drobnoustrojów [20]. Energia potrzebna do przeprowadzenia tych zmian zawarta jest w pozakomórkowych biopolimerach. Wyraźne ograniczenie lub brak syntezy części pozakomórkowych cząsteczek uruchamia przemiany, w rezultacie których następuje wytworzenie na powierzchniach stałych stabilnych kolonii bakteryjnych. Bioluminescencyjny pomiar ATP wskazuje na fakt, że zmiany metaboliczne, sprzyjające tworzeniu się biofilmu bakteryjnego w warunkach głodowych, są reakcją występującą głównie w początkowych etapach hodowli. Analogiczne zależności wykazali Blackburn i wsp. [2], badając wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na adhezję *Pseudomonas fragi* do powierzchni polistyrenu. Dojrzałą matrycę biofilmu *Pseudomonas fragi* na badanej powierzchni stałej zaobserwowano przy najmniejszej zawartości składników pokarmowych w pożywce. Na tym etapie prowadzenia hodowli badane drobnoustroje odznaczały się wysoką zawartością komórkowego ATP [2].

W niniejszej pracy techniką SDS-PAGE dokonano wstępnej identyfikacji zmian w profilach zewnątrzkomórkowych biopolimerów syntetyzowanych przez komórki *Proteus vulgaris*. Ekstrakcje pozakomórkowych białek przeprowadzono w 144. h trwania hodowli. Wówczas bakterie *Proteus vulgaris* odznaczały się najniższym stanem energetycznym, co dowodziło przeprowadzeniu przez komórki zmian w strukturze pozakomórkowej membrany. Ponadto we wszystkich wariantach eksperymentu w 144. h efektywność kolonizacji powierzchni stali nierdzewnej przez badane drobnoustroje była analogiczna jak w 145., 147. oraz w 151. h procesu.

Wyniki badania wpływu dostępności składników odżywczych środowiska wzrostu mikroorganizmów na syntezę zewnątrzkomórkowych białek przedstawiono na rys. 2. W komórkach *Proteus vulgaris* inkubowanych w warunkach głodowych stwierdzono wyraźne ograniczenie syntezy zewnątrzkomórkowych białek o względnej masie cząsteczkowej, mieszczącej się w zakresie  $14,2 \cdot 10^3$  Da –  $36 \cdot 10^3$  Da. W tym wariantcie eksperymentu wystąpił brak syntezy białka o ciężarze cząsteczkowym



wynoszącym około  $36 \cdot 10^3$  Da. W hodowli *Proteus vulgaris*, prowadzonej na pożywce o optymalnej dostępności substancji odżywczych, efektywność biosyntezy białka o masie cząsteczkowej  $36 \cdot 10^3$  Da, była duża (o czym świadczy intensywność barwy rozdzielonego pasma).



Rys. 2. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na profil zewnątrzkomórkowych białek komórek *Proteus vulgaris* (B - inkubowanych w warunkach głodowych, C - inkubowanych w warunkach optymalnych, A - marker białkowy).

Fig. 2. The influence of the nutrients availability in the medium on extracellular protein profile of *Proteus vulgaris* cells (B - incubated under starvation conditions, C - incubated under optimal conditions, A - molecular weight marker).

Zewnątrzkomórkowe biopolimery są cząsteczkami, których biosynteza sygnalizuje bardzo niską koncentrację lub brak związków pokarmowych w środowisku wzrostu drobnoustrojów. W warunkach głodowych substancje te stanowią rezerwar energii i monomerów, wykorzystywanych przez komórkę do podtrzymywania szeroko rozumianej aktywności fizjologicznej [14]. Redukcję syntezy pozakomórkowych białek w warunkach głodowych wykazywały patogenne szczepy *Vibrio* ssp. oraz



*Pseudomonas* ssp. [9, 20]. Po 7 dniach prowadzenia hodowli w warunkach głodowych produkcja egzogennych białek przez te drobnoustroje zmalała o 50%, a po 30 dniach – o 80%, w porównaniu z wytwarzaniem tych związków w środowisku o optymalnej podaży substancji odżywczych. Liu i Tay [13] wykazali, że syntetyzowane przez *Bacillus stearothermophilus* w warunkach głodowych pozakomórkowe białka są również inicjatorami procesu adhezji. Usunięcie zewnętrznej warstwy białkowej za pomocą trypsyny lub SDS powodowało znaczą (nawet 100-krotną) redukcję adhezji *Enterococcus* spp. i *Bacillus* spp. do powierzchni stali nierdzewnej [6, 16].

