

Powstawanie biofilmu w warunkach przemy.

Cz. 1. Mechanizm formowania biofilmu i jego struktura.

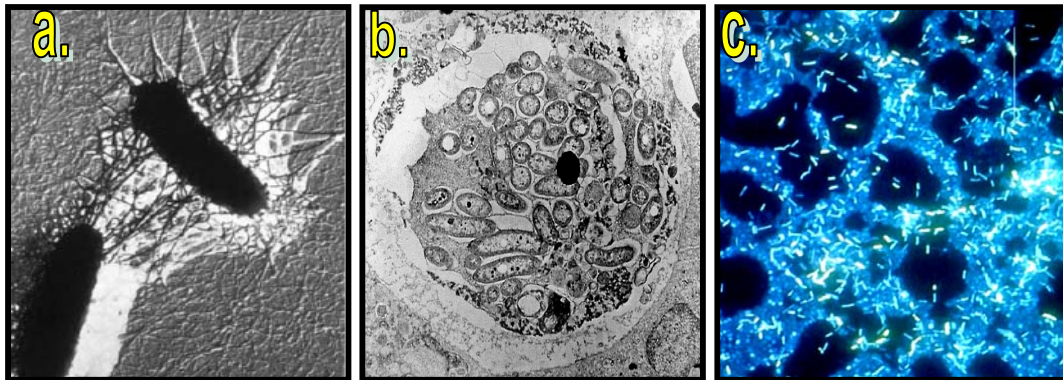
Dr. habil. Anna Sałek

International Bio-Consulting, Germany; Domatec GmbH, Niemcy

Anna.Salek@T-Online.de www.international-bio-consulting.com

Co to jest biofilm?

Biofilmy to złożone struktury biologiczne tworzące się w postaci hydrożelu na prawie każdej powierzchni i na różnego typu materiałach, pod warunkiem, że są one w ciągłym kontakcie z wodą. Najczęściej jest to dynamiczny kompleks zagregowanych drobnoustrojów, oblepionych pewnego rodzaju szlamem (Rys.1). Biofilm składa się z wielu gatunków bakterii i pierwotnych organizmów (*archaea*), żyjących w granicach matrycy, powstałej z wydzielanych poza komórkę polimerycznych substancji (*extracellular polymeric substances*, EPS).



Rys. 1. Bakterie *Legionella pneumophila* (a) uwięzione w wytworzonym szlamie (15 – 85%) (b) i (c) [Courtesy of Flemming].

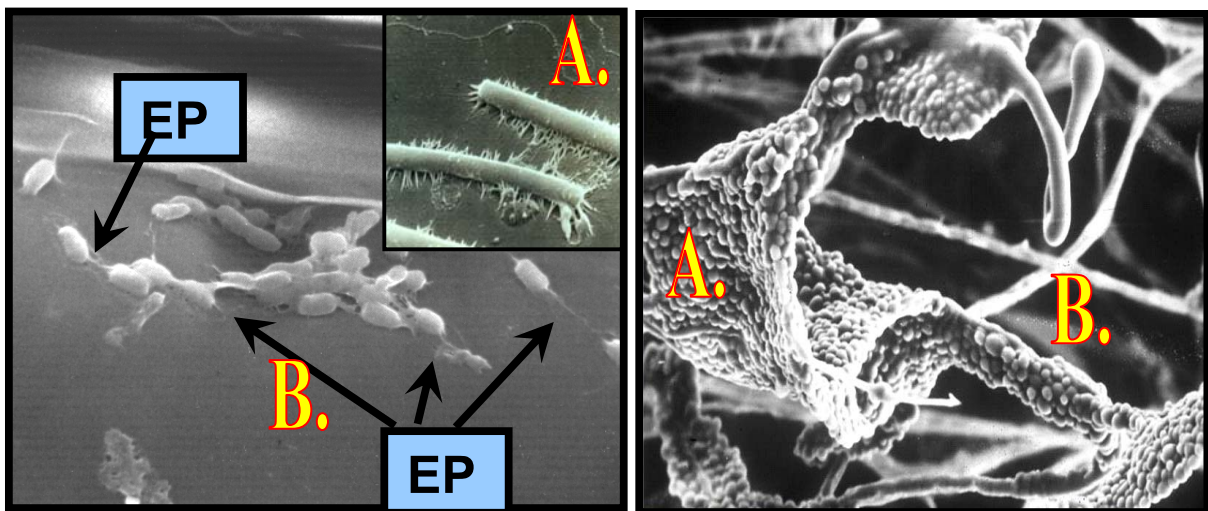
Zasadniczo biofilm może ukształtować się na dowolnej powierzchni, wystawionej na działanie bakterii i dostatecznej ilości wody. Raz „zakotwiczone” na podłożu stałym drobnoustroje formują biofilm i wywołują rozliczne szkodliwe reakcje w otaczającym środowisku [Rogers i in., 1994b; Little & Lee, 2007]. Biofilm tworzy się również, gdy bakterie przylegają do powierzchni pozostających na stałe pod wodą. I w tym przypadku drobnoustroje zaczynają

wydzielać lepka, jak klej substancję, która przytwierdza je do różnych materiałów takich, jak metale, plastik, cząstki ziemi, drewno, czy tkaniny.

Biofilm mogą kształtować pojedyncze gatunki drobnoustrojów (np. monokultury *Legionella* sp.), jednak najczęściej w skład hydrożelu wchodzi wiele rodzajów mikroorganizmów, a ponadto fragmenty organiczne, pochodzące z żywych komórek oraz produkty korozji. Elementy te stanowią swoisty, złożony ekosystem [MacDonald & Brźszel, 2000; Little & Lee, 2007].

Struktura biofilmu

Biofilm charakteryzuje się heterogeniczną strukturą, genetyczną różnorodnością, złożonymi interakcjami w populacji drobnoustrojów i pozakomórkową matrycą polimerycznych substancji (EPS).



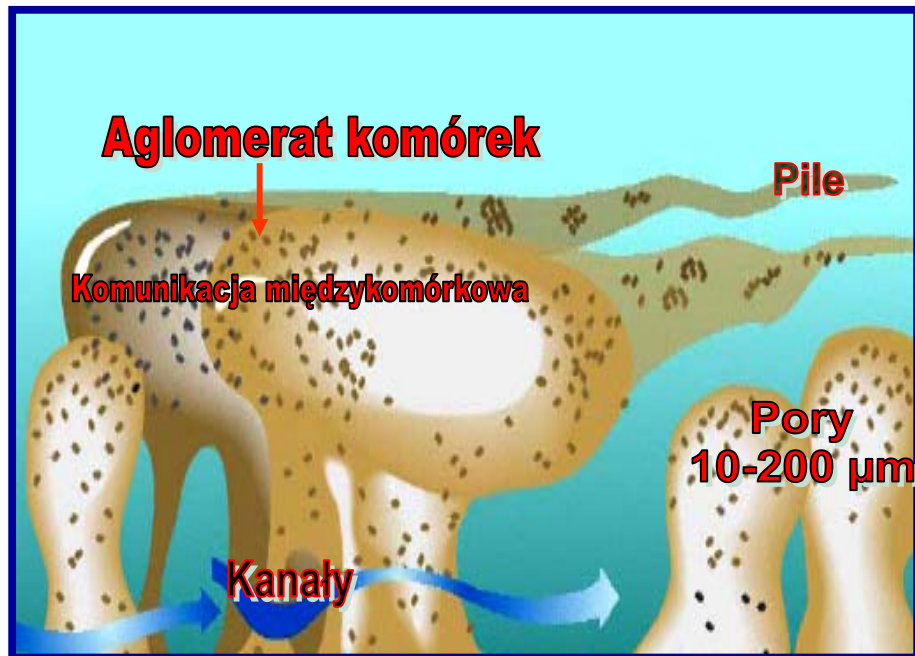
Rys. 2. Bakterie *Legionella pneumophila* (A), egzystujące w biofilmie, powiązane zewnątrzkomórkową substancją polimeryczną, EPS (B).

