OCHRONA ŚRODOWISKA

Vol. 33 2011 Nr 4

Barbara Kołwzan

Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania

Drobnoustroje w środowisku naturalnym rzadko występują w postaci pojedynczych rozproszonych komórek, czyli tzw. planktonu [1], a raczej wykazują tendencję do adsorpcji na granicy faz ciało stałe–ciecz, ciecz–gaz czy ciecz–ciecz. Najczęściej tworzą one skupiska zwane biofilmem (lub błoną biologiczną) przylegające do powierzchni stałych lub powierzchni komórek innych organizmów [2, 3]. Biofilm jest wielokomórkowym tworem złożonym z drobnoustrojów jednego lub wielu gatunków czy rodzajów [4]. Zdolność do tworzenia biofilmu mają zarówno mikroorganizmy autotroficzne, jak i heterotroficzne, wśród których znajdują się saprofity, a także drobnoustroje chorobotwórcze. W jego skład wchodzić mogą – obok bakterii – także grzyby, glony czy pierwotniaki [5]. Kolonizacja różnych powierzchni przez mikroorganizmy możliwa jest dzięki ich adhezyjnym właściwościom, a strukturę powstałego biofilmu stabilizują substancje polimeryczne wydzielane pozakomórkowo, tzw. EPS (extracellular polymeric substances). Biofilm tworzą złożone, wielokomórkowe struktury, w których liczne komórki drobnoustrojów otoczone są warstwą śluzu [6]. Komórki mikroorganizmów wchodzących w skład biofilmu charakteryzują się specjalizacją do pełnienia różnych funkcji i wykazują odmienne cechy niż komórki żyjące w postaci wolnej. Konstrukcja tych skupisk chroni mikroorganizmy przed niekorzystnym wpływem czynników zewnętrznych oraz stwarza możliwości łatwiejszej dostępności substancji odżywczych. Dlatego też biofilm może funkcjonować w warunkach, w których przetrwanie pojedynczych komórek byłoby trudne, a w wielu przypadkach nawet niemożliwe [7].

Rozwój biofilmu na różnego rodzaju powierzchniach stałych może przynosić zarówno korzyści, jak i skutki negatywne. W środowisku biofilm występuje powszechnie i bierze aktywny udział w wielu ważnych procesach mikrobiologicznych zachodzących w przyrodzie. Należy do nich m.in. samooczyszczanie wód powierzchniowych, podziemnych czy gruntu, gdzie bogactwo gatunkowe organizmów wchodzących w skład biofilmu zapewnia prawidłowy przebieg poszczególnych procesów rozkładu [8]. Zjawisko to zostało wykorzystywane w wielu technologiach stosowanych w inżynierii środowiska. Oczyszczanie ścieków na złożach biologicznych odbywa się w zbiornikach wypełnionych porowatym materiałem ziarnistym. Na materiale stałym, z którego zbudowane jest złoże powstaje biofilm (błona biologiczna), stanowiący śluzowatą warstewkę złożoną z mikroorganizmów biorących udział w procesie degradacji zanieczyszczeń [9]. Złoża filtracyjne wypełnione odpowiednim nośnikiem, zasiedlone przez mikroorganizmy służą także do oczyszczania gazów [10]. Mikroorganizmy zasiedlają w ten sposób także złoża piasku w procesach filtracji powolnej i pospiesznej, złoża węgla aktywnego czy złoża fluidalne do oczyszczania wody [11]. W technologiach oczyszczania gruntów wykorzystywane są mikroorganizmy zasiedlające matrycę glebową [12]. Wytworzona przez nie warstewka biologiczna wykazuje niezwykle dużą aktywność degradacyjną oraz małą wrażliwość na działanie czynników zewnętrznych [13].

Z drugiej jednak strony niekorzystne zmiany związane z powstawaniem biofilmu są powodem poważnych strat w gospodarce oraz rozprzestrzeniania się zakażeń trudnych do leczenia [14]. Zasiedlanie przez biofilm sieci wodociągowej stanowi zagrożenie sanitarne dla konsumentów wody, wzmaga korozję mikrobiologiczną oraz może być przyczyną strat hydraulicznych spowodowanych zwiększeniem szorstkości powierzchni przewodów wodociągowych, co skutkuje zmniejszeniem przepływności rurociągów [15].

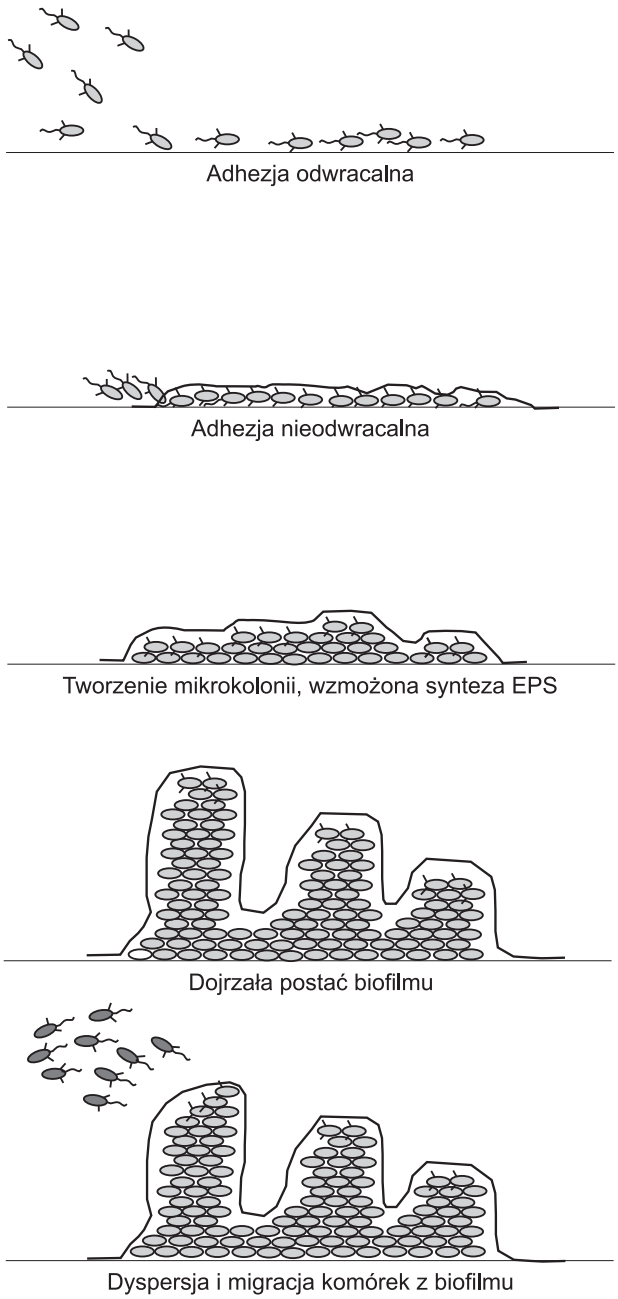
Mikroorganizmy wchodzące w skład biofilmu charakteryzuje wzrost inwazyjności oraz zdolność do wywoływania groźnych zakażeń, zwłaszcza w warunkach szpitalnych [16]. Okazało się także, że są one bardziej oporne na działanie temperatury oraz środków przeciwbakteryjnych, takich jak środki dezynfekcyjne, surfaktanty i antybiotyki [17]. Kolonizacja cewników, implantów chirurgicznych czy też tworzenie płytki nazębnej przez biofilm jest powodem groźnych schorzeń [18]. W przemyśle spożywczym zasiedlanie przez biofilm produktów żywnościowych oraz powierzchni kontaktujących się z żywnością może być przyczyną psucia się żywności oraz zakażenia konsumentów [19].

Różnorodność zjawisk związanych z powstawaniem biofilmu sprawia, że poznanie jego struktury, mechanizmu tworzenia oraz funkcjonowania jest niezbędne do poprawy skuteczności prowadzonych przy jego udziale procesów technologicznych, a także do opracowania skutecznych metod zwalczania biofilmu, hamowania jego rozwoju i zapobiegania temu zjawisku.

Dr hab. B. Kołwzan: Politechnika Wrocławska, Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii i Ekologii, Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50–370 Wrocław, *barbara.kolwzan@pwr.wroc.pl*

Powstawanie biofilmu

Powstawanie biofilmu jest procesem wielostopniowym, uwarunkowanym z jednej strony właściwościami tworzących go mikroorganizmów, a z drugiej strony budową i właściwościami kolonizowanych materiałów, względnie kolonizowanego gospodarza, jakim może być inny żywy organizm. Szczególną rolę w procesie adhezji odgrywają wytwarzane przez mikroorganizmy tworzące biofilm polimery zewnątrzkomórkowe, lipopolisacharydy i białka ich ściany komórkowej, a także struktury zewnątrzkomórkowe, takie jak fimbrie i rzęski. Kolonizację ułatwia także struktura powierzchni oraz wszelkie jej uszkodzenia i chropowatości [20]. Mechanizm powstawania biofilmu nie jest jeszcze dobrze poznany. W procesie jego wytwarzania można zaobserwować różne fazy – adhezję odwracalną mikroorganizmów, adhezję nieodwracalną, dojrzewanie biofilmu oraz jego dyspersję (rys. 1).



Rys. 1. Schemat procesu tworzenia dojrzałej postaci biofilmu
Fig. 1. Formation of a mature biofilm

Adhezja komórek mikroorganizmów jest procesem wieloetapowym [21]. Początkowo przemieszczanie się komórek w kierunku zasiedlanej powierzchni regulują oddziaływania fizyczne związane z działaniem sił hydrodynamicznych, grawitacyjnych, termodynamicznych (ruchy Browna) oraz sił van der Waalsa. Siły te odgrywają najistotniejszą rolę w adhezji odwracalnej, gdzie odległość między komórkami a zasiedlaną powierzchnią jest stosunkowo duża, a względnie szerokie spektrum ich działania pozwala na zbliżenie się komórki do powierzchni. Adhezja odwracalna nie zapewnia trwałości biofilmu, może być on łatwo usunięty za pomocą środków fizycznych i chemicznych [22].

