



Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań

Katarzyna Czaczyk, Kamila Wojciechowska
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań

Formation of bacterial biofilms – the essence of the matter and mechanisms of interactions

Summary

Bacterial colonisation of surfaces and biofilm formation have important consequences in medicine (contamination of catheters, prostheses, and artificial organs) and in food industry (contamination of food product lines). A biofilm can be defined as a matrix enclosed bacteria populations' adherent to each other and/or to surfaces. The process of biofilm formation includes following steps: adhesion of cells, formation of microcolony and, finally, biofilm formation. Bacterial biofilm formation is influenced by a number of factors, such as: extracellular production of polymeric substances (mainly polysaccharides and proteins), hydrophobicity of cell wall, growth phase, environmental factors (pH, temperature, kind of media, ionic strength, polyvalent ions), surface roughness and presence of signalling compounds. Hygienic aspects of biofilm formation and adhesion of bacteria to eukariotic cells were also described in this paper.

Key words:

biofilm, adhesion, extracellular polymeric substances, hydrophobicity.

Adres do korespondencji

Katarzyna Czaczyk,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Wojska Polskiego 48,
Poznań.

1. Wstęp

Zdolność drobnoustrojów do adhezji do powierzchni może stanowić zagrożenie w wielu dziedzinach życia. W praktyce medycznej jest ona przyczyną zakażeń u pacjentów, u których w celach diagnostycznych lub terapeutycznych stosuje się przyrządy wykonane z materiałów syntetycznych (soczewki kontaktowe,

protezy stawowe i kostne, cewniki, zespolenia naczyniowe). Adhezja drobnoustrojów występujących w jamie ustnej do powierzchni zębów jest źródłem chorób zębów. W przemyśle spożywczym, mikrobiologiczne zanieczyszczenie powierzchni kontaktujących się z żywnością może być przyczyną skażenia żywności drobnoustrojami powodującymi jej zepsucie, a także chorobotwórczymi.

Adhezja drobnoustrojów do powierzchni ma także aspekty pozytywne. Bioreaktory z biofilmem są szeroko wykorzystywane w degradacji substancji organicznych, denitryfikacji ścieków, usuwaniu fosforu z miejskich i przemysłowych oczyszczalni ścieków oraz odgrywają znaczącą rolę w procesach wiązania metali z różnych środowisk (1-3). Zdolności adhezyjne mikroorganizmów do warstwy woskowej (kutikuli), pokrywającej połowę części roślin może także warunkować ich wykorzystanie w biologicznej ochronie płodów rolnych (4). Adhezja bakterii rizobiowych odgrywa podstawową rolę w ustaleniu symbiozy pomiędzy tymi bakteriami a roślinami motylkowymi (5).

Mikroorganizmy ulegające adhezji tworzą trwałe, cienkie warstewki nazywane błonami biologicznymi lub biofilmami. Biofilmy są obecnie definiowane jako złożone, wielokomórkowe struktury bakteryjne otoczone warstwą substancji organicznych i nieorganicznych, produkowanych przez te drobnoustroje, wykazujące adhezję do powierzchni biologicznych i abiotycznych (6,7). Zgodnie z tą definicją pod pojęciem biofilmu rozumie się również wszelkie agregaty utworzone przez komórki mikroorganizmów oraz populacje bakterii przylegających do ścianek por w substancjach o niejednorodnych powierzchniach. Biofilm bakteryjny może być utworzony przez komórki drobnoustrojów należących do jednego lub nawet kilkunastu gatunków. Biofilmy tworzą się najczęściej w wilgotnych, niesterylnych środowiskach. Ich powstawanie jest odpowiedzią bakterii na warunki środowiska, umożliwia ich przeżycie i rozwój (8). Udowodniono, że umiejętność ta jest prastarą strategią rozwoju drobnoustrojów, jednak dopiero ostatnio rozpoczęto dokładne jej badania. Analiza biofilmów za pomocą zwykłych mikroskopów pozwala dostrzec pewną liczbę bakterii, nie daje jednak możliwości jego obserwacji w głębszych warstwach. Dawniej uważano, że komórki znajdujące się wewnątrz biofilmu są martwe i tworzą przypadkowe skupiska (9). Pogląd ten zmienił się dopiero 11 lat temu, gdy zaczęto prowadzić badania z zastosowaniem laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego, który umożliwia uzyskiwanie obrazów poszczególnych warstw biofilmu i otrzymanie jego trójwymiarowego odzwierciedlenia. Na podstawie tych badań stwierdzono, że drobnoustroje tworzą w biofilmie małe kolonie, które zajmują łącznie mniej niż jedną trzecią jego ogólnej objętości. Pozostałą część stanowią substancje wydzielane przez te komórki na zewnątrz (tzw. macierz pozakomórkowa lub glikokaliks), które wchłaniają wodę, wychwytyują znajdujące się w niej substancje odżywcze i utrzymują biofilm w całości (9). Substancje wydzielane na zewnątrz przez komórki bakterii w biofilmach określa się mianem egzopolimerów (EPS, *extracellular polymeric substances*). Takie błony biologiczne składają się z bardzo dużej liczby mikrokolonii, oddzielonych od siebie siecią kanalików, przez które dostarczane są

składniki pokarmowe i usuwane produkty przemiany materii. System ten funkcjonuje jednak dobrze tylko na obrzeżach biofilmu. W głębszych jego warstwach skupiska bakterii połączone substancjami pozakomórkowymi utrudniają prawidłowe jego działanie. Powoduje to różnicowanie się komórek w biofilmie. Ponadto drobnoustroje wchodzące w skład błon biologicznych wytwarzają cząsteczki sygnałowe, przypominające feromony i hormony zwierzęce, pozwalające im na tworzenie kolonii o skomplikowanej strukturze i różnorodnych funkcjach. W ten sposób biofilm zaczyna być postrzegany jako prymitywny organizm wielokomórkowy (9,10).

