

Powstawanie biofilmu w warunkach przemysłowych.

Cz. 1. Mechanizm formowania biofilmu i jego struktura.

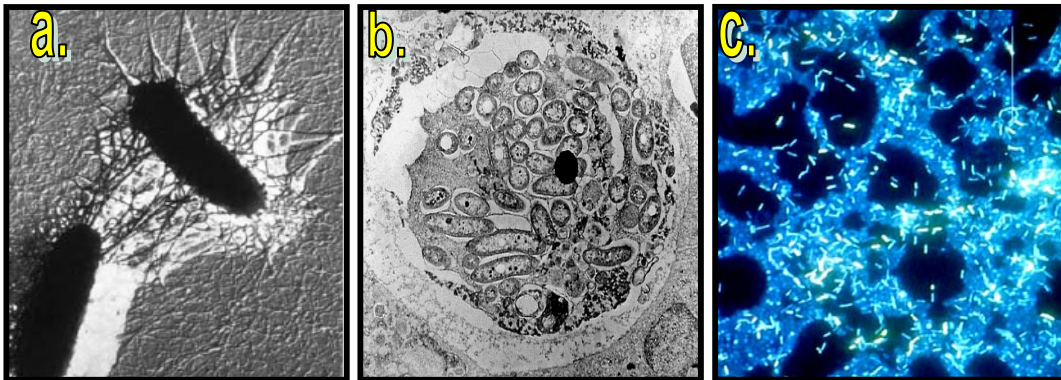
Dr. habil. Anna Sałek

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].

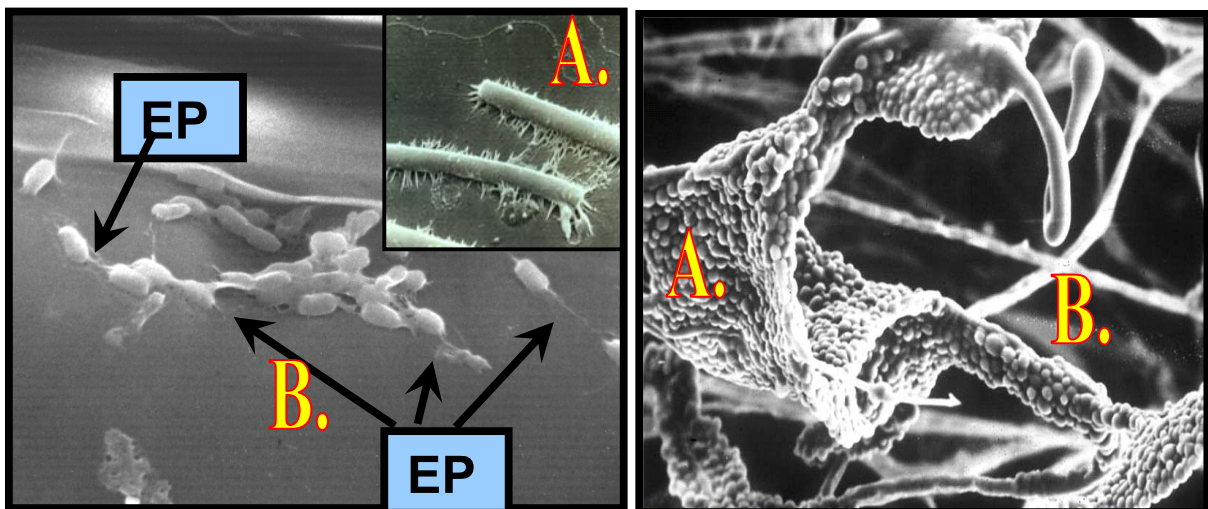
Zasadniczo biofilm może ukształtować się na dowolnej powierzchni, wystawionej na działanie bakterii i dostatecznej ilości wody. Raz „zakotwiczone” na podłożu stałym drobnoustroje formują biofilm i wywołują rozliczne szkodliwe reakcje w otaczającym środowisku [Rogers i in., 1994; Little & Lee, 2007]. 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).