Dużą rolę w procesie kolonizacji powierzchni przez bakterie odgrywają ich struktury zewnętrzne, takie jak fimbrie czy rzęski. Fimbrie to wyrostki cytoplazmatyczne o budowie rurkowatej i długości do kilku mikrometrów. Komórki mające fimbrie (zaopatrzone w grupy hydrofobowe) łatwiej pokonują siły odpychania między ujemnie naładowaną ściany komórkową bakterii a często również ujemnie naładowaną zasiedlaną powierzchnią [23]. Ruchliwość bakterii wynikająca natomiast z posiadania przez nie rzęsek sprawia, że łatwiej docierają one do powierzchni, a następnie po jej osiągnięciu wędrują w poszukiwaniu innych drobnoustrojów, dążąc do wytworzenia nowej mikrokoloni lub powiększenia już istniejącej [24]. Drugi etap adhezji zachodzi w chwili, gdy komórki zbliżają się do powierzchni na odległość mniejszą niż 1,5 nm [25]. Ma ona charakter nieodwracalny, dochodzi bowiem do wytworzenia specyficznych wiązań między zasiedlaną powierzchnią a występującymi na powierzchni komórek adhezynami, takimi jak flagelle, fimbrie, pile oraz polimery polisacharydowe [26]. Dochodzi wówczas do specyficznych chemicznych interakcji prowadzących do powstania wiązań wodorowych, tworzenia par i kompleksów (wiązania kowalencyjne typu węgiel-węgiel). Podstawową rolę w tym procesie odgrywają polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) tworzące tzw. glikokaliks [27, 28], dzięki któremu możliwa jest adhezja komórek mikroorganizmów nawet do takich powierzchni, jak tworzywa sztuczne czy metale [29, 30]. Początkowo podłoże pokrywa się pojedynczą warstwą komórek drobnoustrojów. Obserwowana jest synteza i wzmożone wydzielanie biopolimerów zewnątrzkomórkowych, a powstające otoczone śluzem skupisko stymuluje adhezję innych mikroorganizmów [31].

Adhezja nieodwracalna umożliwia wytworzenie mikrokolonii i dojrzewanie biofilmu. Następuje namnażanie drobnoustrojów i ich stopniowe różnicowanie. W ich komórkach dochodzi do aktywacji lub hamowania ekspresji niektórych genów [32]. Zmiany aktywności poszczególnych genów prowadzą do dojrzewania biofilmu i wystąpienia odpowiednich cech fenotypowych, zależnie od warunków i potrzeb tworzącej się społeczności komórek. U bakterii unieruchomionych w matrycy biofilmu dochodzi do zahamowania produkcji flagelliny – białka, z którego zbudowane są rzęski, co prowadzi do zanikania tych niepotrzebnych już bakteriom struktur [33]. Bakterie bytujące we wnętrzu biofilmu narażone są na ograniczenie dostępu tlenu, z tego też względu zmienia się ich metabolizm – wzrasta aktywność beztlenowych szlaków metabolicznych (desulfurikacji, denitryfikacji i fermentacji), zahamowaniu ulega też synteza niektórych enzymów (np. proteaz, fosfolipazy C) oraz toksyn [34]. Dzięki tym zjawiskom komórki bakterii wchodzące w skład biofilmu wykazują odmienne cechy niż komórki żyjące w postaci wolnej [33]. Dochodzi

Tabela 1. Podstawowe funkcje składników EPS w biofilmie [26]
Table 1. Basic functions of EPS components in the biofilm [26]

Funkcja	Składnik EPS
Adhezja komórek planktonowych do powierzchni biotycznych i abiotycznych	polisacharydy, białka, DNA, cząsteczki amfifilowe
Agregacja komórek bakteryjnych, wzrost gęstości i wzajemne rozpoznawanie	polisacharydy, białka, DNA
Kohezja (przyleganie) biofilmu, budowa jego formy i struktury, utrzymanie mechanicznej stabilności i komunikacji międzykomórkowej	neutralne i obdarzone ładunkiem polisacharydy, białka, DNA
Retencja wody pozwalająca na utrzymanie uwodnionego mikrośrodowiska zapewniającego komórkom tolerancję na wysuszenie	hydrofilowe polisacharydy i prawdopodobnie białka
Tworzenie bariery ochronnej umożliwiającej tolerancję na działanie czynników przeciwmikrobiologicznych, uniknięcie nieswoistej i swoistej odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza oraz ataku drapieżników	polisacharydy i białka
Sorpcja związków organicznych umożliwiająca akumulację substancji odżywczych oraz sorpcję ksenobiotyków	obdarzone ładunkiem lub hydrofobowe polisacharydy i białka
Sorpcja związków nieorganicznych stymulująca powstawanie żelu polisacharydowego, wymianę jonową oraz akumulajcę toksycznych metali	obdarzone ładunkiem polisacharydy i białka zawierające podstawniki (fosforany i siarczany)
Aktywność enzymatyczna umożliwiająca rozkład egzogennych makrocząsteczek (w tym ksenobiotyków) do monomerów stanowiących substrat pokarmowy dla mikroorganizmów, a także degradację struktury EPS prowadzącą do uwolnienia komórek z biofilmu; enzymy stanowią także czynnik wpływajacy na wirulencję biofilmu w procesie infekcyjnym	białka
Źródło związków C, N i P wykorzystywanych przez mikroorganizmy zawarte w biofilmie w charakterze substratu pokarmowego	potencjalnie wszystkie składniki EPS
Wymiana materiału genetycznego poprzez horyzontalny transfer genów między komórkami w biofilmie	DNA

do licznych zmian genetycznych, nadających komórkom specyficzne właściwości przekazywane następnie komórkom sąsiadującym lub potomnym. Dojrzała forma biofilmu otoczona jest grubą warstwą glikokaliksu, do którego adsorbowane są substancje mineralne, związki organiczne i komórki innych drobnoustrojów.

W ostatnim etapie rozwoju biofilm osiąga tzw. krytyczną grubość i stopniowo przestaje utrzymywać istniejącą formę. Następuje wówczas migracja komórek z peryferyjnych części dojrzałego biofilmu do otoczenia [35]. Prawdopodobnie dochodzi do degradacji polimerowej matrycy, aktywacji aparatów ruchowych i zmian fizjologicznych w komórkach, umożliwiających ich egzystencję poza biofilmem. Przypuszcza się także, że odłączanie komórek od biofilmu i jego dyspersja jest celową separacją wynikającą z reakcji na niesprzyjające zmiany środowiskowe. Przyczyną tego zjawiska może być wyczerpanie składników pokarmowych lub problemy ich przepływu w obrębie biofilmu. W ten sposób biofilm przystosowuje się do zmian środowiskowych, a oderwane komórki rozpoczynają proces kolonizacji nowych powierzchni.

Struktura i funkcjonowanie biofilmu

Biofilm może być jedno- lub wielowarstwowy, wytworzony przez jeden gatunek lub wiele gatunków mikroorganizmów. Architektura biofilmu uzależniona jest od wielu czynników, takich jak warunki hydrodynamiczne, zawartość substancji odżywczych, ruchliwość bakterii, komunikacja międzykomórkowa, zawartość egzopolisacharydów czy białek. Dojrzała postać biofilmu składa się z wielu mikrokolonii tworzących specyficzne zgrupowania [26]. Wyróżniamy trzy podstawowe typy budowy błon biologicznych tworzących biofilm – płaski (dwuwymiarowy), kolumnowy oraz tzw. model grzyba. W środowisku o dużej sile ścinającej (strumień wody) biofilm przybiera postać rozciągniętych pasków, ułożonych w cienkiej warstwie wzdłuż powierzchni przylegania, natomiast w środowisku o wolnym przepływie wody biofilm tworzy masę w postaci np. tzw. grzyba [36].

Komórki mikroorganizmów w biofilmie połączone są ze sobą pozakomórkową substancją polimeryczną (EPS), której składniki pełnią ważne role w tworzeniu i funkcjonowaniu biofilmu (tab. 1). W skład EPS wchodzą polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe, surfaktanty, lipidy oraz woda, natomiast największą frakcję stanowią polisacharydy. Większość z nich to długie cząsteczki liniowe lub rozgałęzione, o masie cząsteczkowej rzędu 10^6 Da [26]. Skład zewnątrzkomórkowych polimerów biofilmu jest bardzo zróżnicowany i zależy od gatunku bakterii. Ilość wytwarzanego polimeru zależy natomiast od składu ilościowego i jakościowego dostarczanych substancji odżywczych. Stymulację jego produkcji wywołuje obniżona zawartość azotu, potasu i fosforanów, przy równoczesnym nadmiarze łatwoprzyswajalnego źródła węgla. Ponadto na jego produkcję ma wpływ pH podłoża, temperatura inkubacji oraz faza wzrostu mikroorganizmów [27]. Stwierdzono, że u *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis* największa produkcja EPS obserwowana jest w później fazie wzrostu logarytmicznego oraz we wczesnej fazie wzrostu stacjonarnego. Skład EPS znacznie różni się u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. U bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*) podstawowymi składnikami EPS są kwas alginowy (β-1,4-D-mannuronowy) oraz C-5 epimer kwasu guluronowego, natomiast niektóre patogenne bakterie Gram-dodatnie podczas dojrzewania biofilmu wytwarzają adhezynę PIA (polysaccharide intracellular adhesin), która jest cząsteczką liniową asocjującą do powierzchni [26].