2. Mechanizmy powstawania biofilmów

W procesie powstawania biofilmu bakteryjnego wyróżnia się kilka etapów:

- adhezję pojedynczych komórek do powierzchni,
- tworzenie mikrokolonii,
- różnicowanie się osiadłej populacji bakterii i utworzenie dojrzałej formy biofilmu (11-14).

Proces powstawania biofilmu rozpoczyna się w momencie, w którym komórka osiada na powierzchni. Zespół zdarzeń fizykochemicznych zachodzących w trakcie przyłączania się komórki bakteryjnej do powierzchni nazywa się adhezją. Obecnie uważa się, że zmiana w dostępności substratów metabolicznych w środowisku wzrostu częściowo indukuje powstanie sygnału dla komórki bakteryjnej (dotychczas nie zidentyfikowanego), który stymuluje przejście w osiadłą fazę wzrostu.

Adhezja mikroorganizmów do powierzchni stałych zachodzi w dwóch fazach (w zależności od odległości pomiędzy komórką a podłożem):

– faza początkowa (odległość pomiędzy komórką a podłożem wynosi ponad 150 nm): największą rolę odgrywają tutaj oddziaływania fizyczne – siły hydrodynamiczne, dyfuzja, grawitacja, siły termodynamiczne (ruchy Browna), siły van der Waalsa, elektrostatyczny ładunek powierzchni, a także ruchliwość samych komórek;

– faza zasadnicza (odległość pomiędzy komórką a podłożem wynosi ok. 3 nm): tutaj zasadnicze znaczenie dla utworzenia biofilmu odgrywają siły chemiczne – wiązania wodorowe, tworzenie par i kompleksów jonowych. Główną rolę odgrywają tutaj wiązania kowalencyjne typu węgiel-węgiel. Całkowita energia tych słabych interakcji potęgowana jest przez dużą liczbę potencjalnych miejsc nowych wiązań. Interakcje te uważa się za czynniki stabilizujące matrycę każdego biofilmu (15).

Tworzenie się mikrokolonii i różnicowanie osiadłej populacji bakterii związane jest głównie z indukcją lub supresją poszczególnych genów, ekspresją odpowiednich cech fenotypowych, w tym również syntezą i wydzielaniem EPS (9).

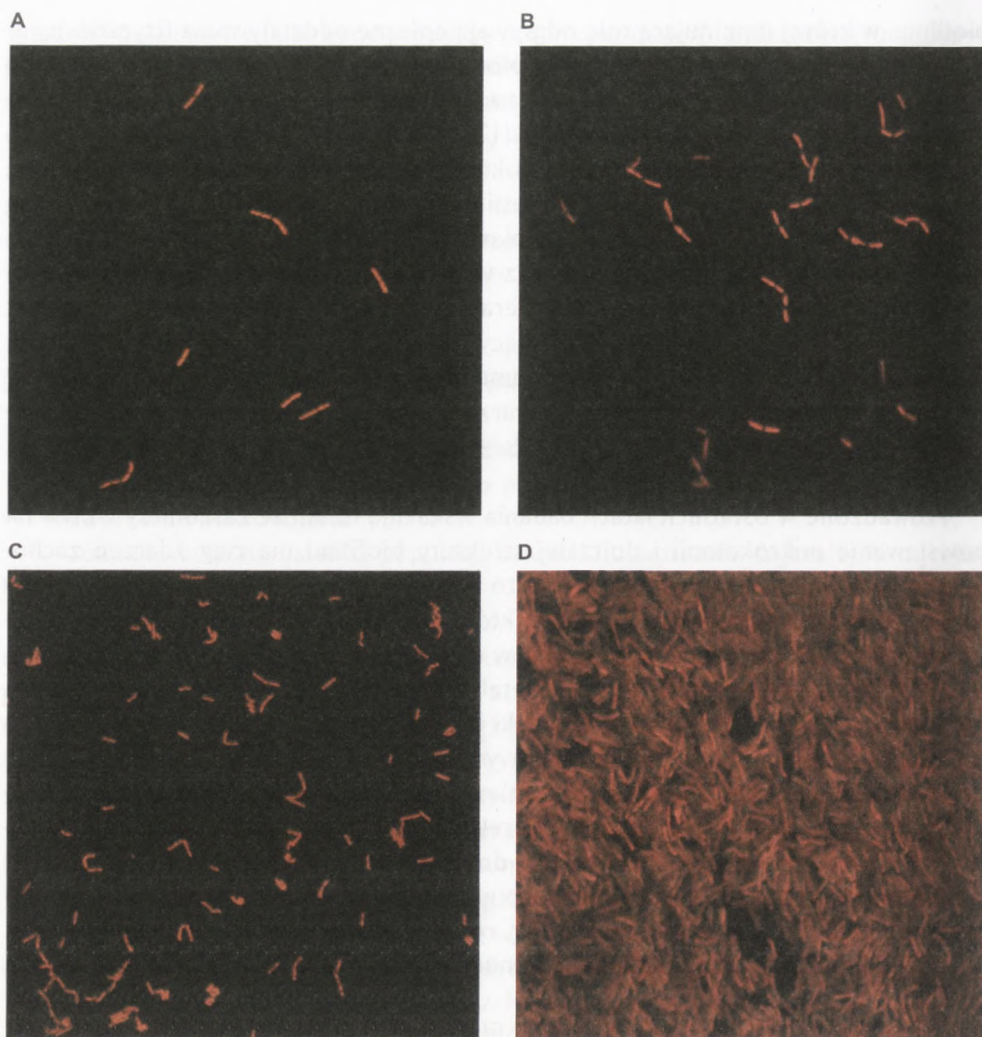
O różnicach w mechanizmach osadzania się bakterii na powierzchniach, w porównaniu z cząsteczkami materii nieożywionej, świadczy różna ich kinetyka. Wytworzenie się pierwszej warstwy zanieczyszczenia organicznego ułatwia osiadanie bakterii, chociaż nie jest warunkiem koniecznym (16). Pierwsza faza tworzenia się

