

Biofilm – systemowe życie zbiorowe mikroorganizmów

Spółeczne życie bakterii



URSZULA ZIELENKIEWICZ

Instytut Biochemii i Biofizyki, Warszawa

Polska Akademia Nauk

ulazet@ibb.waw.pl

Dr Urszula Zielenkiewicz kieruje zespołem zajmującym się identyfikacją i charakterystyką mikroorganizmów tworzących biofilmy

Biofilm jest złożoną dynamiczną strukturą, w której pojedyncze komórki mikroorganizmów funkcjonują jak wielokomórkowy żyjący społecznie organizm

Wbrew utartym opiniom w naturalnym środowisku mikroorganizmy rzadko spotykane są jako wolno żyjące pojedyncze komórki. Najczęściej tworzą różnego rodzaju skupiska przytwierdzone do podłoża, powleczone cienką warstwą śluzu. Skupiska te nie są bynajmniej luźnym zbiorem komórek, lecz uporządkowanym wysoko zorganizowanym „systemem” powiązanych wzajemnie i wspólnie działających osobników, określanym mianem biofilmu lub błony biologicznej. Sąsiadujące ze sobą w skupiskach mikroorganizmy wytwarzają wokół siebie wspólną otoczkę, tzw. macierz, do której wydzielają różne substancje. Głównymi składnikami macierzy są związki polimeryczne zwane EPS (najczęściej polisacharydy) i woda. Procentowy udział wody w macierzy biofilmów dochodzi nawet do 97%. Zdolność polimerów macierzy do cyklicznego gromadzenia i oddawania wody nadaje jej cechy hydrożelu o wyjątkowych właściwościach wiskoelastycznych. Dzięki temu biofilmy niezwykle trudno jest odebrać od podłoża. Dodatkowo hydrożelowa macierz skutecznie chroni mikroorganizmy biofilmu przed wysuszeniem.

Macierz jest nie tylko spoiwem biofilmu, jest również, a może nawet przede wszystkim systemem komunikacji wzajemnej tworzących go komórek i ośrodkiem zapewniającym stałe warunki. Poprzez swoją obfitość i właś-

ciwości fizyczne zapewnia komórkom ochronę przed zmiennymi warunkami fizycznymi otoczenia, promieniowaniem UV, wahaniami temperatury i pH oraz wysoką koncentracją szkodliwych substancji.

Na granicy faz

Biofilmy tworzą się na każdej powierzchni, która stanowi granicę faz, niezależnie od jej rodzaju: na powierzchniach stałych otoczonych powietrzem lub zanurzonych w wodzie, na wierzchniej warstwie płynów lub na styku dwóch różnych płynów. Przy czym nie ma znaczenia, z jakich substancji zbudowana jest ta powierzchnia. Dlatego biofilmy spotykane są wszędzie, zarówno w środowiskach naturalnych, jak i tych przekształconych przez człowieka. Można je zaobserwować na

Nieczynna kopalnia złota i arsenu w Złotym Stoku na Dolnym Śląsku jest dziś obiektem turystycznym. Żyjące tam mikroorganizmy tworzą nietypowy biofilm. Na zdjęciu skała pokryta biofilmem



Lukasz Drewniak

powierzchni skał, w osadach dennych zbiorników wodnych, na kamieniach strumieni, na ścianach budowli, na powierzchni roślin i w glebach. W zlewie i na kafelkach łazienki, a także na powierzchni produktów spożywczych w lodówce. Rozwijają się na każdej głębokości oceanów i w każdej temperaturze. Równie często na arktycznych skałach, co w gorących źródłach. Zasiedlają także ciała zwierząt i człowieka.

Chociaż występują w bardzo różnorodnych środowiskach, zazwyczaj przybierają podobne formy: w ośrodkach dynamicznych (szybko płynących) tworzą płaskie powierzchnie zbudowane z długich filamentów (tzw. maty), w ośrodkach spokojnych zaś galaretowate, nieregularne kształty przypominające śluzowate grzyby.

Ilość w jakość

Rozwój biofilmu jest procesem złożonym, zależnym zarówno od właściwości organizmów, jak i od czynników środowiska, w którym powstaje. Zawsze jednak zapoczątkowany jest przez przytwierdzenie się pojedynczych komórek do podłoża i zmianę ich właściwości. Unieruchomione komórki tracą wici, zmniejszają tempo wzrostu, wydzielają substancje polimeryczne i zmieniają regulację niektórych genów. Przy odpowiednio dużej liczbie komórek następuje zjawisko wyczuwania liczebności, znane jako *quorum sensing*. Zgromadzone bakterie wydzielają specyficzne substancje sygnałowe (m.in. acylowe pochodne laktonów lub krótkie peptydy), które wędrują w macierzy i oddziałują na dalej położone komórki.