Zaopatrzenie mikroorganizmów tworzących biofilm w substancje odżywcze i tlen oraz wydalanie produktów przemiany materii możliwe jest dzięki sieci kanałów, w jaki jest on wyposażony. Uważa się, że za utrzymanie ich funkcjonalności odpowiedzialne są ramnolipidy [37]. Kanały oddzielają od siebie poszczególne mikrokolonie. System ten zapewnia właściwą egzystencję jedynie komórkom znajdującym się w powierzchniowej warstwie mikrokolonii. Komórki te są metabolicznie aktywne, a ich rozwój przyczynia się do powiększenia grubości tej struktury. Pozostałe komórki znajdujące się w części wewnętrznej rosną wolniej lub pozostają w stanie anabiozy (uśpienia). Możliwa jest jednak ich aktywacja w sytuacji, gdy zostaną usunięte komórki warstwy zewnętrznej. Biofilm jest strukturą dynamiczną, w której różne gatunki drobnoustrojów kooperują ze sobą w procesie rozkładu substancji organicznych i pozyskiwania energii. Ważną cechą biofilmu jest możliwość regulowania procesów metabolicznych, która jest w nim bardziej rozwinięta niż w przypadku komórek wolno żyjących [38].

Prawidłowe funkcjonowanie wytworzonej błony biologicznej zapewnia międzykomórkowa sygnalizacja oparta na wytwarzaniu cząsteczek sygnałowych, które swobodnie dyfundują z jednej komórki do drugiej. Zjawisko to, określane jako wyczuwanie zagęszczenia komórek (quorum sensing – QS), jest sposobem ich porozumiewania się i polega na rozpoznawaniu liczebności komórek w biofilmie (tzw. zmysł tłoku). Zdolność komórek do komunikowania się sprawia, że biofilm może funkcjonować w sposób przypominający prymitywny organizm wielokomórkowy. Stwierdzono, że komórki tworzące biofilm wykazują większą oporność na działanie środków przeciwbakteryjnych. Przyczyn tego zjawiska można upatrywać w czynnikach środowiskowych oraz zmianach zachodzących na poziomie molekularnym [39].

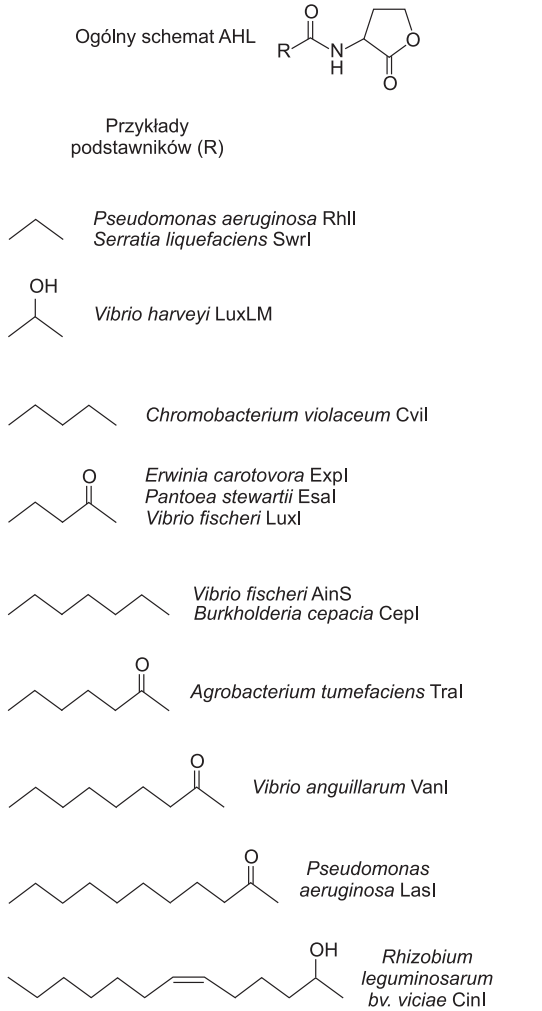
Sygnalizacja zagęszczenia (quorum sensing) w obrębie biofilmu

Zdolność bakterii do porozumiewania się oparta jest na wytwarzaniu sygnałów chemicznych zwanych autoinduktorami oraz obecności białek zdolnych do odbioru tych informacji, tzw. receptorów. Autoinduktory są sygnalizatorami zagęszczenia komórek. Rodzaj i ilość cząsteczek autoinduktora informuje bakterie, ile osobników tego samego gatunku znajduje się w środowisku [40]. Proces ten można określić jako swego rodzaju zliczanie w celu oceny, czy jest kworum. Osiągnięcie kworum, a więc określonego stężenia autoinduktora, jest sygnałem do uruchomienia i utrzymywania procesów istotnych dla populacji bakteryjnej. Sygnał chemiczny jest wytwarzany, wysyłany na zewnątrz i odbierany przez komórkę własną i sąsiednie. Wewnątrz komórki-odbiorcy sygnał jest oczyszczany i wzmacniany, a następnie przekazywany za pomocą układu regulatorów. W odpowiedzi na sygnał chemiczny następuje indukcja ekspresji odpowiednich genów i powstaje efekt metaboliczny równocześnie we wszystkich komórkach danej populacji. W ten sposób regulowane są także takie procesy, jak sporulacja, różnicowanie komórek, biosynteza metabolitów wtórnych, przekazywanie plazmidów, wirulencja, bioluminescencja, replikacja DNA, produkcja enzymów i toksyn [41, 42]. Mechanizm ten koordynuje procesy fizjologiczne i metabolicznie w obrębie biofilmu. Porozumiewanie się mikroorganizmów może zachodzić między komórkami jednego lub różnych gatunków [43]. Istnieje także możliwość porozumiewania się między komórkami organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Autoinduktory bakterii wykrywane są przez komórki organizmów wyższych, a same bakterie zdolne są do odbierania specjalnych cząstek sygnałowych produkowanych przez organizmy wyższe [44].

Budowa chemiczna cząsteczek sygnałowych, mechanizm ich działania oraz geny kontrolujące zjawisko komunikowania się komórek (QS) znacznie się różnią między gatunkami. Drobnocząsteczkowe związki sygnałowe są charakterystyczne w poszczególnych grupach mikroorganizmów, jednak pojedynczy szczep może wytwarzać kilka rodzajów cząsteczek sygnałowych [45]. U bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych funkcjonują dwa podstawowe modele działania systemu wyczuwania zagęszczenia komórek (liczenia kworum) [46, 47].

Autoinduktory bakterii Gram-ujemnych

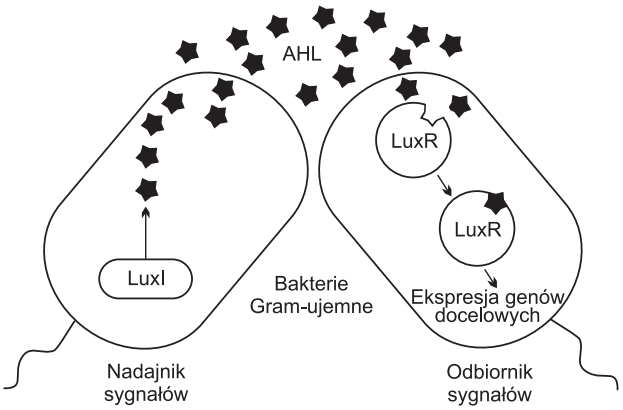
Drobnoustroje Gram-ujemne komunikują się za pośrednictwem cząsteczek sygnałowych AHL (homoserine lactone – HSL), zwanych także autoinduktorami. Pod względem chemicznym są to niskocząsteczkowe acylowane laktony homoseryny. Pierścień laktonu homoseryny jest acylowany w pozycji α łańcuchem tłuszczowym. Poszczególne cząsteczki sygnałowe różnią się budową kwasu tłuszczowego oraz liczbą atomów węgla w jego łańcuchu (rys. 2) [48].



Rys. 2. Struktura chemiczna wybranych autoinduktorów AHL bakterii Gram-ujemnych [41, 48]

Fig. 2. Chemical structure of different AHL autoinducers of Gram-negative bacteria [41, 48]

Dzięki temu każdy gatunek bakterii ma własny język niezbędny do porozumiewania się, który nie jest zrozumiały dla innych mikroorganizmów (rys. 3). Autoinduktory zaopatrzone w podstawniki o krótszych łańcuchach (4÷6 atomów węgla) swobodnie dyfundują przez błonę i ścianę komórkową. Autoinduktory zawierające dłuższe podstawniki (powyżej 6 atomów węgla) transportowane są do środowiska zewnętrznego z wykorzystaniem pompy protonowej. Do produkcji cząsteczek AHL bakterie wykorzystują S-adenozylometioninę (SAM) oraz grupę acylową pochodzącą z przemian kwasów tłuszczowych [43]. Przeniesienia podstawnika na cząsteczkę laktonu dokonuje specjalne białko przenośnikowe ACP (acyl carrier protein). Syntezę przeprowadzają białka z rodziny syntaz autoinduktora LuxI. Z centrum aktywnym enzymu wiąże się S-adenozylometionina, a następnie grupa acylowa zostaje przyłączona do SAM wiązaniem amidowym. Dochodzi do utworzenia wiązania estrowego w homoserynie oraz uwolnienia metylotioadenozyny, w wyniku czego powstaje acylowany lakton homoseryny (AHL) [32]. Cząsteczki AHL w strukturze biofilmu swobodnie dyfundują z jednej komórki do drugiej, jednak dopiero po osiągnięciu ich odpowiedniego zagęszczenia w otaczającym środowisku możliwe jest odczytanie sygnału. Funkcję detektorów pełnią białkowe regulatory transkrypcyjne LuxR. Białko to zbudowane jest z 250 aminokwasów. Za oddziaływanie z DNA odpowiedzialny jest C-końcowy fragment łancucha polipeptydowego, natomiast za rozpoznawanie i wiązanie AHL jego N-końcowy fragment. Związanie cząsteczki autoinduktora z białkiem LuxR jest przyczyną zmiany jego konformacji, aktywacji i indukcji transkrypcji genów docelowych. Ekspresja odpowiednich genów daje możliwości współdziałania komórek wchodzących w skład biofilmu w nowych warunkach. Okazało się także, że zdolność do wytwarzania autoinduktorów AHL może być przekazywana za pomocą horyzontalnego transferu genów do innych komórek, które nie mają zdolności do ich syntezowania.