biofilmu, w której dominującą rolę odgrywają opisane oddziaływania fizyczne, uważana jest za odwracalną. Tak powstałe błony mogą być usuwane za pomocą tradycyjnych środków myjących, a stosowane na tym etapie preparaty dezynfekcyjne skutecznie uszkadzają komórki bakteryjne (17).

Kolejną fazę tworzenia się biofilmu określa się jako nieodwracalną. Polega ona na równoczesnym namnażaniu się bakterii na danych powierzchniach (kolonizacja) i obfitym wytwarzaniu glikokaliksu. Szybkość tego etapu zależy głównie od rodzaju drobnoustrojów tworzących biofilm oraz warunków środowiska. Glikokaliks łatwo adsorbuje cząsteczki organiczne i mineralne, a jego trwałość spotęgowana jest przez obecność jonów wapnia w otaczającym medium, które powodują sieciowanie polisacharydów. Drobnoustroje, które same nie wytwarzają glikokaliksu, np. *Listeria* sp., mogą korzystać z polimerów wytwarzanych przez inne rodzaje drobnoustrojów, współbytujące w środowisku np. *Pseudomonas* sp., *Moraxella* sp., *Klebsiella* sp. (18).

Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują na to, że zasadniczy wpływ na powstawanie mikrokolonii i dojrzałej struktury biofilmu ma ciąg zdarzeń zachodzących na poziomie molekularnym. Są to zjawiska charakterystyczne dla wielu gatunków bakterii gramujemnych, dzięki którym poszczególne komórki danego gatunku bakterii odczuwają swoją gęstość w danej niszy ekologicznej oraz odpowiednio do niej regulują swoją aktywność metaboliczną (19). Komunikacja pomiędzy poszczególnymi komórkami zachodzi dzięki produkcji przez nie autoinduktorów (feromonów) o niskich masach cząsteczkowych, które nie tylko swobodnie dyfundują do środowiska zewnętrznego, lecz również na zasadzie dyfuzji biernej łatwo przenikają do cytoplazmy sąsiednich komórek bakteryjnych. Wiele substancji sygnałowych, których działanie podobne jest do feromonów, należy do grupy laktonów N-acyl homoseryny (20). Komórki danego gatunku, lub też innych gatunków, podatnych na działanie tego typu induktorów, reagują na odpowiednie stężenie tej substancji jednoczesną zmianą metabolizmu: represją lub aktywacją odpowiednich genów.

Poszczególne etapy tworzenia się biofilmu przedstawiono na fotografiach (A-D). W Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (AR, Poznań) prowadzone są badania nad czynnikami warunkującymi adhezję bakterii z rodzaju *Bacillus* do powierzchni użytkowanych w przemyśle spożywczym (stal nierdzewna i szkło). Prezentowane fotografie są wynikiem doświadczeń nad kinetyką tworzenia biofilmów przez ten rodzaj drobnoustrojów (obraz z mikroskopu fluorescencyjnego, 1000-krotne powiększenie).



Fot. Adhezja *Bacillus* sp. do powierzchni stali nierdzewnej: A - po 1h; B - po 2h; C - po 4h; D - po 24-48h (badania własne autorów).

3. Czynniki warunkujące tworzenie się biofilmów

Na podstawie prowadzonych w ostatnich latach badań uważa się, że największy wpływ na powstawanie specyficznych skupisk drobnoustrojów, jakimi są biofilmy, mają wydzielane przez komórkę na zewnątrz EPS. Obejmują one różne rodzaje makromolekuł, takie jak polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe czy fosfolipidy. Synteza do środowiska zewnętrznego substancji EPS przez organizmy prokariotyczne (bakterie) i eukariotyczne (algi, grzyby) wynika bezpośrednio z adaptacji do danych

warunków otoczenia. Związki te uważane są za podstawowe komponenty każdego biofilmu, ponieważ determinują jego biologiczne i fizykochemiczne cechy. Precyzyjna analiza ilościowa i jakościowa substancji wydzielanych poza komórkę jest bardzo trudna pod względem metodycznym. Żadna z obecnie stosowanych technik nie pozwala na wyekstrahowanie tylko składników zewnątrzkomórkowych. Izolacja substancji strukturalnych wnętrza komórki powoduje zafałszowanie wyników (21). Ogólne proporcje komponentów EPS w biofilmie są zróżnicowane. Zawartość materii organicznej waha się w granicach od 50 do 90%. Zróżnicowana ich koncentracja oraz specyficzny charakter tych substancji może stanowić ochronę takiej formy rozwoju drobnoustrojów. Obecnie uważa się, że główne związki EPS stanowią polisacharydy i białka (21,22).