EPS jest więc mieszaniną różnych polimerów, zawierającą, m.in. polisacharydy, białka, fosfolipidy i kwasy nukleinowe, wzajemnie powiązane. Niezależnie od zmiennych elementów organicznych, pochodzących z mikroorganizmów, EPS stanowi ważną frakcję biofilmu (Rys. 2), bardzo zróżnicowaną pod względem genezy i właściwości fizyko-chemicznych, identyfikowanych u różnych mikroorganizmów specyficznymi lektynami.

Niektóre z wielocukrowców biofilmu mają charakter obojętny, inne zaś, jak w przypadku Gram-ujemnych bakterii *Legionella pneumophila* czy *Pseudomonas aeruginosa*, są polianionami, wykazującymi niezwykłą łatwość w łączeniu się z kationami wapnia (Ca^{+2}) i magnezu (Mg^{+2}), tworząc zręby matrycy biofilmu (np. egzopolisacharyd alginianu, produkowany przez *Pseudomonas aeruginosa*). W przypadku bakterii Gram-dodatnich, np. *Staphylococcus* sp., skład chemiczny EPS jest wyraźnie inny, aniżeli u bakterii Gram-ujemnych i powoduje, że te polisacharydy mają przeważnie charakter kationowy [Geesey i in., 2000; Little & Lee, 2007].

Generalnie, EPS są wysoce uwodnione, ponieważ w ich strukturę wbudowana jest duża liczba cząsteczek wody, dzięki wiązaniom wodorowym. Większość typów EPS ma charakter zarówno hydrofilny, jak i hydrofobowy. Produkcja EPS uzależniona jest od składników odżywczych w środowisku „kolonizowanym”. Spowolniony wzrost bakterii oraz nadmiar substratu z dostępnym źródłem węgla, limitowanie azotu, potasu i fosforanów sprzyja syntezie EPS [Little & Lee, 2007].

W środowisku o tzw. dużej sile ścinającej (turbulentne przepływy) biofilm przybiera postać rozciągniętych pasków, rozłożonych w cienkiej warstwie, wzdłuż powierzchni przylegania. Natomiast w środowiskach wodnych o niskim przepływie, biofilm tworzy swoją masę w postaci „grzyba” („mushroom-like”) (Rys. 3).



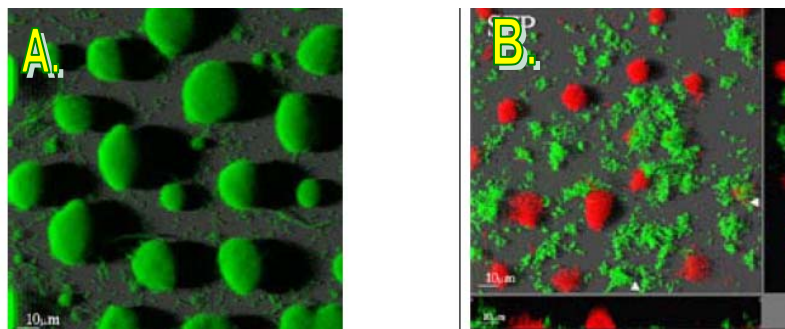
Rys. 3. Diagram przedstawia zróżnicowaną strukturę biofilmu: z pilami, porami i formami w postaci grzyba oraz sposób komunikacji między komórkami w strukturze matrycy EPS.

Wydzielane przez bakterie pewne związki chemiczne o niskim ciężarze cząsteczkowym (podobne do cytokin), sygnalizują osiągnięcie krytycznego progu gęstości biofilmu. Ponadto stwierdzono, że większość typów biofilmu ma różne pory i wodne kanały, rozprawdzające substancje odżywcze, tlen oraz wyżej wymienione cząsteczki sygnałne (jako rodzaj informacji komórkowych). Dystrybucja tych substancji odbywa się w sposób kontrolowany przez komórki bakterii i niekiedy limitowany.

Obecnie do przyżyciowego (*in situ*) oszacowania struktury biofilmu, stosuje się nowoczesną technikę mikroskopową z użyciem laserowego mikroskopu skaningowego (*confocal laser scanning microscopy*), tzw. technikę widma Raman. Proces optycznych obserwacji poprzedzony jest skomplikowanym barwieniem komponentów biofilmu, ponieważ biofilm tworzy mieszanina różnych polimerów, tj. wspomnianych wyżej polisacharydów, białek i kwasów nukleinowych [Jørgensen i in., 2003]. Autorzy techniki przekonują, że „Raman Mikroskopia” to obiecujące narzędzie w analizie biofilmów.

Mechanizm powstawania biofilmu jako ekosystemu

Formowanie biofilmu na dogodnych powierzchniach inicjują tylko niektóre bakterie, wiążąc się wstępnie słabymi (odwracalnymi) wiązaniami *van der Waalsa* z powierzchnią materiału, pozostającą w permanentnym kontakcie z wodą (Rys. 4).



Rys. 4. A. – Formowanie mikrokolonii z *Acinetobacter* w biofilmie. B. – Dwa rodzaje biofilmu: z *Acinetobacter* (DNA, kolor czerwony) i z *Pseudomonas putida* (kolor zielony) [Jørgensen i in., 2003].