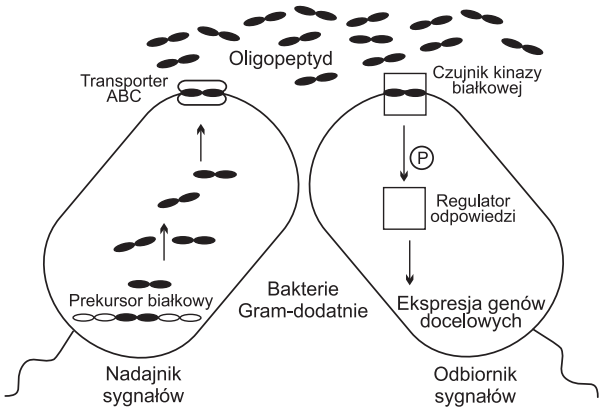


Rys. 3 Schemat systemu komunikacji międzykomórkowej bakterii Gram-ujemnych [46, 51]

Fig. 3. Scheme of the cell-cell communication system in Gram-negative bacteria [46, 51]

Autoinduktory bakterii Gram-dodatnich

Drobnoustroje Gram-dodatnie komunikują się za pośrednictwem cząsteczek białkowych, wykorzystując dwuelementowy system detekcji i odpowiedzi na obecność autoinduktora (rys. 4). Autoinduktory peptydowe (AIPs – autoinducing polypeptides) powstają w wyniku trawienia większych prekursorów białkowych [43]. Cząsteczki oligopeptydów sygnalizacyjnych zbudowane są z aminokwasów [49]. W przeciwieństwie do AHL, cząsteczki sygnałowe bakterii Gram-dodatnich nie są w stanie swobodnie dyfundować przez błonę cytoplazmatyczną. Są one wydzielane na zewnątrz komórki z udziałem białka transportującego zależnego od ATP. W chwili osiągnięcia odpowiedniego zagęszczenia następuje ich przyłączenie do związanej z błoną komórkową kinazy białkowej. Po rozpoznaniu autoinduktora to sensorowe białko ulega fosforylacji. Zmieniony fragment cząsteczki łączy się z białkiem regulacyjnym, powodując również jego fosforylację. W odpowiedzi regulator białkowy może wiązać promotor DNA i regulować ekspresję odpowiednich genów. U bakterii Gram-dodatnich jako autoinduktory funkcjonują między innymi oligopeptydy (*B. subtilis*), cykliczne oktapeptydy (*S. aureus*), butyrolaktony (*S. griseus*) i siderofory (*Bacillus* sp.) [33].

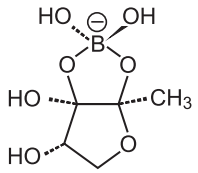


Rys. 4 Schemat systemu komunikacji międzykomórkowej bakterii Gram-dodatnich [46, 51]

Fig. 4. Scheme of the cell-cell communication system in Gram-positive bacteria [46, 51]

Autoinduktory uniwersalne

Istnieją autoinduktory niespecyficzne gatunkowo, co oznacza, że istnieje język, którym porozumiewać się mogą mikroorganizmy należące do różnych gatunków. Są nimi cząsteczki Al-2, biorące udział w regulacji mechanizmu wrażliwości progowej zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Cząsteczki te kontrolują między innymi geny odpowiedzialne za bioluminescencję *Vibrio harveyi* czy ekspresję genów odpowiedzialnych za wirulencję *E. coli*, *V. cholerae* czy *C. perfringens* [33]. W biosyntezie Al-2 bierze udział adenozylometionina (SAM) przekształcana do adenozylohomocysteiny, a następnie do rybozylohomocysteiny. Proces syntezy prowadzi syntaza autoinduktora Al-2, jaką jest białko LuxS. Katalizuje ono powstawanie 4,5-dihydroksy-2,3-pentanedionu przekształcającego się spontanicznie w cykliczny furanon (rys. 5) [50].



Al-2 (*Vibrio harveyi*)

Rys. 5. Struktura chemiczna uniwersalnej cząsteczki sygnałowej Al-2 [32, 41]

Fig. 5. Chemical structure of universal signaling molecule Al-2 [32, 41]

Zdolność do komunikowania za pomocą autoinduktorów Al-2 ma wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych należących do rodzajów *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Deinococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Neisseria*, *Oceanobacillus*, *Oenococcus*, *Pasteurella*, *Porphyromonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* i *Yersinia*. W ten sposób regulowana jest ich wirulencja, produkcja toksyn, luminescencja, zdolność do produkcji antybiotyków oraz do agregacji w formie biofilmu. Wielu badaczy uważa, że omawiany system komunikacji między bakteriami należy do najstarszych w sensie ewolucyjnym [51].

Autoinduktory produkowane przez grzyby

Drobnoustrojem modelowym w badaniach nad wyczuwaniem zagęszczenia u grzybów są drożdże z rodzaju *Candida*. Stwierdzono kilka produkowanych przez nie cząsteczek sygnałowych. Najlepiej poznany jest wykryty u *C. albicans* farnezol ($C_{15}H_{26}O$), alkohol z grupy terpenów, syntezowany w szerokim zakresie temperatur (23÷43 °C) [52]. Stwierdzono, że oddziałuje on z receptorami komórkowymi blastospor uniemożliwiając ich przekształcenie do pseudostrzępki i dojrzewanie biofilmu. Farnezol stymuluje także grzyby do produkcji chlamydospor oraz jest czynnikiem chroniącym komórki przed działaniem nadtlenku wodoru [53]. Okazało się także, że działa on na inne gatunki należące do rodzaju *Candida*, jak również grzyby innych rodzajów. Odmienne działanie ma produkowany także przez *C. albicans* autoinduktor o nazwie tyrozol stymulujący wytwarzanie strzępek podczas pośredniej fazy wzrostu biofilmu tworzonego przez grzyby. Chroni on także ich komórki przed spadkiem ekspresji genów koniecznych do replikacji DNA, segregacji chromosomów oraz regulacji cyklu komórkowego [54].

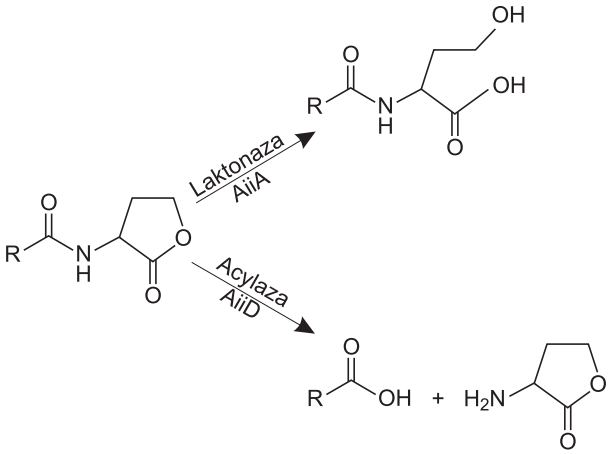
Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* zdolne są do wytwarzania dwóch typów cząsteczek sygnałowych – fenyloetanolu i tryptofolu. Są to aromatyczne alkohole powstające podczas przemian fenyloalaniny i tryptofanu. Regulują one transformację, a także transkrypcję genów związanych z metabolizmem grzybów. Autoinduktory te charakteryzują się wysoką specyficznością i nie są odczytywane przez *Candida albicans* [54].

Degradacja cząsteczek sygnałowych i walka z biofilmem

Walka z drobnoustrojami może być ułatwiona dzięki odkryciu enzymów hydrolitycznych degradujących cząsteczki sygnałowe AHL produkowane przez bakterie Gram-ujemne (rys. 6). Enzymy te zaburzają transkrypcję, a w dalszej kolejności formowanie się biofilmu. Należą one do dwóch klas – laktonaz AHL i acylaz AHL. Występują zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [55]. Laktonazy to enzymy hydrolizujące pierścień laktonu homoseryny. Nie naruszają przy tym wiązania między laktonem a podstawnikiem bocznym. Enzym ten został po raz pierwszy wyizolowany z komórek bakterii z rodzaju *Bacillus*. Jest to produkt genu *aiiA* zbudowany z 250 aminokwasów. Laktonazę zdolną do degradacji cząsteczek sygnałowych (laktonaza AhlD) wyizolowano również z komórek bakterii z rodzaju *Arthrobacter*. Wykorzystuje ona AHL w charakterze źródła węgla i azotu. Homologi AhlD wykryto u innych gatunków bakterii takich jak *Bacillus stearothermophilus* i *Klebsiella pneumoniae*. W komórkach *Agrobacterium tumefaciens* zidentyfikowano natomiast gen *attM*, kodujący homolog laktonazy AiiA z *Bacillus* sp. Produkt tego genu zbudowany jest z 264 aminokwasów. Na uwagę zasługuje fakt, że gen *attM* kodujący laktonazę jest zlokalizowany na plazmidzie poza chromosomem bakteryjnym [48].

Drugą grupę enzymów degradujących cząsteczki sygnałowe AHL stanowią acylazy. Hydrolizują one wiązanie amidowe pomiędzy laktonem L-homoseryny a acylowym podstawnikiem bocznym w cząsteczce AHL, natomiast struktura chemiczna laktonu homoseryny pozostaje zachowana. Enzymy te wyizolowano z komórek bakterii Gram-ujemnych. Pierwszą z nich była bakteria glebowa *Variovorax paradoxus*, która wykorzystuje produkty degradacji, AHL jako źródło węgla, azotu i energii. Z komórek bakterii *Ralstonia eutropha* wyizolowano natomiast enzym będący produktem genu *aiiD*. Enzym ten degraduje AHL do laktonu homoseryny i kwasu tłuszczowego. Zdolność do degradacji AHL na drodze hydrolizy mają także bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, gdyż lakton homoseryny i homoseryna są dla nich toksyczne. Wytwarzany enzym jest homologiem acylazy AiiD i produktem genu *pvdQ* [41, 55].