Sacharydowe substancje polimerowe odgrywają istotną rolę w adhezji drobnoustrojów do powierzchni i są często określane mianem „polisacharydów adhezyjnych” (22,23). Egzopolisacharydy są słabo lub w ogóle nie związane z komórką drobnoustroju. Akumulowane na powierzchni komórki w postaci śluzu lub wydzielane do podłoża, tworzą struktury wyższego rzędu. Powstałe na drodze asocjacji lub polimeryzacji skupiska tych substancji wypełniają puste przestrzenie między komórkami mikroorganizmów w każdym biofilmie. Egzopolisacharydy mogą pośredniczyć zarówno w kohezji, jak i adhezji komórek i odgrywają główną rolę w utrzymaniu integralności biofilmu. W badaniach wskazuje się, że ich zawartość w biofilmach jest 4,7 razy większa niż białek (4). Większe napowietrzanie, ruch pożywki, siły odrywania powodują zwiększenie wydzielania egzopolisacharydów, co powoduje stabilizację struktury biofilmu przy danych warunkach. Największa produkcja tych związków jest obserwowana we wczesnych etapach tworzenia biofilmu, co wspomaga w początkowym etapie przyczepianie się komórek do powierzchni stałych (3). Niektórzy autorzy twierdzą, że odgrywają one istotną rolę w tworzeniu warstwy kondycjonującej (kontaktowej), stwarzając korzystniejsze warunki do adhezji (24). Zastosowanie substancji specyficznie wiążących polimery cukrowe może być skuteczną metodą badania ich wpływu na adhezję drobnoustrojów do powierzchni stałych. Do związków takich należą kationy metali, lecytyny oraz niektóre barwniki. Langille i wsp. (23) zastosowali sondy specyficznie wiążące kompleksy węglowodanów, które spowodowały inhibicję adhezji *Hyphomonas rosenbergii* do powierzchni hydrofilowych. Było to szczególnie widoczne w początkowych etapach tego procesu.

W dostępnej literaturze pojawiają się również sprzeczne informacje. Flint i wsp. (25) nie wykazali wpływu zewnętrznej warstwy polisacharydowej na adhezję termofilnych bakterii z rodzaju *Enterococcus* do powierzchni stali. Parkar i wsp. (26) badając adhezję termofilnych *Bacillus* sp. do powierzchni stali stwierdzili, że zastosowanie czynników usuwających zewnętrzną warstwę egzopolisacharydów (kwas tróchlorooctowy, lizozym, merkaptan sodu) zwiększyło liczbę komórek wegetatywnych ulegających adhezji (o 0,5-1,5 log₁₀ – w zależności od zastosowanego czynnika). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ilością zewnątrzkomórkowych polisacharydów a adhezją. Podobne obserwacje (zmniejszenie adhezji) poczynili inni autorzy,

badając adhezję mutantów wytwarzających i nie wytwarzających EPS (27). Usunięcie zewnętrznej warstwy polisacharydowej może być czynnikiem, który pozwala na lepsze interakcje pomiędzy innymi substancjami wydzielanymi przez komórkę na zewnątrz (np. białkami) a powierzchnią. Ponadto niektóre z polisacharydów nie są wymagane do powstania biofilmu, a jedynie do tworzenia jego trójwymiarowej struktury. Obserwowana jest liniowa zależność pomiędzy gęstością biofilmu a zawartością egzopolisacharydów w biofilmie (7).

Wiele polisacharydów, które uczestniczą w adhezji komórek są kwasowymi heteropolisacharydami, a szczególne znaczenie mają ich anionowe reszty. Nakata i wsp. (28) stwierdzili, że produkcja egzopolisacharydów może być stymulowana przez obecność w podłożu kwasów organicznych, ale z drugiej strony hamują one flokulację komórek bakteryjnych. Efekt ten może być równoważony przez obecność jonów wapnia, które na drodze kompetycji z resztami karboksylowymi polisacharydów i kwasów alifatycznych, likwidują ich anionowy charakter. Promocja syntezy polisacharydów przez kwasy organiczne może być wyjaśniona przez kataboliczną represję, natomiast inhibicja agregacji – inhibicją kompetycyjną przez kwasy organiczne. Synteza egzopolisacharydów jest stymulowana na podłożach ubogich w składniki odżywcze, ale mechanizmy tego zjawiska nie zostały wyjaśnione (29). Zwiększenie wydzielania polisacharydów na skutek dużych sił oddziałujących na biofilm skutkuje bardziej trwałym i gęstym biofilmem, ale są to raczej oddziaływania fizyczne niż biologiczne. Oddziaływania takie mogą powodować zmiany metaboliczne w komórkach i przekształcać się pośrednio w oddziaływania biologiczne. W badaniach nad rolą polisacharydów w procesie tworzenia biofilmu mikroorganizmem modelowym jest *Pseudomonas aeruginosa*, ze względu na dużą ilość polisacharydów produkowanych przez ten gatunek bakterii (30).

W przeprowadzonych badaniach nad rolą białek w procesach adhezji wykazano, że pełnią one dwie funkcje. W pierwszej fazie, białka zostają zakumulowane na powierzchni komórki, a następnie, gdy zostają uwolnione do roztworu, adsorbują się na powierzchni docelowej. Wzrost koncentracji białek w strefie międzyfazowej inicjuje pierwsze etapy adhezji. W kolejnych stadiach, gdy czas kontaktu między tymi powierzchniami wydłuża się, następuje sekrecja białek *in situ*, co prowadzi z jednej strony do nasilenia adhezji, a z drugiej zapewnia stabilne „zakotwiczenie” komórek na powierzchni docelowej (31,32).

Wpływ warstwy białkowej na zjawisko adhezji tłumaczy się modyfikacją oddziaływań typu van der Waalsa, elektrostatycznych i hydrofobowych. Powiązanie białek z powierzchnią determinują takie zjawiska, jak: redystrybucja naładowanych grup w strefie międzyfazowej, zmiana hydratacji powierzchni komórki, powierzchni docelowej oraz białka, a także doprowadzenie do zmian trzeciorzędowej struktury białek. Do tych oddziaływań należy jeszcze dodać specyficzne interakcje, łącznie z molekularnym rozpoznaniem, między adhezyną białkową a ligandem powierzchni docelowej (32).