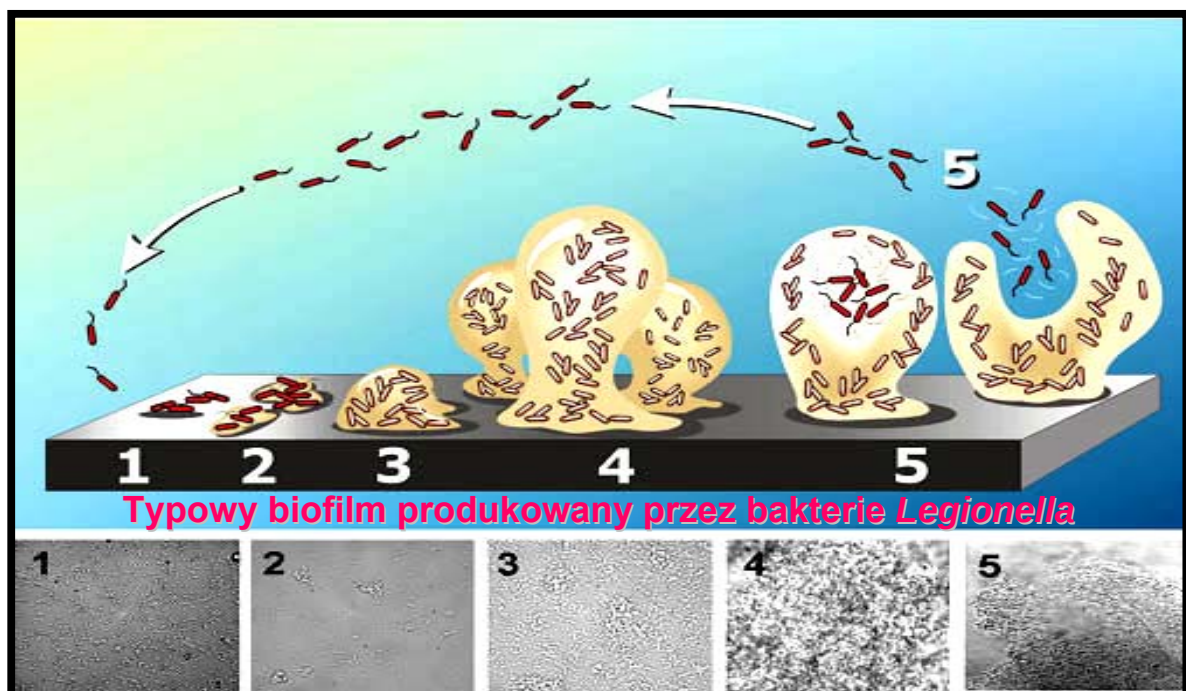
Jeśli przylegające bakterie nie zostaną natychmiast usunięte, mogą „zakotwiczyć” się na stałe przy pomocy elementów komórkowych umożliwiających adhezję, znanych jako pile. Ci

pierwsi „koloniści” ułatwiają aglomerację innym bakteriom dzięki rozmaitym możliwościom wzajemnego wiązania się oraz stwarzają zręby matrycy EPS, nadającej biofilmom określoną strukturę. Zasadniczo matryca jest dość mocna, a w kilku przypadkach stwierdzono, że dzięki niej i pewnym związkom mineralnym (np. Ca^{+2} , Mg^{+2}) cały biofilm może przybierać postać nieco skamieniałą. Pozostałe bakterie łączą się z „protoplastami” biofilmu, bądź bezpośrednio z matrycą [Geesey i in., 2000].

Cały proces formowania „dojrzałego” biofilmu zawiera się w czterech stadiach [Little & Lee, 2007] (Rys. 5):

1. wstępna, odwracalna adhezja do powierzchni stałej (*initial attachment*),
2. sekrecja EPS i nieodwracalna adhezja na powierzchni materiału (*attachment*),
3. kolonizacja bakterii i ich wzrost oraz powiększania objętości biofilmu (*colonization*),
4. proces dojrzewania biofilmu i powstawanie mikrokolonii.

Cykl tworzenia biofilmu zamyka piąte stadium, tj. śmierć komórek i dyspersja pojedynczych komórek do planktonu, a następnie rozpoczęcie nowego cyklu życiowego.

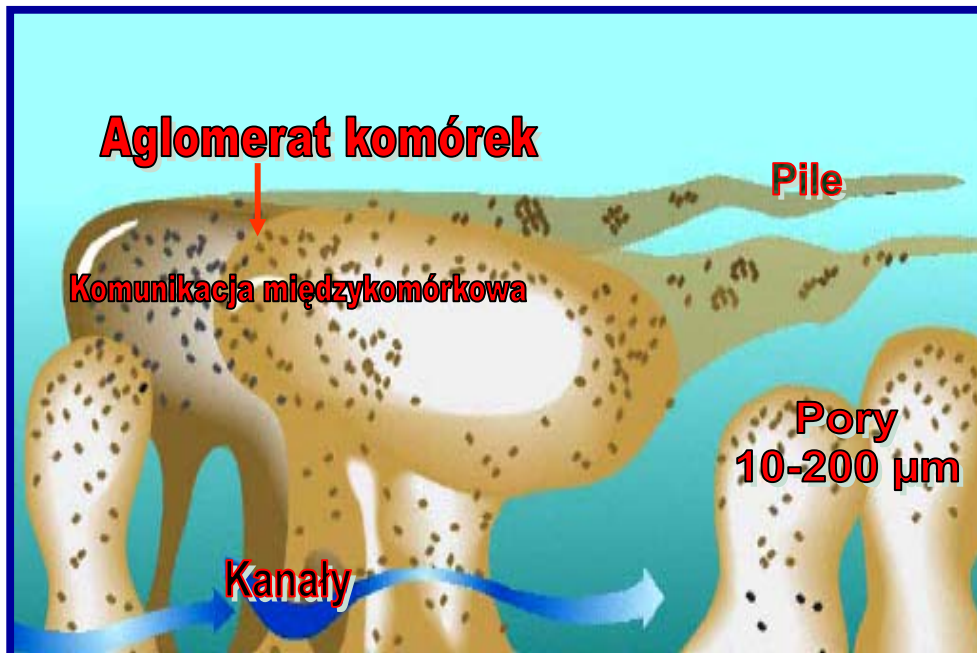


Rys. 5. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych, zanurzonych w wodzie. Biofilm w kształcie „grzyba” („mashroom-like”) [Lewandowski i in., Montana State University – Bozeman, 1996, internet].

U większości bakterii, w wyniku rozpoczętej kolonizacji, objętość biofilmu rośnie za sprawą intensywnych podziałów komórkowych, a jego grubość (np. 30 μm tylko dla *Pseudomonas aeruginosa* jako monokultury lub 40 μm w koegzystencji z *Klebsiella pneumoniae*) jest efektem wieku biofilmu i ilości gatunków występujących mikroorganizmów.

Z reguły komórki bakterii na powierzchni biofilmu są inne, aniżeli komórki z głębi matrycy [Anderl i in., 2000; Danese i in., 2000; Elasril i in., 2000; van der Kooij i in., 2005]. Interesujące było stwierdzenie pewnej cechy fenotypowej, objawiającej się podwyższoną wirulentnością bakterii leżących wewnątrz biofilmu. Zachowanie osadzonych wewnątrz matrycy komórek zmienia się wraz z grubością biofilmu. Zewnętrzne komórki, niezależnie od wieku biofilmu, upodabniają się do młodych form i są metabolicznie aktywne oraz duże, a ponadto dzielą się, powiększając grubość struktury hydrożelu. Komórki wewnątrz biofilmu z powodu ograniczonego dostępu do tlenu i substratów, są mniejsze, rosną wolniej (lub wcale), pozostając w stanie uśpienia, a aktywacji ulegają wówczas, gdy komórki z zewnętrznych warstw są zabite.

W środowisku o tzw. dużej sile ścinającej, wynikającej z turbulentnego przepływu, biofilm przybiera postać rozciągniętych pasków, rozłożonych w cienkiej warstwie wzdłuż powierzchni przylegania. Natomiast w środowiskach wodnych o niskim przepływie, biofilm tworzy swoją masę w postaci „grzyba” („mushroom-like”) (Rys. 5 i 6).