W strukturze biofilmu można wyróżnić wolne przestrzenie, kanały, rusztowania i miejsca o większej gęstości macierzy. Komórki organizmów mogą być w niej rozproszone lub skupione w mikrokoloniami. Różnicowaniu przestrzennemu towarzyszy zróżnicowanie fizjologiczne. Stężenie różnych związków chemicznych w biofilmie zmienia się w zależności od oddalenia od powierzchni oraz od rodzaju mikropopulacji organizmów w danym miejscu. Pomiędzy komórkami współistniejącymi w jednym biofilmie zachodzą zarówno zjawiska konkurencji o składniki pokarmowe czy korzystniejsze umiejscowienie, jak i kooperacji w przetwarzaniu składników środowiska.



Karolina Tomczyk-Zak

Biofilm jest skomplikowaną, dynamiczną strukturą, którą można uznać za wysublimowaną strategię przetrwania, w której pojedyncze komórki funkcjonują jak wielokomórkowy, żyjący społecznie makroorganizm. Jest to układ bardzo zmienny, a jednocześnie trwały. W niesprzyjających warunkach organizmy w biofilmie, chronione macierzą, pozostają nieaktywne i tym samym niewrażliwe na większość środków chemicznych.

Biofilmy mogą być jedno-, dwu- lub wielogatunkowe. Najczęściej tworzone są przez bakterie i archeony, ale spotyka się również biofilmy grzybów i glonów (słynne letnie zakwity wód).

Biofilmy, zwłaszcza jednogatunkowe, można hodować sztucznie, zapewniając mikroorganizmom powierzchnię, wilgotność oraz odpowiednie, niezbyt bogate podłoże.

Nie lada wyzwanie

Wyjątkową formą biofilmu jest tzw. osad granulany, czyli granule (inaczej kłaczki; ang. *flocks*), mikroskopijne ziarenka bardzo ciasno upakowane w obłe struktury, w których ściśle przylegające do siebie komórki drobnoustrojów powleczone są cienką warstwą macierzy. W odróżnieniu od innych biofilmów granule nie są przytwierdzone do podłoża, lecz utrzymują się w większych

Biofilm to zorganizowana trójwymiarowa struktura stworzona przez mikroorganizmy zanurzone we wspólnie budowanej macierzy

Biofilm – systemowe życie zbiorowe mikroorganizmów

skupieniach siłami wzajemnego przylegania. Bliskość fizyczna komórek różnych gatunków bakterii i archeonów w granulach (odpowiednio dawców i biorców elektronów) umożliwia najwyższą znaną w przyrodzie wydajność procesów energetycznych. Granule powstają w środowiskach płynnych, lecz spokojnych, najczęściej beztlenowych. Są szeroko wykorzystywane w procesach oczyszczania biologicznego.

W sprzyjających warunkach wzrost biofilmu może być niezwykle obfity. Często groźny. Tak dzieje się chociażby wtedy, gdy biofilm rozrasta się wewnątrz rur, powodując ich zapychanie, czy na zewnątrz konstrukcji metalowych, doprowadzając do korozji. Naprawdę groźne stają się, zasiedlając ciało człowieka. Spotykane na powierzchni zębów jako płytka nazębna, zasiedlające rany, cewniki, implanty stanowią trudne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Właściwości fizyczne macierzy i niska aktywność metaboliczna komórek w biofilmach powodują, że są one odporne na stosowane antybiotyki, mimo że pojedyncze komórki patogena są na nie wrażliwe.

W środowisku naturalnym jednogatunkowe biofilmy spotyka się rzadko, zazwyczaj w warunkach ekstremalnych, np. na powierzchniach kwaśnych wód kopalnianych

(często o pH poniżej 2) *Acidithiobacillus* tworzy grube maty. Również drobnoustroje patogene często rozwijają się w postaci biofilmów monogatunkowych. Znanym przykładem są infekcje *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Burkholderia cepacia*.

W jedności siła

Badanie wielogatunkowych biofilmów stanowi ogromne wyzwanie. Wzajemne zależności pomiędzy osobnikami wytworzone w długim czasie nie pozwalają na proste przeniesienie ich relacji do warunków laboratoryjnych. Przyjmuje się, że z bogatych środowisk daje się hodować nie więcej niż 1% gatunków. Bardzo często przyczyną tego są właśnie ściśle powiązania metaboliczne pomiędzy różnymi gatunkami bytującymi we wspólnej strukturze biofilmu.