W układach biologicznych białka powierzchni komórek drobnoustrojów odgrywają istotną rolę w adhezji do komórek gospodarza. Przyczepianie się komórek do

powierzchni biotycznych jest uzależnione od specyficznych oddziaływań pomiędzy receptorami gospodarza i ekspresją białek adhezyjnych (33). Tuomola i wsp. (34) wykazali, że adhezja probiotycznych bakterii mlekowych do mięśni jelitowych znacząco zmniejsza się po potraktowaniu komórek temperaturą 100°C, 121°C, pepsyną i trypsyną, co świadczy o tym, że struktury białkowe odgrywają istotną rolę w adhezji tej grupy drobnoustrojów do powierzchni biologicznych. Była to jednak cecha zależna od szczepu i w różnym stopniu u różnych szczepów notowana. Santiago i wsp. (35) wykazali, że sekrecja białka o masie cząsteczkowej 104 kDa przez *Listeria monocytogenes* jest związana z adhezją tej grupy drobnoustrojów do komórek ssaków. Chociaż wykazano wzrost ekspresji tego białka w różnych fazach wzrostu i w różnych temperaturach, nie wpłynęło to jednak na zwiększenie adhezji. Jest to spowodowane prawdopodobnie faktem, że już kilka molekuł tego białka jest wystarczające do zapoczątkowania adhezji tej grupy drobnoustrojów.

Białka odgrywają również istotną rolę w pośredniczeniu pomiędzy komórkami drobnoustrojów a powierzchniami nieożywionymi. Zagadnienia te stanowiły przedmiot badań wielu autorów. Dufrêne i wsp. (36) wykazali, że adhezja *Azospirillum brasiliense* do powierzchni szkła i polistyrenu jest uzależniona od stężenia białek na powierzchni komórek. Flint i wsp. (25) wykazali wpływ zewnętrznej warstwy białkowej na adhezję termofilnych streptokoków do powierzchni stali. Usunięcie zewnętrznej warstwy białkowej za pomocą trypsyny lub SDS spowodowało 100-krotną redukcję adhezji. Takie traktowanie komórek powoduje ich zabicie, jednak porównanie adhezji komórek inaktywowanych za pomocą temperatury lub promieniowania UV i komórek żywych nie wykazało różnic. Usunięcie warstwy zewnętrznej białek może wpływać także na zmianę ich właściwości powierzchniowych (np. hydrofobowości). Usunięcie zewnętrznej warstwy białkowej spowodowało 2-3 krotną redukcję grubości ściany komórkowej (mikroskopia transmisyjna), ale mogło to być spowodowane skurczeniem cytoplazmy po potraktowaniu komórek trypsyną i SDS. Podobne zależności obserwowali Parkar i wsp. (26), którzy usuwali zewnętrzną warstwę białkową *Bacillus* sp. za pomocą SDS lub trypsyny (obniżenie adhezji). Oosthuizen i wsp. (37) stosując metodę elektroforezy dwukierunkowej, wykazali specyficzną ekspresję białek w warunkach tworzenia się biofilmu. Wykazali oni, że komórki *Bacillus cereus*, które uległy adhezji do waty szklanej, syntetyzowały 10 nowych białek, z czego 4 były unikatowe dla biofilmów. Siedem białek nie było syntetyzowanych w ogóle w porównaniu do prób kontrolnych.

Na tworzenie się biofilmu mają wpływ także takie czynniki jak faza wzrostu bakterii, czynniki związane z rodzajem i charakterem powierzchni (naturą substratu), współzawodnictwo mikroorganizmów, hydrofilowość/hydrofobowość powierzchni komórki, ładunek powierzchni komórki oraz czynniki środowiskowe (pH, temperatura, rodzaj podłoża i jego siła jonowa, obecność kationów itp.) (12,26,38-41). Właściwości hydrofobowe drobnoustrojów są jednym z ważniejszych niespecyficznych czynników adhezji, które mają znaczenie w namnażaniu mikroorganizmów na powierzchniach stałych. Powierzchnia większości bakterii naładowana jest ujemnie,

a wiele struktur powierzchniowych, białek czy lipidów, podnosi jej hydrofobowość (31). Charakterystyczne dla danego gatunku drobnoustrojów właściwości powierzchniowe mają decydujące znaczenie dla kolonizacji określonej powierzchni. Silne właściwości hydrofobowe powierzchni wpływają na autoagregację komórek bakterii i oznaczają wyższy stopień adhezji do hydrofilnych powierzchni (42).

Tworzeniu się biofilmów na powierzchniach produkcyjnych sprzyjają zanieczyszczenia o zwiększonej proporcji białka do tłuszczu, neutralny odczyn środowiska, porowatość i nasiąkliwość powierzchni (chropowatość i ułożenie ziaren stali kwasoodpornej wpływa na ilość zatrzymanej cieczy, stwarzając korzystniejsze warunki do rozwoju drobnoustrojów), długi czas pozostawiania zanieczyszczeń na powierzchni, obecność nie związanych kationów dwuwartościowych – zwłaszcza wapnia oraz obecność bakterii wytwarzających duże ilości polisacharydów (30,35,39,43).