Rys. 6. Diagram przedstawia zróżnicowaną strukturę biofilmu: z pilami, porami i formami w postaci grzyba oraz sposób komunikacji między komórkami w strukturze matrycy EPS.

Wydzielane przez bakterie pewne związki chemiczne o niskim ciężarze cząsteczkowym (podobne do cytokin), sygnalizują osiągnięcie krytycznego progu gęstości biofilmu. Ponadto stwierdzono, że większość typów biofilmu ma różne pory i wodne kanały, rozprawdzające substancje odżywcze, tlen oraz wyżej wymienione cząsteczki sygnałne (jako rodzaj informacji komórkowych). Dystrybucja tych substancji odbywa się w sposób kontrolowany przez komórki bakterii i niekiedy limitowany.

Pewną korzyścią dla bakterii jest ochronne działanie biofilmu i zwiększona tym samym odporność mikroorganizmów na detergenty i antybiotyki. Biofilm to ważna forma i sposób na przeżycie dla wielu komórek bakteryjnych, osłania je bowiem przed zabójczymi dla bakterii toksynami, fagocytami, bakteriocydami i czynnikami fizyko-chemicznymi. Generalnie biofilm jest znacznie oporniejszy na środki odkażające, aniżeli plankton. Chlorowanie biofilmu zwykle nie przynosi zamierzonego efektu, ponieważ środek bakteriobójczy zabija jedynie bakterie leżące w zewnętrznej warstwie biofilmu. Bakterie schowane w wewnętrznych granicach biofilmu pozostają żywe i mogą dalej rozmnażać się. Powtórne użycie czynników bakteriobójczych może tylko spowodować oporność tych bakterii na biocydy [Song & Kinney, 2000].

Sądzi się, że ok. 90% populacji mikroorganizmów wchodzi w skład biofilmu, a ich różnorodność i zmienność determinują warunki fizyko-chemiczne środowiska wodnego, tj. temperatura, pH, ilość i rodzaj substratów, dostęp do tlenu, parametry fizyczne powierzchni adhezyjnych oraz ich wyeksponowanie na turbulencję przepływu.

Z punktu widzenia przemysłu, ochrony środowiska i zdrowia ludzkiego, do najbardziej niebezpiecznych gatunków bakterii biofilmu, należy zaliczyć *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* (pałeczki okrężnicy, w tym EHEC), *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* sp. i *Salmonella* sp. Bakterie te mogą skolonizować powierzchnie materiałowe, prowadząc do formowania gęstego śluzu jako biofilmu, chroniącego formy patogenne przed zewnętrznym fizycznym stresem, chemicznymi inhibitorami i środkami dezynfekującymi.

Powstawanie biofilmu w warunkach przemysłowych.

Cz. 2. Zagrożenia bakteriami *Legionella pneumophila* .

Dr. habil. Anna Sałek

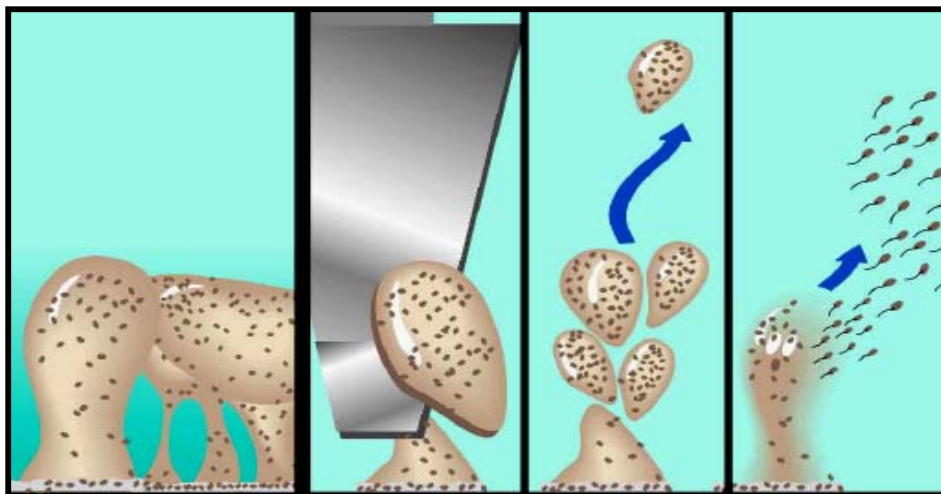
International Bio-Consulting, Germany; Domatec GmbH, Niemcy

Anna.Salek@T-Online.de www.international-bio-consulting.com

Metody likwidacji biofilmu

Konwencjonalne metody zabijania bakterii zasiedlających biofilm, użycie antybiotyków, czy typowa dezynfekcja chlorem, są często nieefektywne. Ogromne dawki środków przeciwbakteryjnych, stosowane celem zainaktywowania biofilmu są dla środowiska wysoce niepożądane (i być może niedozwolone przez obowiązujące regulacje), a w przemyśle oraz w medycynie - niepraktyczne i szkodliwe dla zdrowia ludzkiego.

Jednym ze skutecznych sposobów likwidacji biofilmu jest metoda kombinowana, tj. wstępne mechaniczne rozbicie hydrożelu (co przedstawia poniższy rysunek, Rys. 1), a następnie chemiczna, bądź termiczna inaktywacja (powyżej 70°C, przez co najmniej 2 minuty) odsłoniętych pojedynczych komórek bakterii w planktonie.



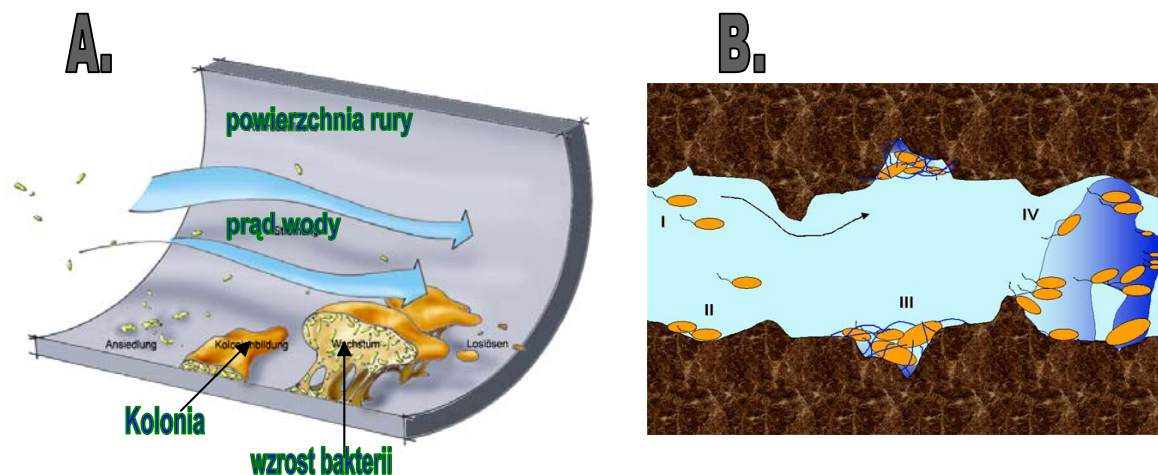
Rys. 1. *Mechaniczne rozbicie biofilmu w następstwie czego następuje dyspersja biofilmu i powrót bakterii do planktonu [Lewandowski i in., Montana State University – Bozeman, internet].*

Opracowanie nowych strategii likwidacji biofilmu, opartych na lepszym zrozumieniu procesu tworzenia się biofilmu jest pilną potrzebą dla wielu przemysłów w celu ograniczenia strat. Stąd niezbędne jest monitorowanie środowisk o szczególnym potencjale zagrożenia, np. przemysłowe wody w wieżach chłodniczych [Türetgen & Cotuk, 2007].