Enzymy zdolne do degradacji AHL mogą stanowić narzędzie do walki z chorobami roślin, w zwalczaniu rozwoju biofilmu oraz w leczeniu chorób człowieka. Wprowadzenie genów kodujących laktonazy i acylazy AHL do genomu roślin i ich ekspresja w tkankach mogłaby być formą ochrony roślin. Patogeny roślin, takie jak *P. carotovorum*, *P. chrysanthemi* czy *A. tumefaciens*, dokonują bowiem ich inwazji po uzyskaniu informacji o zagęszczeniu, gdyż synteza czynników patogenezy znajduje się u nich pod kontrolą systemu QS. Przypuszcza się, że enzymy te są powszechne w środowisku. Kodujące je geny występują na plazmidach, dlatego łatwo podlegają rozprzestrzenianiu między różnymi gatunkami bakterii [41, 46]. Wykazano ponadto, że niektóre komórki eukariotyczne mają mechanizmy degradujące bakteryjne cząsteczki sygnałowe. W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* mechanizm degradacji AHL przez komórki nabłonka może ograniczać i hamować infekcje uniemożliwiając syntezę czynników wirulencji [43]. Należy jednak zwrócić uwagę na możliwość występowania skutków niekorzystnych, wynikających z zastosowania



Rys. 6. Inaktywacja cząsteczek sygnałowych AHL na drodze hydrolizy enzymatycznej [32, 55]
Fig. 6. Inactivation of AHL signaling molecules *via* enzymatic hydrolysis [32, 55]

tego typu narzędzi walki. Enzymatyczna degradacja cząsteczek AHL produkowanych przez patogeny roślin może spowodować zachwianie równowagi w ekosystemach glebowych. Ich efektem może być nadmierny rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium*, czy też spadek intensywności zasiedlania korzeni roślin motylkowych przez bakterie z rodzaju *Rhizobium* i *Sinorhizobium*, niezbędnych w procesie wiązania azotu atmosferycznego [55].

Cząsteczki sygnałowe można także zwalczać metodami chemicznymi. Do tego celu najczęściej stosowana jest hydroliza alkaliczna, prowadząca do powstania acylowanych pochodnych homoseryny [43]. Dobre efekty daje także wprowadzanie roztworów wodnych silnych utleniaczy w niewielkich stężeniach, które inaktywują cząsteczki sygnałowe mikroorganzimów [56].

Zakłócanie systemu komunikacji u bakterii (QS) może się odbywać poprzez wytwarzanie cząsteczek antagonistycznych względem AHL. Możliwości takie mają zarówno rośliny, jak i niektóre zwierzęta. Przykładem może być zdolność do wytwarzania halogenowanych furanonów przez wodorost morski *Delisea pulchra*. Wykryto, że obecność tych związków zapobiega tworzeniu biofilmu przez *S. liquefaciens* [43].

Cząsteczki sygnałowe mogą także uczestniczyć w programowanej śmierci komórek w organizmie wielokomórkowym, zwanej apoptozą. Apoptoza jest zjawiskiem naturalnym pozwalającym na usuwanie z organizmu zużytych lub uszkodzonych komórek, w celu poprawy jego egzystencji. Cząsteczki sygnałowe stymulują proces apoptozy w zainfekowanych komórkach eukariotycznych. Przykładem może być farnezol produkowany przez *C. albicans*, który stymuluje komórki *Aspergillus nidurans* do apoptozy. Ten sam związek i jego pochodne indukują apoptozę w ludzkich komórkach raka podstawnokomórkowego płuc (*adenocarcinoma*) [54].

Poznanie mechanizmów umożliwiających niszczenie cząsteczek sygnałowych może przyczynić się opracowania nowych metod zwalcznia biofilmu. Niestety większość badań nad mechanizmami komunikacji międzykomórkowej jest jeszcze w fazie laboratoryjnej i praktyczne zastosowanie w różnych dziedzinach wymaga ich kontynuacji. Warto także pamiętać o tym, że aktywność cząsteczek sygnałowych uzależniona jest od wielu czynników środowiskowych natury fizyczno-chemicznej, a także biologicznej, takich jak np. cząsteczki antagonistyczne produkowane przez inne drobnoustroje. Opracowane w przyszłości narzędzia do walki z biofilmem, poprzez ingerencję w ich system komunikacji, powinny być jednak ostrożnie wykorzystywane, z uwagi na możliwe ich niepożądane skutki.

Mechanizmy oporności biofilmu na substancje przeciwdrobnoustrojowe

Komórki mikroorganizmów zgromadzone w biofilmie są bardziej oporne na działanie czynników zewnętrznych, niż te same, pozostające w postaci planktonu [25]. Oporność ta wynika ze specyficznej struktury biofilmu oraz regulowana jest przez szereg charakterystycznych mechanizmów [57]. Wydaje się, że głównym jej powodem jest otoczenie komórek biofilmu lepkim polimerem (EPS), który ogranicza dyfuzję substancji przeciwustrojowych do wnętrza biofilmu, a także zmniejsza skuteczność działania komórek obronnych organizmu zaatakowanego żywiciela. EPS chroni też drobnoustroje przed fagocytozą i wysychaniem. Ponadto, w miarę dojrzewania biofilmu, następuje wzrost udziału składników polisacharydowych w jego otoczce, co zwiększa liczbę wolnych grup funkcyjnych, przyczyniając się do wysokiej oporności mikroorganizmów. Reaktywne grupy funkcyjne egzopolisacharydów mogą wiązać się bowiem z zastosowanymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, zapobiegając przenikaniu czynników toksycznych do cytoplazmy komórek. Jednakże długotrwałe oddziaływanie na biofilm mikrobiologiczny środkami przeciwdrobnoustrojowymi prowadzi do zmniejszenia roli EPS w zjawisku oporności, ze względu na brak wolnych grup funkcyjnych w łańcuchach egzopolisacharydów bakteryjnych [26, 29, 40]. Na siłę oddziaływania substancji przeciwbakteryjnych mają także duży wpływ warunki życiowe panujące wewnątrz biofilmu. Są one zdecydowanie odmienne w porównaniu z otoczeniem. Przede wszystkim mniejsza jest zawartość tlenu, a w głębszych warstwach biofilmu nawet panują warunki beztlenowe. Dlatego też cześć komórek przechodzi w stan anabiozy, a zarówno metabolizm, jak i ich namnażanie wewnątrz biofilmu są zwolnione. Ponieważ niektóre środki przeciwbakteryjne działają wyłącznie na komórki aktywne metabolicznie, przejście w fazę stacjonarną części komórek znajdujących się wewnętrznej strefie biofilmu może być związane ze znacznym zmniejszeniem ich wrażliwości na te substancje. Wysoka oporność błon biologicznych na działanie substancji antymikrobiologicznych wynika zarówno ze specyfiki zmian metabolicznych, jak i genetycznych związanych z fazą wzrostu komórek współtworzących biofilm. Okazało się, że bakterie wyspecjalizowały się w produkowaniu specjalnych białek chroniących je przed działaniem czynników zewnętrznych [57]. W wyniku działania czynników stresowych, jakim poddawane są bakterie (podwyższona temperatura, toksyny, promieniowanie, głodzenie) następuje u nich ekspresja genów odpowiedzialnych za indukowanie produkcji specjalnych białek zwanych białkami szoku termicznego (sHSP). Białka te odgrywają ważną rolę w ochronie niezbędnych do życia komórki białek, otaczają je i niedopuszczają do nieodwracalnych zmian, które mogą oznaczać śmierć komórki [58].

W dojrzałym biofilmie uruchamiane są także geny odpowiedzialne za syntezę enzymów rozkładających wolnodyfundujące substancje przeciwbakteryjne. Przypuszcza się także, że niektóre z nich mogą modyfikować budowę tych substancji, a tym samym zmieniać ich właściwości. Uważa się także, że produkowane przez niektóre bakterie biosurfaktanty (np. ramnolipidy) przyczyniają się do wzrostu oporności biofilmu na fagocytozę i uczestniczą czynnie w infekcjach chorobowych [26, 37]. Podczas długotrwałego działania środków antybakteryjnych na biofilm może także dochodzić do indukcji mutacji punktowych genów, których produkty ekspresji podnoszą poziom oporności poszczególnych komórek znajdujących się w biofilmie. W obrębie biofilmu dochodzi do horyzontalnego transferu genów. Przekazywanie plazmidów jest jednym z ważnych mechanizmów rozprzestrzeniania się oporności na leki, środki dezynfekcyjne czy inne czynniki natury chemicznej. Horyzontalna wymiana genów zwiększa szanse mikroorganizmów na przetrwanie [59, 60]. Stwierdzono, że wysoka oporność komórek bakteryjnych zawartych w biofilmie na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowych zależy także w dużej mierze od rodzaju powierzchni, na której została wytworzona [61]. Wykazano, że biofilm *Listeria monocytogenes* jest łatwiej inaktywowany i usuwany z powierzchni stalowych, niż z powierzchni tworzyw sztucznych, takich jak polistyren czy poliuretan [62].

Problemy wynikające z zasiedlania powierzchni przez biofilm

Patogeneza chorób człowieka i zwierząt

Organizm człowieka jest układem otwartym, zasiedlonym przez liczne mikroorganizmy, głównie w postaci biofilmu. Większość z nich to mikroorganizmy symbiotyczne, natomiast pozostałe to mikroorganizmy oportunistyczne, które wywołują objawy chorobowe tylko w chwili zachwiania homeostazy w organizmie człowieka. Dochodzi wówczas u nich do ekspresji pewnych genów, czego skutkiem mogą być bardzo ciężkie infekcje (tab. 2). Należą do nich infekcje układu krążenia, układu moczowego, układu mięśniowo-szkieletowego czy próchnica zębów [36, 63, 64]. Powstawanie biofilmu jest przyczyną poważnych problemów u chorych z mukowiscydozą. Produkowany przez organizm chorego śluz jest podłożem do rozwoju mikroorganizmów. Uszkodzenie płuc u pacjentów spowodowane jest wzmożoną odpowiedzią immunologiczną na rozwój mikroorganizmów.