4. Aspekty higieniczne tworzenia się biofilmów

Biofilm wytworzony w wyniku sekrecji zewnątrzkomórkowej EPS i umocniony przez tę strukturę jest trudny do usunięcia. Stanowi on potencjalne zagrożenie mikrobiologiczne, gdyż po osiągnięciu pewnej krytycznej grubości dochodzi do samostannego odrywania się większych jego fragmentów od powierzchni. Praktycznie nie ma materiału, którego płaszczyzna nie mogłaby zostać pokryta warstwą biofilmu. Składniki EPS efektywnie utrzymują komórki mikroorganizmów na powierzchni wymienników ciepła, systemów przewodów doprowadzających i odprowadzających media, urządzeń wykorzystywanych w medycynie. Matryca biofilmu cechuje się dużą stabilnością mechaniczną. Tworzenie się, struktura i aktywność metaboliczna biofilmów jest ściśle związana z siłami deadhezji. Bardziej zwięzły, ścisły i stabilny biofilm jest formowany przy relatywnie dużych siłach deadhezji. Siły te odgrywają znaczącą rolę w budowie biofilmu, transferze masy i produkcji EPS oraz wpływają na metaboliczne i genetyczne jego właściwości. Molekularne i genetyczne mechanizmy odpowiedzialne za wpływ tych sił na komórkę nie są w pełni wyjaśnione. W sensie inżynierskim można tymi siłami manipulować i traktować je jako parametr kontrolny w produkcji bardziej trwałego i zwarteo biofilmu (np. dla oczyszczalni ścieków) (3).

Komórki bakteryjne, stanowiące część biofilmu, są bardziej odporne na działanie substancji toksycznych (środki dezynfekujące, antybiotyki, surfaktanty) niż te pozostające w zawiesinie (44). Jest to zwykle wyjaśniane wolniejszą dyfuzją biocydów przez matrycę biofilmu, który utrudnia ich dotarcie do głębszych warstw. Ponadto komórki pozostające w zawiesinie są narażone na kontakt z substancjami toksycznymi ze wszystkich stron, komórki w biofilmie tylko z jednej strony. Komórki pozostające głębiej w biofilmie mają mniej składników odżywczych i tlenu, zmieniają swoją fizjologię, zmniejszając tempo wzrostu i przechodząc w stan zbliżony do anabiozy. Wykazują wtedy zmniejszoną wrażliwość na działanie substancji toksycznych.

Innym czynnikiem, który może wpływać na zwiększoną oporność mikroorganizmów w biofilmie jest zewnątrzkomórkowa otoczka bakterii. W większości przypadków jest ona zbudowana z polisacharydów, chociaż niektóre gatunki *Bacillus* sp. mają otoczkę polipeptydową. Rola otoczki polega przede wszystkim na ochronie komórki przed wysuszeniem i fagocytozą, ale bierze ona również udział w procesie adhezji. Materiały otoczki mogą także ułatwiać adsorbcję czynników toksycznych, ale uniemożliwiają ich przenikanie do cytoplazmy. W ten sposób biofilm z materiałami otoczki, które stanowią ich integralną część, chroni komórki przed wpływem środków dezynfekujących, stanowiąc jednocześnie czynnik inaktywujący ich działanie (6,16).

Substancje EPS również skutecznie zabezpieczają drobnoustroje tworzące biofilm przed wpływem detergentów i środków dezynfekcyjnych. Aby zminimalizować skutki tworzenia się biofilmów konieczne jest szybkie usuwanie zanieczyszczeń z powierzchni, stosowanie preparatów zawierających związki silnie chelatujące wapń, w miarę potrzeb wydłużanie czasu mycia i dezynfekcji, optymalizacja proporcji czasu działania środka myjącego do czasu działania środka dezynfekcyjnego i dobór odpowiednich środków dezynfekujących. Najbardziej skuteczne w stosunku do mikroorganizmów tworzących biofilm są kwaśne czwartorzędowe zasady amoniowe i pirydyniowe, dwutlenek chloru i kwas nadoctowy (45). Mycie powierzchni detergentami alkalicznymi i kwasem azotowym powoduje nadanie jej hydrofilowych właściwości, podczas gdy etanol czy aceton zmieniają jej charakter na hydrofobowy. Może to mieć istotny wpływ na tworzenie biofilmów na tych powierzchniach.

W poszukiwaniu nowoczesnych technik badania skuteczności mycia i dezynfekcji poszukuje się niedestrukcyjnych metod, pozwalających na badanie adhezji w sposób ciągle *in situ*. Jednym z takich sposobów mogą być systemy reporterów genetycznych, które pozwalają na badanie zachowania komórek bakteryjnych tak długo, jak reagują one metabolicznie. Geny reporterowe kodują białka, które posiadają unikatową aktywność enzymatyczną lub są łatwe do odróżnienia z mieszaniny innych białek komórkowych. Są one stosowane do oznaczenia transkrypcji genu z którym mogą się połączyć. Goulsbra i wsp. (46) wykazali przydatność takiej techniki (gen reporterowy *fis*) do badania ekspresji reporterów dla *Escherichia coli* przyczepionych do podłoża i określenia wpływu procedur mycia z zastosowaniem polimerów i kationowych biocydów na adhezję tej grupy drobnoustrojów i ich wzrost.

Aby efektywnie przeciwdziałać negatywnym skutkom tworzenia się biofilmów dla higieny produkcji konieczne jest poznanie mechanizmów ich powstawania, dynamiki nawarstwiania i czynników, które wpływają na ich stabilność. Dla rozwiązania tego problemu konieczne jest opracowanie nowych powierzchni, które będą wpływały na początkową adsorbpcję cząsteczek, a przez to na zmniejszenie adhezji. Konieczne jest także zastosowanie antymikrobiologicznych barier adhezji i nowoczesnych metod usuwania biofilmów bakteryjnych.