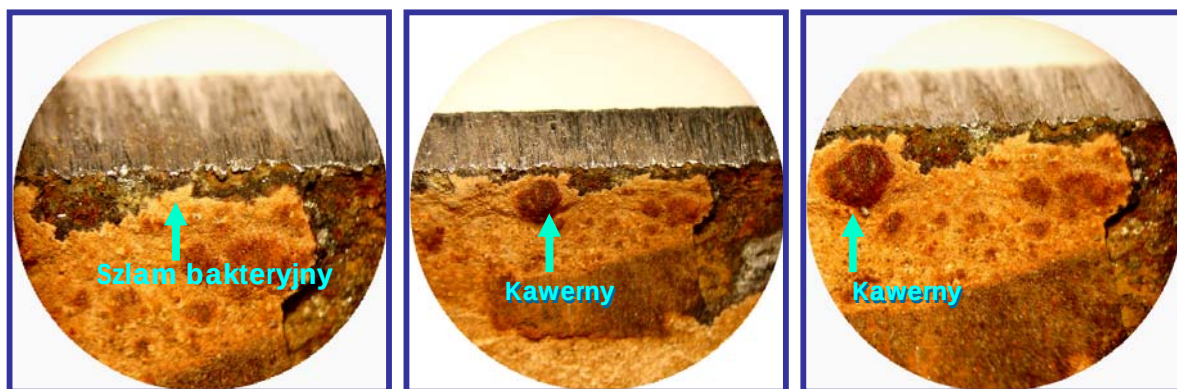
Lokalizacja biofilmu

Występowanie biofilmów w przyrodzie jest bardzo popularne z uwagi na zasiedlające bakterie i ich zdolności do aglomeracji.

W środowisku przemysłowym biofilmy mogą rozwinąć się na wewnętrznych stronach rur (Rys. 2, 3) i prowadzić do zatorów oraz korozji, a bakterie beztlenowe, które redukują siarczany do siarkowodoru przyczyniają się do perforacji materiału sieci wodnej. Z kolei bakterie tlenowe są odpowiedzialne za korozję oksydacyjną metali.



Rys. 2. Tworzenie się biofilmu po wewnętrznej stronie rur w instalacji wodnej. A. Schemat wnętrza rury. B. Przekrój poprzeczny rury z formującym się biofilmem.



Rys. 3. *Obraz wewnętrzny rury z cyrkulującą ciepłą wodą. Zdjęcia wnętrza skorodowanej i obłożonej biofilmem rury z systemu doprowadzającego ciepłą wodę (Photo: A. Salek).*

Biofilmy mogą utrudnić również utrzymanie higieny w obiektach użytku publicznego, jak w hotelach, szpitalach, w placówkach fizykoterapeutycznych, w zakładach żywienia zbiorowego, w przemyśle spożywczym oraz w warunkach domowych. Pojawianie się biofilmów w sposób niekontrolowany, o przypadkowym, patogennym składzie, powoduje ogromne negatywne skutki, godzące w ochronę środowiska, w bezpieczeństwo pacjentów (infekcje w szpitalach) i zdrowie ludzkie. Ponadto mikrobiologiczne biofilmy, tworzące się na powierzchniach różnych materiałów i urządzeń, powodują szkody w wyposażeniach, aparaturze, niszczą wytwarzane produkty, wywołują straty energii, co w konsekwencji kosztuje miliardy Euro rocznie.

Problematyka biofilmu w browarnictwie

Skażenia mikroorganizmami są przedmiotem stałego zainteresowania w przemyśle spożywczym. Większość zakładów produkcyjnych boryka się z problemem biofilmu w urządzeniach przemysłowych, jak w systemach chłodniczych i wymiany ciepła, w sieci dostarczającej wodę technologiczną oraz w ciągu kanalizacyjnym.

W browarach również istnieje ryzyko infekcji drobnoustrojami w końcowym produkcie, jakim jest piwo, chociaż skażenia mikrobiologiczne dotyczą tylko pewnej grupy bakterii, odpornej na niskie pH (3.8 - 4.7), na obecność gorzkich lupulin pochodzących z chmielu (w przybliżeniu 17-55 mg iso- α -kwasów/l) i na pewną zawartość etanolu (0 - 8% w/v). Dlatego też ilość mikroorganizmów psujących piwo i wytwarzających biofilm - jest ograniczona do kilku rodzajów,

jak *Lactobacillus brevis*, *L. Lindnerii*, *Pediococcus damnosus*, czy beztlenowiec *Pectintus* sp. [Timke in., 2004a; Timke, 2004b; Timke i in., 2005].

Interrelację tych mikroorganizmów z pozostałymi drobnoustrojami w biofilmie wspierają warunki acidofilne i beztlenowe, wytworzone przez proces technologiczny produkcji piwa. Bakterie pochodzące z zepsutego piwa są bardzo wrażliwe na ciepło, środki dezynfekujące i wilgotność środowiska wzrostu, stąd przy życiu utrzymują się tylko dzięki aglomeracji w biofilmie z formami oporniejszymi na ww. czynniki [Timke i in., 2004a; Timke, 2004b; Timke i in., 2005].

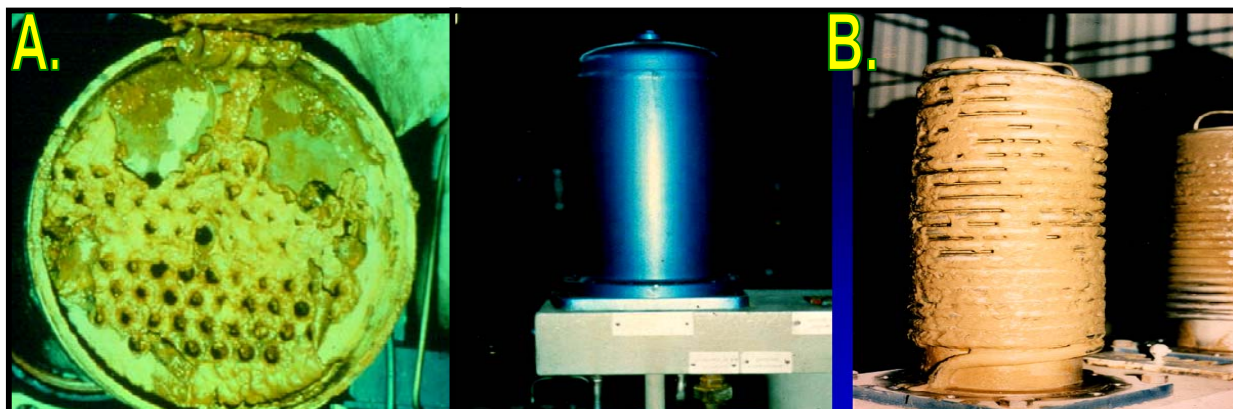
Panująca w browarze wilgotność i ciągły kontakt sprzętu z wodą, sprzyja osadzaniu się szlamu i biofilmu. Za kolonizację wilgotnych powierzchni w browarnictwie odpowiedzialne są przede wszystkim bakterie z gatunku *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter frateurii*. Ponadto wszechobecny jest szlam, zalegający szczególnie pewnego rodzaju nisze w instalacjach produkcyjnych, w którym rozwijają się bakterie jelitowe, jak *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* i inne.