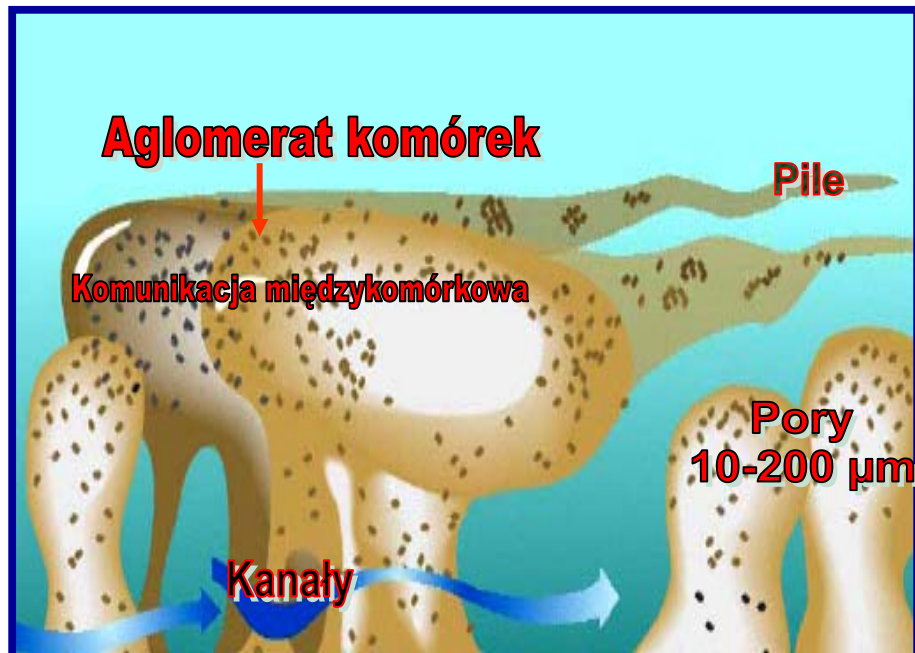
Rys. 2. Bakterie *Legionella pneumophila* (A), egzystujące w biofilmie, powiązane zewnątrzkomórkową substancją polimeryczną, EPS (B).

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).



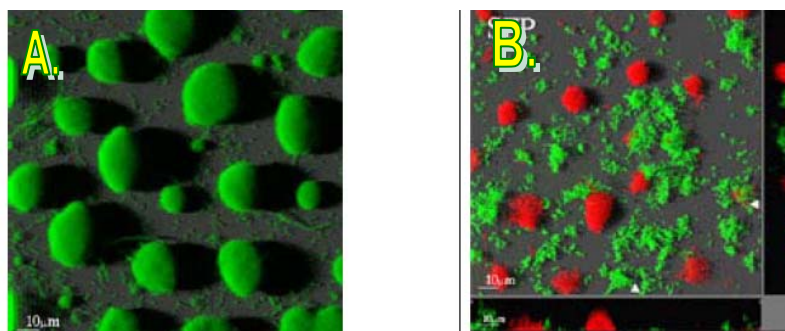
Rys. 3. Diagram przedstawia zróżnicowaną strukturę biofilmu: z pilami, porami i formami w postaci grzyba oraz sposób komunikacji między komórkami w strukturze matrycy EPS.

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].