W nieczynnej kopalni złota i arsenu Złoty Stok panują stałe warunki środowiska: temperatura ok. 10°C, prawie 100-procentowa wilgotność i ciemność. Istotną cechą kopalni jest niska zawartość związków organicznych oraz obecność wielu toksycznych związków (kadm, ołów, radon, siarkowodór, arsenowodór), a szczególnie bardzo wysokiego stężenia jonów arsenu (6,99 mg/l). W takich warunkach życie pojedynczych organizmów jest bardzo utrudnione.

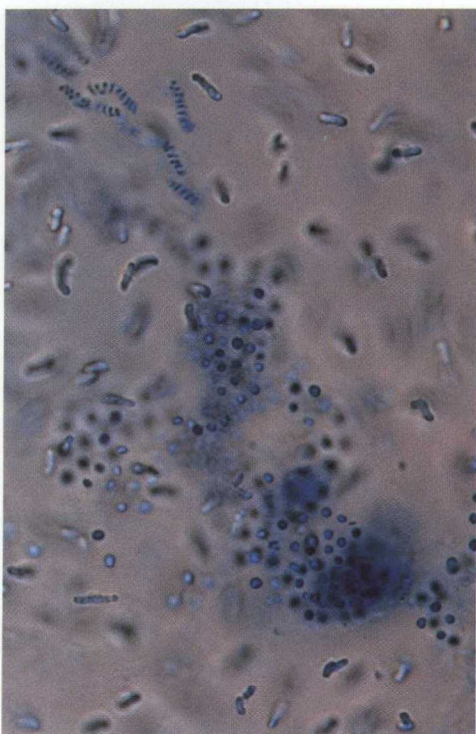
W najdalszej części korytarza „Gertruda”, zalanej wodą i niedostępnej dla turystów, rozwija się na ścianach kopalni nietypowy biofilm. W gąbczastej, śluzowatej strukturze rozlokowane są skupiska różnych morfologicznie bakterii. Macierz tego biofilmu zawiera dużą ilość krzemionki i śladowe ilości związków organicznych. Taki skład macierzy sugeruje obecność w biofilmie mikroorganizmów chemolitotroficznych zdolnych do przeprowadzania reakcji metabolicznych, w których energia potrzebna do życia zdobywana jest ze związków nieorganicznych.

Mikroby w jaskini

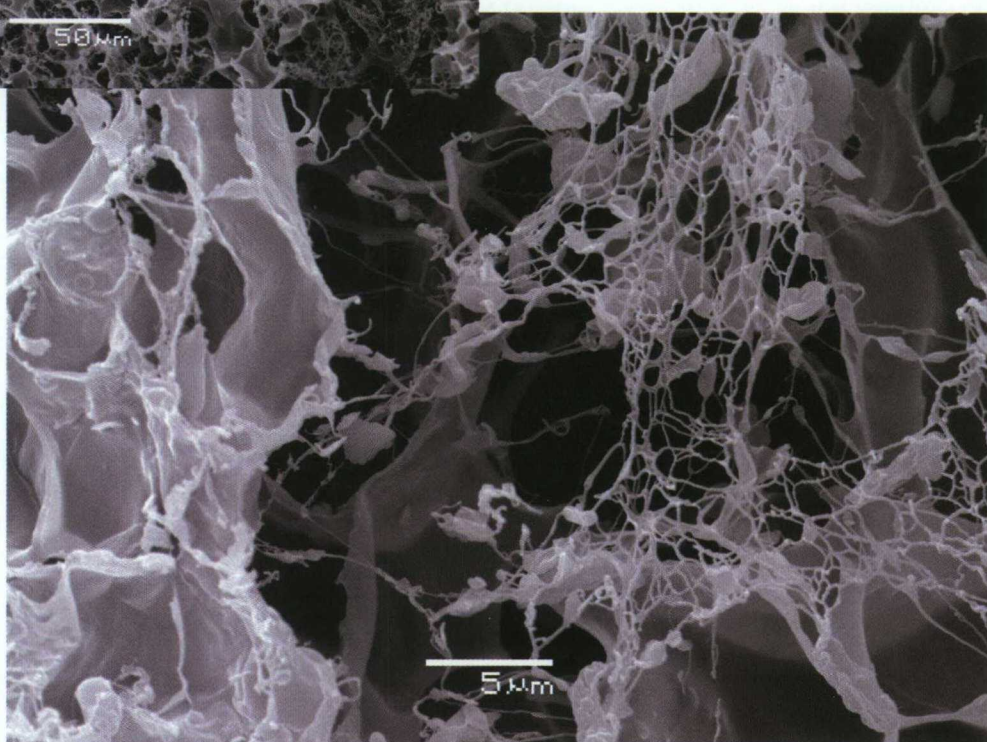
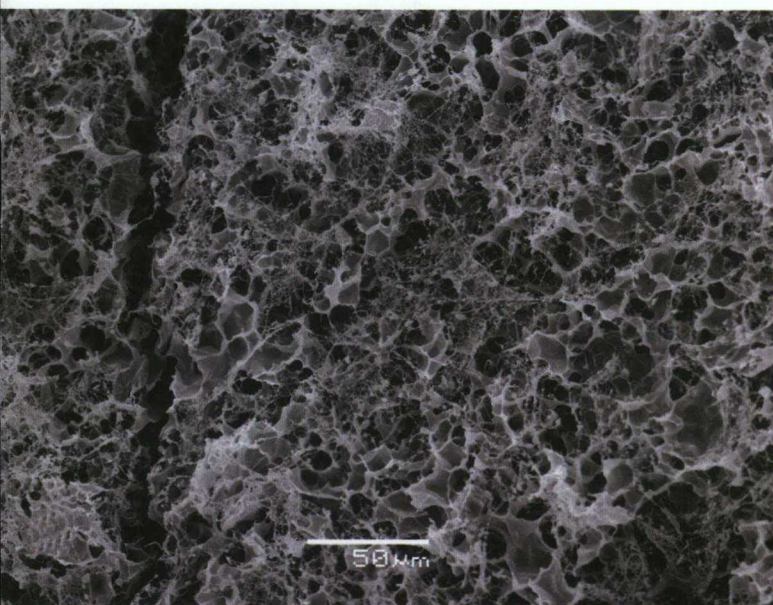
Prowadzimy pogłębioną analizę różnorodności mikroorganizmów tworzących ten biofilm, stosując zarówno metody hodowlane jak i metagenomiczne. Metagenomika, stanowiąca część biologii systemów, dostarcza informacji o organizmach poprzez analizę wszystkich genomów danego środowiska.