Następnie, osadzają się różne drożdże, m.in. *Rhodotorula* oraz pałeczki bakterii mlekowych. Uprzednio zakwaszone przez bakterie octowe środowisko kolonizacji sprzyja acidofilnym bakteriom mlekowym. Bakterie octowe i drożdże wyczerpują tlen i stwarzają warunki beztlenowe w szlamie. Obecność mleczanu, który powstaje w wyniku rozwoju bakterii kwasu mlekowego, umożliwia kolonizację mikroorganizmów beztlenowych, psujących piwo, jak *Pectinatus* spp. i *Megasphaera* sp. Piwo i jego piana są same w sobie doskonałą pożywką dla drobnoustrojów, stąd biofilmy w browarnictwie są siedliskiem mikroorganizmów psujących gotowy produkt.

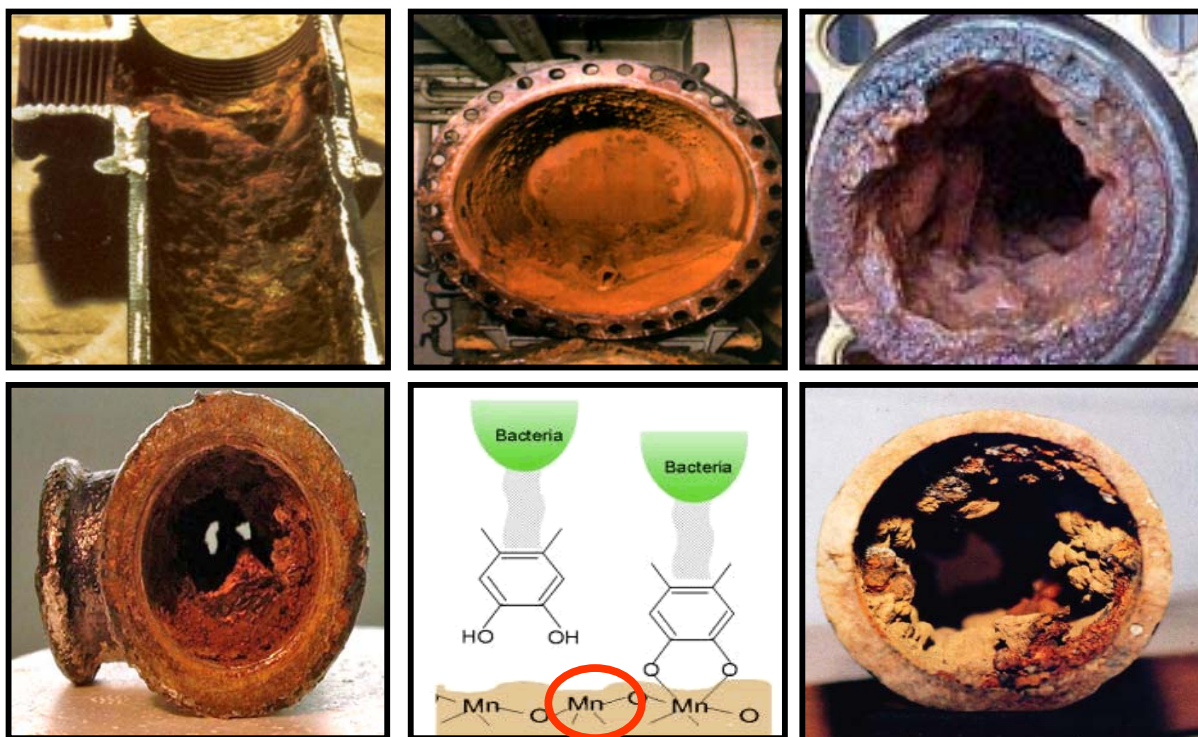
Infekcja piwa podczas procesu produkcyjnego jest zdefiniowana jako podstawowe zanieczyszczenie [Timke i in., 2004a; Timke i in., 2005]. Zakażenie całego zakładu drobnoustrojami z uformowanego, dojrzałego biofilmu jest szybkie, a ich przedostanie się do butelek powoduje tzw. drugorzędne zanieczyszczenie, które ma miejsce podczas butelkowania w rozlewni piwa. Są dwie zasadnicze strategie, by uniknąć mikrobiologicznego zanieczyszczenia: jest to pasteryzacja piwa oraz konserwacja i odkażanie aparatury.

W rozlewni piwa na wielu urządzeniach tworzy się brunatny skamieniały osad, lub półpłynny szlam, zawierający najczęściej bakterie *Pediococcus* i *Acetobacter*.

Niezmiernie ważnym w przemyśle, również w browarnictwie, jest problem osadzania się biofilmu, znacznie inkrustowanego kamieniem, na urządzeniach chłodniczych i wymiennikach ciepła, szczególnie z cyrkulacją wody (Rys. 4).



Rys. 4. Twardy, skamieniały biofilm w systemie chłodniczym (A) oraz na wymiennicach ciepła (B).



Rys. 5. Biofilm w rurach przemysłowych, inkrustowany związkami mineralnymi, jak wapń, mangan lub magnez.

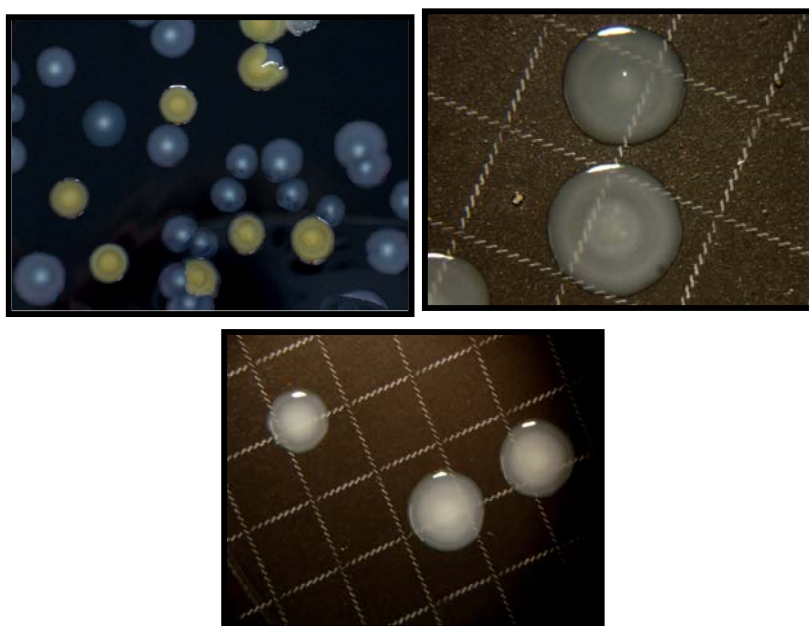


Rys. 6. Rodzaje biofilmu na kratkach przepływowych w instalacji wodno-kanalizacyjnej.