5. Adhezja drobnoustrojów do komórek makroorganizmu

Adhezja do komórek makroorganizmu nabiera istotnego znaczenia w przypadku drobnoustrojów atakujących tkanki i błony śluzowe obmywane płynami ustrojowymi. Aby móc się utrzymać na ich powierzchni bakterie muszą przytwierdzić się do komórek gospodarza. Mikroorganizmy mogą przyczepiać się do powierzchni komórek eukariotycznych przy udziale wiązań elektrostatycznych i hydrofobowych, ale na ich adhezję mają wpływ również takie czynniki, jak typ komórek gospodarza, rodzaj receptorów komórkowych wiązanych przez ligandy bakteryjne oraz wzajemne oddziaływania między ligandem a receptorem komórki eukariotycznej (31). Istotną rolę odgrywa także autoagregacja komórek oraz wytwarzanie przez nie substancji zewnątrzkomórkowych (47). Wszystkie specyficzne struktury umiejscowione na powierzchni komórek mikroorganizmów, biorące udział w procesie adhezji noszą nazwę adhezyn. Mogą one mieć określoną postać morfologiczną (np. fimbrie), są elementami ściany komórkowej lub są wydzielane przez komórkę na zewnątrz. Największą rolę w adhezji patogennych bakterii gramujemnych do komórek nabłonkowych przypisuje się obecności fimbrii na ich powierzchni, ale muszą istnieć również inne mechanizmy odpowiedzialne za ten proces, gdyż bakterie gramodatnie oraz niektóre gramujemne, będące przyczyną wielu zakażeń nie posiadają typowych fimbrii (48). Z prowadzonych w ostatnich latach badań wynika, że wiele patogenów wykazuje zdolność przylegania do zewnątrzkomórkowych białek komórek eukariotycznych. Białka, z którymi wiążą się drobnoustroje, stanowią najczęściej mieszaninę kolagenów, proteoglikanów, kwasu hialuronowego, elastyny oraz innych. Tworzą one zewnątrzkomórkową macierz do której przyczepiają się bakterie. Szczególne znaczenie odgrywa też grupa białek, określanych mianem „adhezyjnych”, z grupy glikoprotein, takich jak: fibrynoektyna, witronektyna, laminina czy trombospondyna (19,31,32). Coraz więcej uwagi poświęca się udziałowi tych białek w procesach zapalnych, autoimmunizacji, syntezie cytokin oraz bezpośrednich interakcjach komórek immunokompetentnych w przebiegu swoistej odpowiedzi immunologicznej. Prowadzone w tym kierunku badania mogą przyczynić się do znalezienia skutecznych metod zapobiegania zakażeniom bakteryjnym. Uzdolnienia adhezyjne drobnoustrojów mogą również wpływać na stopień ich inwazyjności oraz zdolności do wywoływania zakażenia (42).

Adhezja drobnoustrojów do powierzchni komórek makroorganizmu może mieć również pozytywne znaczenie. Probiotyczne właściwości bakterii mlekowych są często tłumaczone ich zdolnościami do adhezji do mięśni jelitowych. Jest to wyjaśniane współzawodnictwem w adhezji pomiędzy tą grupą drobnoustrojów a bakteriami chorobotwórczymi, przy ograniczonej liczbie receptorów bakteryjnych na powierzchni komórek jelitowych, lub immunomodulacją komórek gospodarza (34,49-51).

6. Konkluzje

Tworzenie biofilmów bakteryjnych na powierzchniach jest procesem bardzo złożonym. Czynniki, które mogą mieć wpływ na przebieg tego procesu to: wydzielanie przez komórkę mikroorganizmu substancji zewnątrzkomórkowych, głównie polisacharydów i białek, hydrofilowość/hydrofobowość, ładunek powierzchni komórki, faza wzrostu bakterii, rodzaj i charakter podłoża (natura substratu), czynniki środowiskowe (pH, temperatura, rodzaj podłoża, siły jonowe, obecność kationów), obecność adhezyn i współzawodnictwo mikroorganizmów. Tworzenie biofilmów jest procesem, który zależy częściowo od właściwości podłoża, a częściowo od właściwości powierzchni komórek, które go tworzą. Rozwijające się techniki inżynierii genetycznej pozwalają wyraźniej zarysować problem tworzenia biofilmów i przybliżają jego biologię molekularną. Komórki, które ulegają adhezji zmieniają swój metabolizm i ekspresję materiału genetycznego. Transformacje komórek mogą być powiązane z warunkami hodowli i mogą odgrywać znaczącą rolę w szeregu informacji genetycznych w biofilmie.

Ponadto w dostępnej literaturze pojawia się wiele rozbieżności odnośnie do czynników warunkujących tworzenie się biofilmów. Dotyczą one głównie faktu, że doświadczenia prowadzone są w różnych warunkach eksperymentalnych, stosowane są odmienne metody oceny stopnia adhezji drobnoustrojów, powierzchnie są czasami niedokładnie charakteryzowane zarówno pod względem aktualnego chemizmu grup funkcyjnych, jak i gęstości. W konsekwencji trudno jest porównywać badania różnych autorów i nie ma prostej zależności między nimi. Lepsze zrozumienie mechanizmów tworzenia biofilmu i czynników odpowiedzialnych za ten proces może zapobiegać temu zjawisku, ułatwi usuwanie biofilmów, a także pozwoli na efektywne wykorzystanie tego procesu.

Publikacja w ramach projektu badawczego KBN nr 3 P06T 010 24.