Istotny problem stanowi także zasiedlanie przez mikroorganizmy materiałów medycznych. Dotyczy to zarówno biomateriałów znajdujących się całkowicie wewnątrz ludzkiego ciała, jak i na jego zewnętrznej powierzchni. Podatne na kolonizację przez biofilm są implantowane sztuczne serca, stawy, soczewki kontaktowe, zastawki serca, protezy naczyniowe, implanty stomatologiczne, tkaniny i szwy oraz cewniki. Bakteriami najczęściej kolonizującymi biomateriały są *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* [65]. Poważnym problemem jest też zasiedlanie przez mikroorganizmy urządzeń diagnostycznych, takich jak np. endoskopy. Wśród najczęściej izolowanych drobnoustrojów znajdują się pałeczki jelitowe, bakterie przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus* czy paciorkowce z rodzaju *Streptococcus*. Przyczyną skażenia mikrobiologicznego są nieprawidłowości procesu dezynfekcji, budowa endoskopów uniemożliwiająca dostęp mechaniczny do niektórych wąskich kanałów, a także miejscowe uszkodzenia kanałów endoskopów ułatwiające adhezję mikroorganizmów. Szczególne zagrożenie stanowią mikroorganizmy bytujące w środowisku szpitalnym, najczęściej w miejscach o dużej wilgotności i dobrym napowietrzeniu, takich jak umywalki, nawilżacze powietrza, klimatyzatory czy rury respiratorów. W takich miejscach przebywają często pałeczki z rodzaju *Pseudomonas* o silnych właściwościach inwazyjnych i toksycznych, szerokiej oporności na antybiotyki oraz środki dezynfekcyjne. Drobnoustroje te wykazują zdolność do wytwarzania biofilmu nieprzepuszczającego elementów odpornościowych (przeciwciał, dopełniacza, leukocytów), ograniczającego oddziaływanie antybiotyków oraz neutralizującego reaktywne formy tlenu.

Mikroorganizmy zdolne do wytwarzania biofilmu są często przyczyną groźnych zakażeń u zwierząt [66]. Typowym przykładem może być zapalenie gruczołu mlekowego u krów wywołane przez gronkowce, najczęściej *Staphylococcus aureus*. Drobnoustroje te charakteryzuje wielość czynników wirulencji (związanych z budową ściany komórkowej oraz wydzielanych egzotoksyn). Mają one zdolność do wytwarzania biofilmu oraz szereg mechanizmów umożliwiających uniknięcie odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu. Gatunek ten należy do najgroźniejszych patogenów, a wytwarzany biofilm sprzyja utrzymywaniu się stanu zapalnego na skutek zmniejszenia wrażliwości bakterii na fagocytozę i środki przeciwbakteryjne. Bakterie z rodzaju *Yersinia*, obecne na powierzchni roślin, w glebie i wodach powierzchniowych, zdolne do wytwarzania biofilmu, uważane są za potencjalne patogeny zwierząt. Zachorowania u zwierząt przybierają niekiedy postać epizootii, najczęściej mają postać ostrych lub przewlekłych biegunek, rzadziej zmian skórnych w postaci rumienia oraz zapalenia stawów.

Problemy w przemyśle spożywczym

Drobnoustroje wytwarzające biofilm stanowią poważny problem, z jakim boryka się przemysł spożywczy. Mogą one zasiedlać zarówno produkty spożywcze, jak i powierzchnie robocze służące do ich przetwarzania. Zakażone produkty pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego

Tabela 2. Przykłady infekcji i chorób związanych z występowaniem biofilmu [64]
Table 2. Examples of biofilm-related infections and diseases [64]

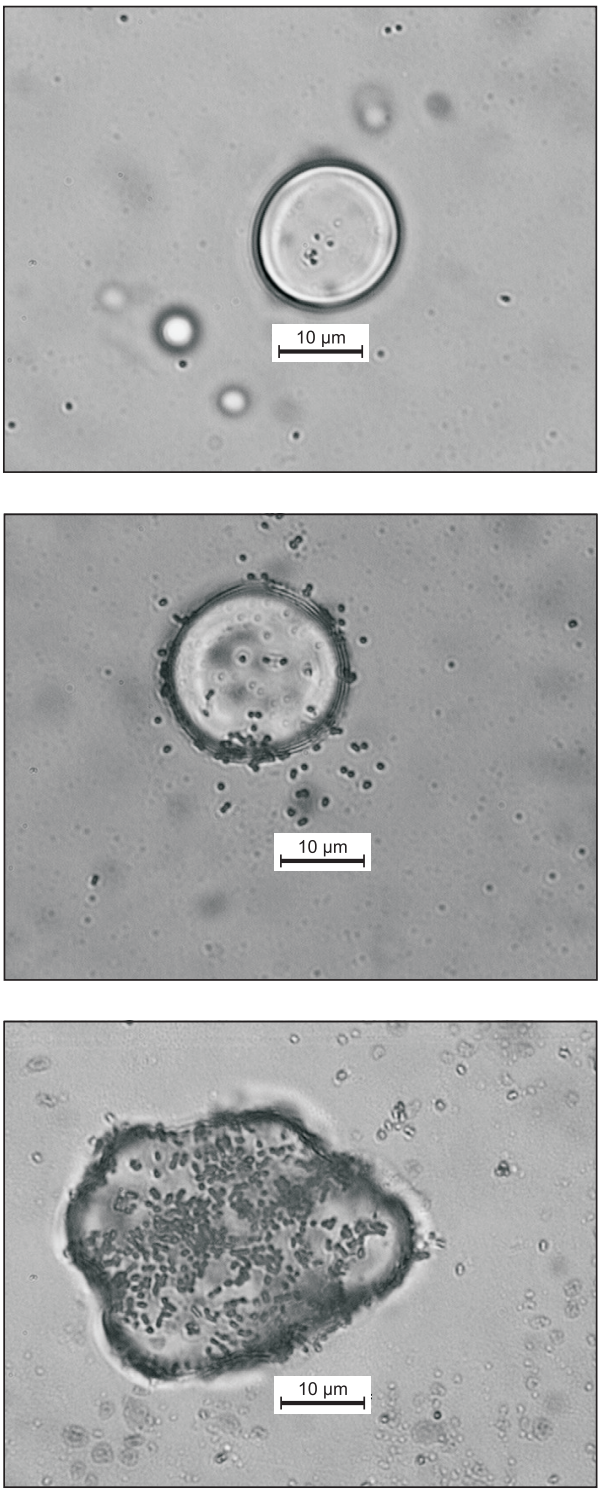
Infekcja/choroba	Mikroorganizm w biofilmie
Próchnica zębów	ziarniaki Gram-dodatnie (kwasotwórcze) (np. z rodzaju *Streptococcus*)
Zapalenie przyzębia (paradontoza)	bakterie beztlenowe Gram-ujemne (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, *Prevotella intermedia*)
Zapalenie ucha środkowego	szczepy gatunku *Hemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa*
Infekcja układu mięśniowo-szkieletowego	ziarniaki Gram-dodatnie (np. z rodzaju *Staphylococcus*)
Martwicze zapalenie powięzi	streptokoki z grupy A
Przewlekłe infekcje ran	bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus*, fakultatywne laseczki Gram-ujemne, bakterie beztlenowe z rodzaju *Fusobacterium* i *Peptostreptococcus*
Infekcja dróg żółciowych	bakterie jelitowe (np. z gatunku *Escherichia coli*)
Zapalenie szpiku	bakterie i grzyby – różne gatunki
Bakteryjne zapalenie prostaty	*Escherichia coli* i inne bakterie Gram-ujemne
Infekcyjne zapalenie wsierdzia w obrębie zastawki własnej	paciorkowce zieleniejące
Zapalenie płuc w przebiegu mukowiscydozy	*Pseudomonas aeruginosa* i *Burkholderia cepacia*

stają się przyczyną poważnych schorzeń u ludzi [19]. Wywołują je bakterie z rodzaju *Yersinia, Salmonella, Escherichia, Campylobacter, Staphylococcus, Bacillus* oraz pałeczki z rodzaju *Listeria*. Za główny rezerwuar bakterii z rodzaju *Yersinia* i źródło zakażenia człowieka uważa się mięso wieprzowe. Zakażenie pałeczkami *Y. pseudotuberculosis* u człowieka może mieć postać zatrucia pokarmowego, zapalenia jelit, bakteriemii czy posocznicy. Coraz częściej produkty spożywcze są także źródłem infekcji pałeczkami z rodzaju *Listeria.* Są to fakultatywne patogeny wykazujące powinowactwo do komórek centralnego układu nerwowego człowieka i zwierząt. Infekcje często mają przebieg ostry, kończący się śmiercią. Drobnoustroje te namnażają się na powierzchni przedmiotów nieożywionych oraz w przewodzie pokarmowym, w postaci mikrokolonii otoczonych warstwą glikokaliksu. Po połączeniu się pojedynczych kolonii powstaje biofilm. Podobnie jak u innych gatunków bakterii, zwiększa on oporność pałeczek z rodzaju *Listeria* na antybiotyki, oddziaływanie immunoglobulin oraz stanowi on ochronę przed fagocytozą [7].

W przemyśle spożywczym pokrywanie przez biofilm powierzchni roboczych może być przyczyną skażenia żywności drobnoustrojami powodującymi jej zepsucie, a także drobnoustrojami chorobotwórczymi. Biofilmy bakteryjne skutecznie kolonizują powierzchnie użytkowe ze stali nierdzewnej, szkła czy teflonu [22]. Przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni wpływ rodzaju badanego drobnoustroju oraz dostępności składników odżywczych na szybkość powstawania biofilmu bakteryjnego. Zjawiska te są przyczyną poważnych strat w przemyśle spożywczym.