W biofilmie, utworzonym w warunkach, zarówno przemysłowych, jak i domowych, obok niechorobotwórczych gatunków bakterii, np. *Pseudomonas* sp., mogą pojawić się bakterie *Legionella pneumophila* (różnych grup serologicznych) odpowiedzialne za chorobę zwaną legionelloza [Murga i in., 2001].

Stymulatory i inhibitory procesu tworzenia biofilmu

Problematyka wspomnianych wyżej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i *Legionella pneumophila* (Rys. 7), szczególnych patogenów, pojawia się nie tylko w ośrodkach użyteczności publicznej (baseny, hotele, szpitale, sanatoria) lecz również w zakładach przemysłu spożywczego.



Serogrupa 1

Serogrupa 1

Serogrupa 2-15

Rys. 7. *Legionella pneumophila* serogrupa 1 na podłożu selektywnym GVPC (a), na czarnym filtrze celulozowo-octanowym i pożywce GVPC (b) i *L. pneumophila* serogrupy 2-15 również na czarnym filtrze celulozowo-octanowym umieszczonym na pożywce GVPC [Photo: A. Salek].

W browarnictwie, z zagadnieniem bakterii *Legionella* spotkać się można wówczas, gdy klasyczny proces technologiczny poddany jest modernizacji wg nowych trendów, np. podczas suplementacji brzeczek związkami mineralnymi. Ponadto jakość i skład chemiczny wód technologicznych (stężenie elektrolitów, jonów nieorganicznych, TOC i pH) w dużej mierze warunkuje potencjał zagrożenia bakteriami *Legionella* i pałeczkami jelitowymi. Wynika to z faktu specyficznych zapotrzebowań i właściwości fizjologicznych w.w. bakterii na związki mineralne, szczególnie na te, które są interesujące z punktu widzenia technologii piwowarstwa (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+3}).

Wiadomo, że bakterie *Legionella pneumophila* i inne bakterie Gram-ujemne są wrażliwe na związki chelatujące (np. EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid czy cytrynian), powszechnie stosowane przy sanizacji obiektów zakażonych tymi mikroorganizmami. Na tej podstawie stwierdzono, że szczególnie *Legionella pneumophila* do aktywnego wzrostu i metabolizmu potrzebuje właśnie tych metali, które są wiązane przez EDTA. Wyjątkowo ważne dla prawidłowego metabolizmu bakterii *Legionella* jest żelazo, cynk, mangan i miedź. Metale te wchodziły w skład trzech klas metalo-enzymów, dysmutazy nadtlenkowej (SOD, *superoxide dismutase*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD*), osłaniających komórkę przed ujemnymi efektami nadtlenku wodoru, katalazy, peroksydazy i innych oksydantów ze środowiska [John & Steiman, 1996; Reeves i in., 1981; Sadosky i in., 1994; Yaradou i in., 2007].

Istnieje więc ryzyko, że zbyt duża zawartość żelaza w wodzie technologicznej może sprzyjać rozwojowi bakterii *Legionella pneumophila* i tworzeniu się biofilmu w instalacjach systemu wodnego browaru. Ponadto suplementacja brzeczek jonami Zn^{+2} , czy Cu^{+2} również wspiera system enzymatyczny dysmutaz, ochraniając bakterie *Legionella pneumophila*, poprzez aktywność SOD, przed wolnymi rodnikami.

Jony Zn^{+2} , niezależnie od bioaktywności w dysmutazach, odgrywają ważną rolę w mechanizmie adsorpcji bakterii *Legionella* do powierzchni innych mikroorganizmów, rozwijających się w biofilmie, co jest związane z systemem receptorowym *Legionella pneumophila* i wzmożoną, w wyniku podwyższonej koncentracji jonów cynku, zdolnością adhezyjną do innych komórek.

W przeciwieństwie do jonów cynku miedź sama w sobie, jako metal, jest doskonałym inhibitorem wzrostu bakterii *Legionella pneumophila* i innych patogenów, co jest ważnym aspektem w browarach, gdyż do dziś wiele z nich jest wyposażone w urządzenia, m.in. kadzie, których głównym materiałem jest miedź.

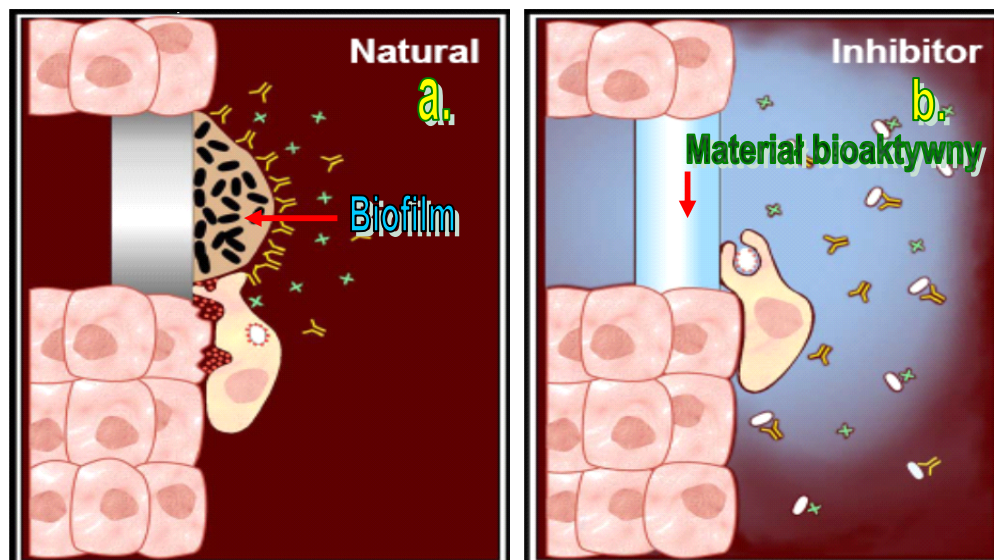
Regulacje prawne

Od szeregu lat, w Niemczech, gdzie analityka wody jest priorytetem, obecność bakterii *Legionella pneumophila*, zasiedlających instalacje wód technologicznych w przemyśle spożywczym, systemy doprowadzające wodę do picia (miejskie i prywatne), oraz obiekty użyteczności publicznej (np. baseny, termy, urządzenia do fizykoterapii w sanatoriach, itp.), powierzchnie urządzeń chłodniczych (głównie w przemyśle) są ściśle kontrolowane, tj. objęte obligatoryjnymi badaniami (wg określonych metod, podanych w ISO normach), w specjalnie akredytowanych laboratoriach, a dozwolona ilość bakterii regulują ustawy i wewnętrzne oraz europejskie zarządzenia (VDI, DVGW, TrinkwVO 2001).