### Wnioski

1. Wykazano bezpośredni wpływ ograniczonej zawartości składników pokarmowych w środowisku wzrostu na efektywność tworzenia się biofilmu *Proteus vulgaris* na powierzchni stali nierdzewnej.
2. Trwała kolonizacja powierzchni stali nierdzewnej przez drobnoustroje występowała już w początkowych etapach badania adhezji.
3. Komórki *Proteus vulgaris* inkubowane w warunkach głodowych odznaczały się wyższym stanem energetycznym, co związane było z wyraźną redukcją lub brakiem syntezy części zewnątrzkomórkowych białek.
4. Zmiany w profilach zewnątrzkomórkowych białek drobnoustrojów poddanych oddziaływaniu stresu głodowego indukowały proces adhezji komórek do powierzchni stali nierdzewnej.

### Literatura

- [1] Beveridge T. J.: Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J. Bacteriol., 1999, **181**, 4725- 4733.
- [2] Blackburn C. W., Gibbs P. A., Roller S. D., Johal S.: Use of ATP in microbial adhesion studies. In: Stanely P. E., McCarthy B. J., Smither R.: ATP Luminescence: rapid methods in microbiology. Blackwell Scientific Publications, London 1989.
- [3] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal. Biochem., 1976, **72**, 248- 254.
- [4] Blum H., Beier H., Gross H., J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electroporesis, 1987, **8**, 1 93- 99.
- [5] Czaczyk K.: Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Post. Microbiol., 2004, **43** (3), 267-283.
- [6] Flint S. H., Brooks J. D., Bremer P. J.: The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci colonising stainless steel. J. Appl. Microbiol., 1997, **83**, 508-511.
- [7] Han Y., Sherman D. M., Linton R. H., Nielsen S. S., Nelson P. E.: The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. Food Microbiol., 2000, **17**, 521-533.
- [8] Hood M. A., Guckert J. B., White D. C., Deck F.: Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol., 1986, **52**, 788-793.

- [9] Husevag B.: Starvation survival of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in seawater. FEMS Microbiol. Ecol., 1995, **16**, 25-32.
- [10] Julien C., Benezech T., Carpentier B., Lebret V., Faile C.: Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. J. Food Eng., 2002, **56**, 77-87.
- [11] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **222**, 680- 685.
- [12] 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.
- [13] Liu Y., Tay J. H.: Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. World J. Microbiol. Biotechnol., 2001, **17**, 111-117.
- [14] Matin A.: Physiology, molecular biology and applications of the bacterial starvation response. J. Appl. Bacteriol. Supl., 1992, **73**, 181-185.
- [15] Mossel D. A. A.: Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all *Enterobacteriaceae*. J. Bact., 1962, **84**, 381-386.
- [16] 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, **11**, 675-685.
- [17] Salusbury T. T., Deans J. S., Stewart I. W.: Rapid detection of airborne microorganisms by ATP assay. In: Stanely P. E., McCarthy B. J., Smither R.: ATP Luminescence: rapid methods in microbiology. Blackwell Scientific Publications, London 1989.
- [18] Sanin S. L., Sanin F. D., Bryers J. D.: Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochem., 2003, **38**, 909-914.
- [19] Tavares F., Sellstedt A.: A simple, rapid and non- destructive procedure to extract cell wall-associated proteins from *Frankia*. J. Microbiol. Met., 2000, **39**, 171- 178.
- [20] Wai S. N., Mizunoe Y., Yoshida S.: How *Vibrio cholerae* survive during starvation. FEMS Microbiol. Lett., 1999, **180**, 123-131.
- [21] Valcarce M. B., Busalmn J. P., de Sanchez S. R.: The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. Inter. Biodeter. Biodegrad., 2002, **50**, 61-66.
- [22] 3-A sanitary standards for storage tanks for milk and milk products. *3-A Sanitary Standard 01-07*. International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, Ames, Iowa, USA, 1990

#### THE ROLE OF EXTRACELLULAR PROTEINS IN *PROTEUS VULGARIS* ADHESION TO THE SURFACE OF STAINLESS STEEL

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

The aim of the study was to define the role of extracellular proteins in the *Proteus vulgaris* adhesion process to the stainless steel. The dependences between the ATP level in the cells, changes in the profiles of extracellular proteins and the *Proteus vulgaris* adhesion to the abiotic surfaces were also defined. Cultures of bacteria were led on the optimal and reduced nutrients content. In all experimental variants the starvation conditions induced the bacterial cells adhesion to the surfaces of stainless steel. Stable colonization of the stainless steel surface occurred at the beginning of adhesion analysis. Upon nutrient - limited conditions *Proteus vulgaris* cells were at the higher energetic level which influenced on the visible

reduction or even lack of extracellular proteins synthesis with molecular weights between  $14,2 \times 10^3$  Da and  $36 \times 10^3$  Da.

**Key words:** biofilm, adhesion, *Proteus vulgaris*, stainless steel, SDS-PAGE 