Rozkład smarów i olejów

Oleje i smary umożliwiają pracę wielu urządzeń i silników. Stanowią one mieszaninę wielu związków, głównie węglowodorów, o zróżnicowanych właściwościach chemicznych, fizycznych i biologicznych. Z uwagi na hydrofobowy charakter, ich podatność na biodegradację jest stosunkowo mała. Problemy powstają wówczas, gdy dochodzi do kontaktu tych związków z wodą, przy dostępie powietrza oraz mikroorganizmów. Na granicy faz olej–woda dochodzi do rozwoju mikroorganizmów, powstaje cienka warstwa biofilmu. Mikroorganizmy wykształciły mechanizmy, dzięki którym zdolne są do wykorzystywania węglowodorów w charakterze substratu pokarmowego [9, 12]. Mechanizmy te umożliwiają drobnoustrojom rozkład węglowodorów zawieszonych w postaci drobnych kropel (miceli) w roztworach wodnych (rys. 7). Wytwarzane przez mikroorganizmy biosurfaktanty powodują zwiększenie dostępności nierozpuszczalnych w wodzie substratów, a w ich obecności substancje te przechodzą do miceli i są rozprowadzane po powierzchni komórki. Substraty będące ciałami stałymi są natomiast zwilżane i dyspergowane, przez co zwiększa się ich powierzchnia. To z kolei umożliwia ich kolonizację przez mikroorganizmy. Biodegradację węglowodorów prowadzi wiele gatunków bakterii i grzybów. Znajdują się wśród nich drobnoustroje patogenne stanowiące zagrożenie dla człowieka. Skutkiem działalności mikroorganizmów degradujących węglowodory są problemy z funkcjonowaniem wielu urządzeń, wynikające ze zmiany właściwości fizyczno-chemicznych smarów. Biodegradacja węglowodorów przez mikroorganizmy w niektórych przypadkach prowadzi do wytworzenia kwasów organicznych, jako produktów rozkładu, które powodują korozję metali [33].



Rys. 7. Etapy zasiedlania kropli oleju napędowego przez mikroorganizmy
Fig. 7. Stages of diesel oil droplet colonization by microorganisms

Degradacja materiałów budowlanych

Procesy niszczenia materiałów stymulowane aktywnością biologiczną określane są jako biodeterioracja, korozja mikrobiologiczna, biokorozja lub też korozja wzbudzona, wywoływana przez mikroorganizmy (MIC – microbiologically influenced/induced corrosion). Zjawisko to powoduje niszczenie budowli i konstrukcji naziemnych, zagłębionych w gruncie oraz podwodnych. Rozwój drobnoustrojów

na powierzchni materałów budowlanych uzależniony jest od szeregu czynników natury fizyczno-chemicznej. Szczególne znaczenie ma wilgotność materiału, a w przypadku materiałów mineralnych – ich skład mineralogiczny, porowatość, typ spoiwa i przepuszczalność wodna. Kolonizację powierzchni materiałów budowlanych ułatwia naruszenie jej struktury na skutek działania wiatru, wody, cząstek pyłów i innych zanieczyszczeń atmosfery [67].

Biofilm złożony zarówno z bakterii, jak i grzybów może zasiedlać zewnętrzne powierzchnie budynków czy pomników, powodując ich zanieczyszczenie, destrukcję i obniżając walory estetyczne [68]. Uważa się, że poważną rolę w destrukcji budynków z kamienia odgrywa zdolność mikroorganizmów do wytwarzania kwasów organicznych chelatujących kationy. Ponadto ich rozwój umożliwia późniejszą kolonizację powierzchni przez glony, porosty, mchy i rośliny wyższe. Epifityczne glony rozwijają się na powierzchniach wilgotnych i ciepłych, w miejscach, do których dociera światło. Powierzchnię budynków zasiedlają glony należące do zielenic i sinic, z rodzaju *Pleurococcus, Stichococcus, Trentepohlia, Oscillatoria* i *Scytonema*. Ich wpływ na uszkodzenia powierzchni budynków związany jest z zatrzymywaniem wody przez biomasę glonów. Zmiany temperatury, powtarzające się cykle zamrażania i rozmrażania wody, zwiększają okresowo jej objętość i powodują mechaniczne uszkodzenia fasad i elewacji [68].

Biofilm wytworzony przez grzyby należące do rodzajów *Aureobasidium, Cladosporium, Aspergillus* i *Penicillium* często pokrywa wewnętrzne powierzchnie w budynkach. Ich rozwój może powodować daleko idące konsekwencje. Grzyby mogą metabolizować szereg składników farb pokrywających ściany, zasiedlać powierzchnie drewniane a nawet pokrywać warstwą biofilmu elementy metalowe. W skład biofilmu mogą wchodzić grzyby patogenne stanowiące zagrożenie dla człowieka. W wilgotnych, źle wentylowanych pomieszczeniach rozwijają się grzyby alergizujące oraz grzyby wytwarzające metabolity o właściwościach rakotwórczych [38].

Zasiedlanie systemów wodociągowych

Zasiedlanie przez biofilm sieci, instalacji i urządzeń wodociągowych stanowi zagrożenie sanitarne dla konsumentów wody. Erozja i odrywanie fragmentów biofilmu jest przyczyną wtórnego skażenia mikrobiologicznego wody przeznaczonej do spożycia [15, 69, 70, 71]. Wśród uwalnianych mikroorganizmów znajdują się także potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi, takie jak bakterie gatunku *Legionella pneumophila* czy pierwotniaki z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia*. Biofilm zasiedlać może przewody wodociągowe zbudowane z tradycyjnych materiałów, takich jak żeliwo i stal czy cement, a także z zastępujących je tworzyw sztucznych [72]. Rurociągi zbudowane z metali podlegają korozji mikrobiologicznej, co może być przyczyną zmniejszenia przepływności przewodów wodociągowych [73]. Stosowanie tworzyw sztucznych nie zabezpiecza w pełni sieci wodociągowej przed rozwojem biofilmu. Z powierzchni materiałów polimerowych wymywane są związki organiczne wykorzystywane przez mikroorganizmy w charakterze substratu pokarmowego. Prowadzi to do wyraźnego spadku jakości sanitarnej wody u odbiorców [74].

Podsumowanie

Biofilm, jako zjawisko, nie jest jeszcze do końca poznany. Jest on przedmiotem zainteresowania badaczy, którzy z jednej strony widzą możliwości jego wykorzystania do stymulacji szeregu procesów technologicznych, a z drugiej są zainteresowani metodami jego eliminacji z uwagi na szkody, jakie on wywołuje powodując trudne do wyleczenia schorzenia oraz straty w gospodarce. Przeciwdziałanie mikrobiologicznej degradacji materiałów polega na zwalczaniu biofilmu za pomocą odpowiednich środków chemicznych lub stosowaniu nowych materiałów, trudnych do kolonizacji przez bakterie. W systemach wodociągowych konieczna jest kontrola rozwoju biofilmu, polegająca na utrzymywaniu środka dezynfekcyjnego w ilości uniemożliwiającej rozwój bakterii. Stosowane do tej pory metody usuwania biofilmu opierają się na modyfikacji środowiska, w którym on występuje poprzez stosowanie ultradźwięków, zmiany pH czy niskonapięciowych pól magnetycznych.

Eliminacja biofilmu jest szczególnie ważna z punktu widzenia zdrowia człowieka, dla którego stanowi on poważne zagrożenie. Poznanie mechanizmu powstawania oraz funkcjonowania biofilmu daje możliwość opracowania nowych metod jego zwalczania. Należą do nich metody zapobiegające adhezji mikroorganizmów do biomateriałów poprzez związanie z powierzchnią czynników antybakteryjnych, takich jak enzymy lityczne, bakteriocyny, biosurfaktanty, eukariotyczne peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe. Wykazano, że zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko adhezynom bakteryjnym i ich receptorom hamuje zasiedlanie powierzchni. Prowadzi się także badania nad zwalczaniem biofilmu przez blokowanie powstawania substancji zewnątrzkomórkowych (EPS) lub ich niszczenie, a także niszczenie struktury biofilmu, przy zastosowaniu enzymów litycznych, surfaktantów czy bakteriofagów.

Duże nadzieje wiąże się z poznaniem dróg komunikacji w obrębie biofilmu. Blokowanie powstawania i działania mediatorów sygnalizacji międzykomórkowej może zakłócić i uniemożliwić agregację biofilmu. Produkuje się także coraz to nowsze środki dezynfekcyjne oraz materiały zawierające związki antymikrobiologiczne. Opracowane w przyszłości metody być może nie pozwolą na całkowite wyeliminowanie tego zjawiska, ale pozwolą ograniczyć jego niekontrolowany rozwój.

LITERATURA

1. R.M. DONLAN: Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002, Vol. 8, pp. 136–151.
2. J.W. COSTERTON, Z. LEWANDOWSKI, D. DeBEER, D.E. CALDWELL, D.R. KORBER, G. JAMES: Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 1994, Vol. 176, pp. 2137–2142.
3. J.W. COSTERTON, Z. LEWANDOWSKI, D.E. CALDWELL, D.R. KORBER, H.M. LAPPIN-SCOTT: Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 1995, Vol. 49, pp. 711–745.
4. J. CHANDRA, G. ZHOU, M.A. CHANNOUM: Fungal biofilms and actimycotics. *Current Drug Targets* 2005, No. 8, pp. 887–894.
5. C.R. CURRIE: A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 2001, Vol. 55, pp. 357–380.
6. R.D. MONDS, G.A. O´TOOL: The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* 2009, Vol. 17, No. 2, pp. 73–87.