Wykrycie ponadnormatywnej liczby bakterii *Legionella pneumophila* (szczególnie z grupy serologicznej 1, najbardziej agresywnej w swojej patogenności) pociąga za sobą obowiązek informowania odpowiednich urzędów, odpowiedzialnych za bezpieczeństwo zdrowia obywateli (m.in. landowe ministerstwa ds. konsumentów) przez zarządców obiektów użytku publicznego. Konsekwencją skażeń jest nakaz dezynfekcji sieci wodnej przez specjalne, certyfikowane służby techniczne. Tok postępowania ujęty jest w regulacjach ogólnofederalnych oraz w systemie HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) i należy do tzw. *Hygiene Monitoring* środowiska miejskiego (przemysłowego, publicznego) oraz naturalnego [Türetgen & Cotuk, 2007].

Perspektywy badań nad biofilmem i materiałami do instalacji

Pewnym praktycznym sposobem likwidacji biofilmu jest opracowanie specjalnych materiałów do budowy instalacji wodnych (lub do innych płynów technologicznych), np. powłok nano-polimerowych, które uniemożliwiają osadzanie się biofilmu na powierzchniach rur i urządzeń, pozostających w ciągłym kontakcie z wodą (Rys. 8).



Rys. 8. Diagram przedstawia model formowania się biofilmu na materiałach do budowy instalacji: a). Instalacja z materiału naturalnego, tradycyjnego, na którym osadza się biofilm trudny do usunięcia, b. instalacja z materiału bioaktywnego (np. z nano-polimerów), na którym osadzanie się biofilmu jest praktycznie niemożliwe, a bakterie są zwracane do planktonu, gdzie podlegają inhibicji, np. przez powszechnie stosowane środki odkażające, czy antybiotyki [Lewandowski i in., Montana State University – Bozeman, 1996, internet].

Dotychczas stosowaną metodą ograniczania rozwoju bakterii, a w związku z tym, formowanie się biofilmu na przemysłowych powierzchniach, było stosowanie materiałów o działaniu inhibującym rozwój mikroorganizmów (instalacje ze stali kwasoodpornej lub z dużą domieszką miedzi [Rogers in., 1994a i 1994b]).

Referencje

- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S., Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, 2000, Antimicrob. Agents Chemother., 44 (7):1818-1824.
- Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R., Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli*, 2000, J. Bacteriol., 182 (12):3593.
- Elasril M.O., Reid T., Hutchens S., Miller R.V., Response of a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm community to DNA-damaging chemical agents, 2000, FEMS Microbiol. Ecol., 33 (1):21-25.

Geesey G.G., Wigglesworth-Cooksey B., Cooksey K.E., Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review, 2000, *Biofouling*, 14(1-3):195-205.

John G.St., Steiman H.M., Periplasmic copper-zinc superoxidase dismutase of *Legionella pneumophila*: Role in stationary-phase survival, 1996, *J. of Bacteriology*, 178 (6):1578-1584.

Jørgensen T.M., Haagensen J., Sternberg C, Molin S., Quantification of biofilm structure from confocal imaging, 2003, Summary, Medical Vision Day at DTU, June 11th, 2003.

van der Kooij D., Harm R. Veenendaal H.R., Will J.H. Scheffer W.J.H., Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene, 2005, *Water Research*, 39 (13):2789-2798.

Lewandowski Z., Stoodley P., Biofilm Conceptual Illustration with Labels, 2006, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT, www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/BiofilmWithlabelsjpg.htm.

Little B.J., Lee S.J., Microbiologically Influenced Corrosion, 2007, Wiley-Interscience, A. John Wiley & Sons, Inc, Publication, 1-279.

MacDonald R., Brßzel V.S., Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes, 2000, *Wat. Res.* 34(9):2439.

Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S., Donlan R.M., Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system, 2001, *Microbiology*, 147:3121-3126.

Reeves M.W., Pine L., Hutner S.H., George J.R., Harrell W.K., Metal requirements of *Legionella pneumophila*, 1981, *J. of Clinical Microbiol.*, 13 (4):688-695.

Rogers J., Dowset A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W., Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, 1994a, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (5): 1585-1592.

Rogers J., Dowset A.B., Dennis P.J., Lee J.V. (1), Lee J.P. (2), Keevil C.W., Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems, 1994b, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6): 1842-1851.

Sadosky A.B., Wilson J.W., Steinman H.M., Shuman H.A., The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability, 1994, *J. of Bacteriology*, 176 (12):3790-3799.

Song J., Kinney K.A., Effect of vapor-phase bioreactor operation on biomass accumulation, distribution and activity: Linking biofilm properties to bioreactor performance, 2000, *Biotech. Bioeng.*, 68 (5):508-516.

Timke M., Wolking D., Ngoc Quynh Wang-Lieu, Altendorf K., Lipski A., Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence in situ FISH and isolation techniques, 2004a, *Appl. Microbiol. A. Biotechnol.*, 66 (1):100-107.

Timke M., Analysis of biofilm communities in breweries, 2004b, Dissertation, Universität Osnabrück.

Timke M., Ngoc Quynh Wang-Lieu, Altendorf K., Lipski A., Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16S rRNA gene clone libraries, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (10):6446-6452.

Türetgen I., Cotuk A., Monitoring of biofilm-associated *Legionella pneumophila* on different substrata in Model cooling tower system, 2007, Environmental Monitoring and Assessment, 125 (1-3):271-279.

Yaradou D.F., Raze D., Ginevra F., Ader F., et al., Zinc-dependent cytoadherence of *Legionella pneumophila* to human alveolar epithelial cells *in vitro*, 2007, Microbial Pathogenesis, 43 (5-6):234-242.

Streszczenie

Biofilm to kompleks zaglomerowanych mikroorganizmów, rosnących na stałych podłożach, pozostających w permanentnym kontakcie ze środowiskiem wodnym. Biofilm składa się z wielu gatunków bakterii (w tym *Legionella pneumophila*) oraz pierwotnych organizmów (*archaea*), żyjących w granicach matrycy wydzielanych pozakomórkowych substancji polimerycznych (EPS, *extracellular polymeric substances*), jak wielocukry, białka i kwasy nukleinowe. Matryca polimerowa chroni drobnoustroje i ułatwia komunikację pomiędzy nimi dzięki kanałom wodnym, które usprawniają dystrybucję substancji odżywczych i cząsteczek sygnałnych.

Biofilm charakteryzuje się heterogeniczną strukturalną, genetyczną różnorodnością, złożonymi interakcjami w populacji i pozakomórkową matrycą polimerycznych substancji. Kształtowanie się biofilmu jest przykładem dynamicznego rozwoju wielokomórkowego systemu mikroorganizmów, takich, jak *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Gluconobacter* sp., *Pectinatus* sp., *Pediococcus* sp. i *Mycobacterium* sp.