Wyhodowaliśmy z biofilmu ponad 70 różnych gatunków bakterii. Aż 45 spośród nich

Komórki mikroorganizmów mogą być w macierzy rozproszone lub skupione w mikrokoloniach. Zdjęcie pochodzi z mikroskopu optycznego



Małgorzata Górecka



W strukturze biofilmu można wyróżnić wolne przestrzenie, rusztowania i miejsca o większej gęstości macierzy. Głównymi składnikami macierzy są związki polimeryczne zwane EPS (najczęściej polisacharydy) i woda. Zdjęcia biofilmu w mikroskopie skaningowym

Karolina Tomczyk-Zak

film na ścianach kopalni powstał pierwotnie w wyniku przytwierdzenia do powierzchni skał bakterii przyniesionych z okolicznej ziemi przez przesączającą się wodę. Do tych organizmów, zdolnych do odżywiania chemolitoautotroficznego, dołączyły następnie pozostałe gatunki, w tym przyniesione przez ludzi pracujących w kopalni.

Sprawdziliśmy, również metagenomicznie, że w biofilmie są bakterie posiadające funkcjonalne geny metabolizmu arsenu: reduktazy arsenianowej i oksydazy arseninowej.

We współpracy z Pracownią Analizy Skażeń Uniwersytetu Warszawskiego pokazaliśmy, że bakterie biofilmu wydzielają dużo

to promieniowce (*Actinobacteria*), bakterie znane z dużego potencjału metabolicznego, liczne w środowiskach ubogich i glebach.

Równolegle przeprowadziliśmy analizę sekwencji genów 16S rRNA (marker taksonomiczny) otrzymanych z całkowitego DNA biofilmu poprzez pyrosekwencjonowanie za pomocą nowoczesnej technologii 454 Roche'a. Dzięki temu podejściu mogliśmy wykazać, że w biofilmie bytuje co najmniej 500 różnych gatunków *Bacteria* i ok. 20 gatunków *Archea*. Dominującą grupą mikroorganizmów biofilmu stanowią *Rhizobiales* z klasy α -*Proteobacteria*, typowe bakterie środowisk ziemnych. Wydaje się więc, że bio-

sideroforów (związków chelatujących), co może świadczyć o ich udziale w procesach uwalniania jonów żelaza i arsenu z nierozpuszczalnych związków w skale.

Wytworzenie biofilmu umożliwiło wspólny wzrost wielu różnym organizmom na skale kopalni Złoty Stok, a ich współdziałanie zapewne przyczynia się do zwiększenia uwalniania jonów arsenu do środowiska. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Hall-Stoodley I., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95-108.