Literatura

1. Meier-Schneiders M., Busch C., Diekert G., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 667-673.
2. Składkowska A., Matlakowska R., (1998), *Bitechnol. Lett.*, 20(3), 229-233.
3. Liu Y., Tay J. H., (2001), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 111-117.
4. Ahimou F., Jacques P., Deleu M., (2000), *Enzym. Microb. Technol.*, 27, 749-754.
5. Janczarek M., Mazur A., Wielbo A., Król J., Skorupska A., (1999), *Post. Mikrobiol.*, 38(3), 217-241.
6. Bower C. K., McGuire J., Daeschel M. A., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 152-157.
7. Prignet-Combaret C., Prensier G., Thi T. T. L., Vidal O., Lejeune P., Dorel C., (2000), *Environ. Microbiol.*, 2(4), 450-464.
8. Fiorina J. C., Weber M., Block J. C., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 89, 494-500.
9. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., (1999), *Science*, 284, 1318-1322.
10. Kaprelyants A. S., Kell D. B., (1996), *Trends Microbiol.*, 4(6), 237-242.
11. Costerton J. W., Marrie T. J., Cheng K. J., (1985), *Bacterial adhesion: mechanism and physiological significance*, Ed. D. C. Savage, M. Fletcher, 14-15, Plenum Press, New York.

12. Cunliffe D., Smart C. A., Alexander C., Vulfson E. N., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11), 4995-5002.
13. Miron J., Ben-Ghedalia D., Morrison M., (2001), *J. Dairy Sci.*, 84, 1294-1309.
14. Uberos J., Augustin C., Liébana J., Molina A., Muñoz-Hoyos A., (2001), *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 303-306.
15. Zottola E. A., (1994), *Food Technol.*, 48(7), 107-114.
16. Gómez-Suárez C., Busscher H. J., van der Mei H. C., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), 2531-2537.
17. Sommer P., Martin-Rouas C., Mettler E., (1999), *Food Microbiol.*, 16, 503-515.
18. Krysinski E. P., Brown L. J., Marchisello T. J., (1992), *J. Food Protect.*, 55, 246-251.
19. Krajewska-Pietrasik D., Różalska B., Różalski A., (1993), *Post. Mikrobiol.*, 4, 291-304.
20. Martinelli D., Bachofen R., Brandl H., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 278-283.
21. Fleming H. C., Wingender J., (2001), *Water Sci. Technol.*, 43(6), 9-16.
22. Neu T. R., (1996), *Microbiol. Rev.*, 60, 151-166.
23. Langille S. E., Geesey G. G., Weiner R. M., (2000), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 81-85.
24. Oliviera D. R., (1992), *Biofilms – science and technology*, Eds. L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, B. Capdeville, 45-58, Kluwer Academic Press, Dordrecht.
25. Flint S. H., Brooks J. D., Bremer P. J., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 83, 508-511.
26. Parkar S. G., Flint S. H., Palmer J. S., Brooks J. D., (2001), *J. Appl. Microbiol.*, 90, 901-908.
27. Allison D. A., Sutherland I. W., (1987), *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1319-1327.
28. Nakata K., Kobayashi T., Takiguchi Y., Yamaguchi T., (2000), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(10), 2040-2046.
29. Mueller R. F., (1996), *Wat. Res.*, 30(11), 2681-2690.
30. Fleming H. C., Wingender J., (2001), *Water Sci. Technol.*, 43(6), 1-8.
31. Krajewska-Pietrasik D., Różalska B., Różalski A., (1993), *Post. Mikrobiol.*, 4, 269-290.
32. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P., (2002), *Trends Microbiol.*, 10(5), 238-245.
33. Jenkinson H. F., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 121, 133-140.
34. Tuomola E. M., Ouwehand A. C., Salminen S. J., (2000), *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 75-81.
35. Santiago N. I., Zipf A., Bhunia A. K., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(6), 2765-2769.
36. Duffrène Y. F., Vermeiren H., Vanderleyden J., Rouxhet P. G., (1996), *Microbiol.*, 142, 855-865.
37. Oosthuizen M. C., Steyn B., Lindsay D., Brozel V. S., von Holy A., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 194(1), 47-51.
38. Husmark U., Rönner U., (1992), *Biofoul.*, 5, 335-344.
39. Lindsay D., Brözel V. S., Mostert J. F., von Holy A., (2000), *Int. J. Food Microbiol.*, 54, 46-62.
40. Mikucka A., Gospodarek E., Ulatowska B., (2000), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 52, 9-15.
41. Dąbrowski W., Iwański R., Czeszejko K., Mędrała D., (2001), *Electr. J. Pol. Agr. Univer., Food Sci. Techn.*, 4 (2), 1-11.
42. Dziejzina D., Kołodyński J., Jankowski S., (2000), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 52, 1-8.
43. Rijnaarts H. H. M., Norde W., Bouwer E. J., Lyklema J., Zehnder A., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2877-2883.
44. Frank J. F., Koffi R. A., (1990), *J. Food Prot.*, 53, 550-554.
45. Kitzman P., (1998), *Gosp. Mięsna*, 4, 44-47.
46. Goulsbra A. M., Edwards C., Gallagher M. P., (2001), *J. Appl. Microbiol.*, 91, 104-109.
47. Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona D., (2000), *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 438-442.
48. Kunicki-Goldfinger W. J. H., (2001), *Życie bakterii*, 87-88, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
49. Blum S., Reniero R., Schiffrin E. J., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Ouwehand A. C., Salminen S., von Wright A., Saarela M., Saxelin M., Collins K., Morelli L., (1999), *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 405-410.
50. Ouwehand A. C., Niemi P., Salminen S. J., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 177, 35-38.
51. Lee Y. K., Lim C. Y., Teng W. L., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9), 3692-3697.