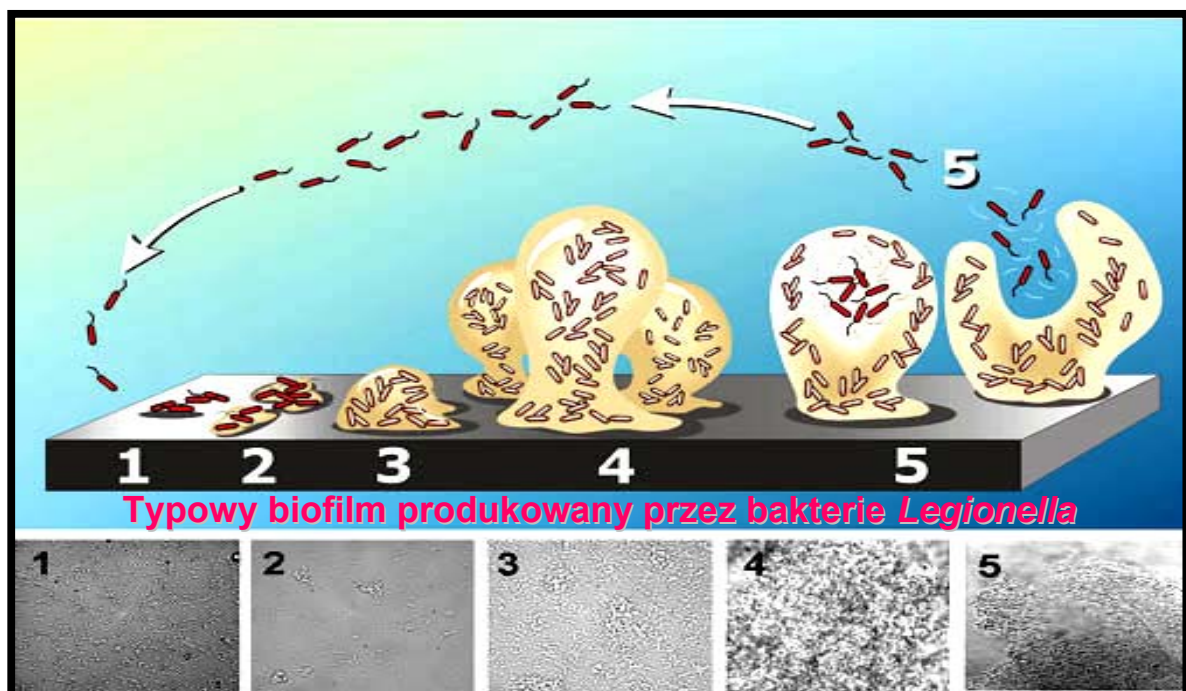
Jeśli przylegające bakterie nie zostaną natychmiast usunięte, mogą „zakotwiczyć” się na stałe przy pomocy elementów komórkowych umożliwiających adhezję, znanych jako pile. Ci

pierwsi „koloniści” ułatwiają aglomerację innym bakteriom dzięki różnym 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.

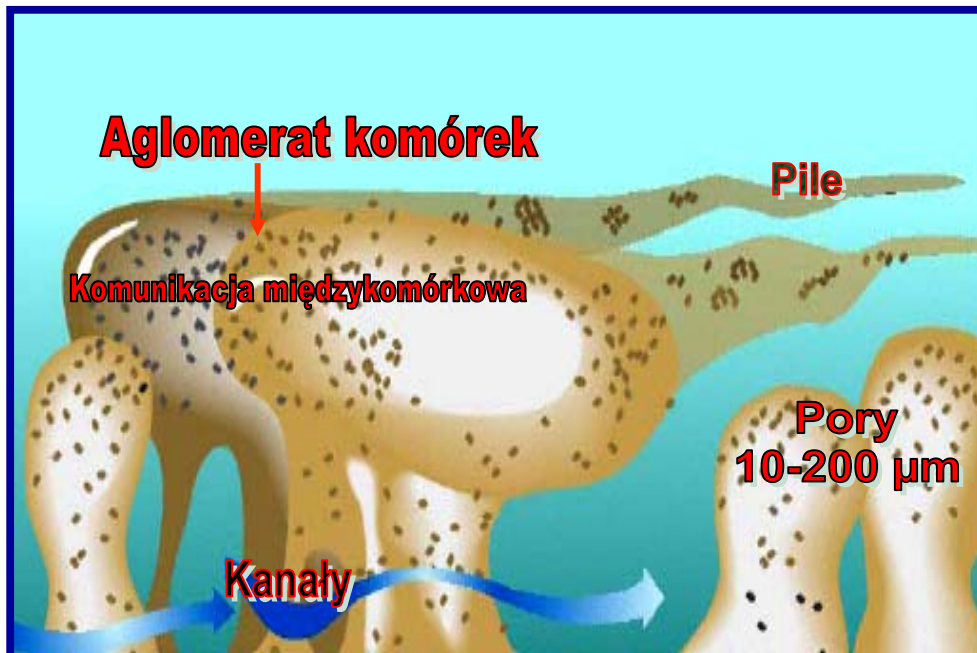


Rys. 5. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych, zanurzonych w wodzie. Biofilm w kształcie „grzyba” („mashroom-like”) [Lewandowski i in., Montana State University – Bozeman, 1996, internet].

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; Elsril 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 uśpiania, 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, rozprowadzające 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.

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.

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.

Rogers J., Dowsety 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, 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6): 1842-1851.

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.

Streszczenie

Biofilm to kompleks zglomerowanych 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.