7. A. FUROWICZ, A. BOROŃ-KACZMARSKA, M. FERLAS, D. CZERNOMYSY-FUROWICZ, A. POBUCEWICZ: Biofilm bakteryjny oraz inne elementy i mechanizmy pozwalające na przeżycie drobnoustrojom w warunkach ekstremalnych. *Medycyna Weterynaryjna* 2010, vol. 66, nr 7, ss. 444–448.
8. G. BITTON: Wastewater Microbiology. John Wiley & Sons Inc. 2005.
9. B. KOŁWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
10. W. ADAMIAK: Możliwości zastosowania mikroorganizmów adaptowanych *in vitro* do rozkładu wybranych gazowych zanieczyszczeń powietrza. Rozprawa doktorska. Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Wrocław 2005 (praca niepublikowana).
11. Z. LEWANDOWSKI, J.P. BOLTZ: Biofilms in water and wastewater treatment. *Treatise on Water Science* 2011, Vol. 4, pp. 529–570.
12. B. KOŁWZAN, W. ADAMIAK, K. GRABAS, A. PAWEŁCZYK: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław2005.
13. R. SINGH, D. PAUL, R.K. JAIN: Biofilms: Implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 2006, Vol. 14, No. 9, pp. 389–397.
14. J.W. COSTERTON, P.S. STEWART, E.P. GREENBERG: Bacterial biofilms: Common cause of persistent infections. *Science* 1999, Vol. 284, pp. 1318–1320.
15. A. GRABIŃSKA-ŁONIEWSKA, E. SIŃSKI: Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych. Wyd. Seidel-Przywecki, Warszawa 2010.
16. M.S. APARNA, S. YADAV: Biofilms: Microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008, Vol. 12, No. 6, pp. 526–530.
17. P.S. STEWERT, J.W. COSTERTON: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, Vol. 358, pp. 135–138.
18. J.W. COSTERON, L. MONTANARO, C.R. ACIOLA: Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *International Journal of Artificial Organs* 2005, Vol. 28, No. 11, pp. 1062–1068.
19. X. SHI, X. ZHU: Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* 2009, Vol. 20, No. 9, pp. 407–413
20. K. CZACZYK, K. WOJCIECHOWSKA: Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia* 2003, nr 3, ss. 180–192.
21. K.C. MARSHALL: Adsorption and adhesion process in microbial growth at interfaces. *Advances in Colloid Interface Science* 1986, Vol. 25, No. 1, pp. 59–86.
22. K. CZACZYK: Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Postępy Mikrobiologii* 2004, vol. 43, nr 3, ss. 267–283.
23. H.M. RIJNAARTS, W. NORDE, E.J. BOUWER, J. LYKLEMA, J.B. ZEHNDER: Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, Vol. 59, pp. 3255–3265.
24. T.-T. Le THI, C. PRIGENT-COMBARET, C. DOREL, P. LEJEUNE: First stages of biofilm formation: Characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Methods in Enzymology* 2001, Vol. 336, pp. 152–159.
25. S.L. PERCIVAL, S. MALIC, H. CRUZ, D.W. WILLIAMS: Introduction to biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine* 2011, Vol. 6, pp. 41–68.
26. H.-C. FLEMMING, J. WINGENDER: The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 2010, Vol. 8, pp. 623–633.
27. K. CZACZYK, K. MYSZKA: Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies* 2007, Vol. 16, No. 6, pp. 799–806.
28. H.P. GANDHI, R.M. RAY, R.M. PATEL: Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers* 1997, Vol. 34, pp. 323–327.
29. H.-C. FLEMMING, J. WINGENDER: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 2001, Vol. 43, pp. 1–8.
30. H.-C. FLEMMING, J. WINGENDER: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology* 2001, Vol. 43, pp. 9–16.
31. P. VANDEVIVERE, L. KIRCHMAN: Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, Vol. 59, pp. 3280–3286.
32. K. BARANOWSKA, A. RODZIEWICZ: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos* 2008, vol. 57, nr 1–2, ss. 29–38.
33. D. LÓPEZ, H. VLAMAKIS, R. KOLTER: Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010, 2, a000398.
34. J.D. BRYERS: Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, Vol. 100, pp. 1–18.
35. Y. LIU, J.-H. TAY: Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behavior of biofilms. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2001, Vol. 17, pp. 111–117.
36. I. STRUŻYCKA: Biofilm – współczesne spojrzenie na etiologię próchnicy. *Dental Forum* 2010, Vol. XXXVIII, nr 1, ss. 73–79.
37. Ł. ŁAWNICZAK, K. CZACZYK, M. OWSIANIAK, Ł. CHRZANOWSKI: Rola ramnolipidów w środowisku naturalnym. *Postępy Mikrobiologii* 2011, vol. 50, nr 1, ss. 17–30.
38. A. JAIN, Y. GUPTA, R. AGRAWAL, D.K. JAIN, P. KHARE: Biofilms – a microbial life perspective: A critical review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2007, Vol. 24, pp. 393–443.
39. P.E. KOLENBRANDER, R.N. ANDERSEN, D.S. BLEHERT, P.G. EGLAND, J.S. FOSTER, R.J. PALMER Jr.: Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, Vol. 66, No. 3, pp. 486–505.
40. A. JAYARAMAN, T.K. WOOD: Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2008, Vol. 10, pp. 145–167.
41. R. DANIELS, J. VANDERLEYDEN, J. MICHIELS: Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2004, Vol. 28, pp. 261–289.
42. T.R. de KIEVIT: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2009, No. 2, pp. 279–88.
43. K. MYSZKA, K. CZACZYK: Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online) 2010, vol. 64, ss. 582–589.
44. T. DANHORN, C. FUQUA: Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 2007, Vol. 61, pp. 401–422.
45. M.B. MILLER, B.L. BASSLER: Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 2001, Vol. 55, pp. 165–199.
46. D. STAŃKOWSKA, W. KACA: Systemy komunikacji międzykomórkowej bakterii Gram-ujemnych i ich znaczenie w ekspresji cech fenotypowych. *Postępy Mikrobiologii* 2005, vol. 44, nr 2, ss. 99–111.
47. I. STRUŻYCKA, I. STĘPIEŃ: Biofilm – nowy sposób rozumienia mikrobiologii. *Borgis – Nowa Stomatologia* 2009, nr 3, ss. 85–89.
48. M.E. TAGA, B.L. BASSLER: Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, Vol. 100, suppl. 2, pp. 14549–14554.
49. A. CAMILLI, B.L. BASSLER: Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006, Vol. 311, pp. 1113–1116.

50. J. KOŁODYŃSKI, S. JANKOWSKI: Systemy międzykomórkowej sygnalizacji u bakterii. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2005, vol. 14, nr 2, ss. 343–348.
51. M.J. FEDERLE, B.L. BASSLER: Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, Vol. 112, No. 9, pp. 1291–1299.
52. M. MNICHOWSKA-POLANOWSKA, M. KACZAŁA, S. GIEDRYŚ-KALEMBA: Charakterystyka biofilmu *Candida*. *Mikologia Lekarska* 2009, vol. 16, nr 3, ss. 159–164.
53. B. DOROCKA-BOBKOWSKA, K. KONOPKA: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dental and Medical Problems* 2003, vol. 40, nr 2, ss. 405–410.
54. B. DWORECKA-KASZAK: Czy grzyby plotkują? Signaling i quorum sensing – zjawiska warunkujące komunikację drobnoustrojów. *Mikologia Lekarska* 2008, vol. 15, nr 3, ss. 164–171.
55. R. CZAJKOWSKI, S. JAFRA: Enzymatyczna degradacja laktonów acylo-L-homoseryny i jej potencjalne wykorzystanie w biokontroli i hamowaniu rozwoju infekcji. *Biotechnologia* 2006, nr 2, ss. 49–64.
56. S.T. SUMMERFIELD: Ozonation and UV irradiation – an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering* 2003, Vol. 28, pp. 21–36.
57. K. CZACZYK, K. MYSZKA: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia* 2007, vol. 76, nr 1, ss. 40–52.
58. M.J. SCHLESINGER, J. MILTON: Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, Vol. 265, No. 21, pp. 2111–2114.
59. J.M. GHIGO: Natural conjugative plasmids induce bacterial film development. *Nature* 2001, Vol. 412, pp. 442–445.
60. A.P. ROBERTS, P. MULLANY, M. WILSON: Gene transfer in bacterial biofilms. *Methods in Enzymology* 2001, Vol. 336, pp. 60–65.
61. M. SIMOES, L.C. SIMOES, M.J. VIEIRA: A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 2010, Vol. 43, pp. 573–583.
62. E.P. KRYSIŃSKI, L.J. BROWN, T.J. MARCHISELLO: Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection* 1992, Vol. 55, pp. 246–251.
63. P. TENKE, B. KOVACS, M. JÄCKEL, E. NAGY: The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology* 2006, Vol. 24, No. 1, pp. 13–20.
64. P. DĘBICKA, M. LIPSKI, J. BUCZKOWSKA-RADLIŃSKA, M. TRUSIEWICZ: Biofilm w kanałach korzeniowych w świetle piśmiennictwa. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* 2008, vol. 54, nr 1, ss. 152–156.
65. M. KATSIKOGIANNI, Y.F. MISSIRLIS: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials* 2004, Vol. 8, pp. 37–57.
66. A.L. CLUTTERBUCK, E.J. WOODS, D.C. KNOTTENBELT, P.D. CLEGG, C.A. CICHRANE, S.L. PERCIVAL: Biofilms and their relevance to veterinary. *Veterinary Microbiology* 2007, Vol. 12, No. 1–2, pp. 1–17.
67. B. CWALINA: Biodeterioration of concrete. *Architecture Civil Engineering Environment* 2008, Vol. 1, No. 4, pp. 133–140.
68. L.H.G. MORTON, S.B. SURMAN: Biofilms in biodeterioration – A Review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1994, Vol. 34, No. 3–4, pp. 203–221.
69. A. HUQ, C.A. WHITEHOUSE, C.J. GRIM, M. ALAM, R.R. COLWELL: Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology* 2008, Vol. 19, No. 3, pp. 244–247.
70. S.R. PARK, W.G. MACKAY, D.C. REID: *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research* 2001, Vol. 35, No. 6, pp. 1624–1626.
71. M. ŁEBKOWSKA: Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 11–15.
72. P.J. OLLOS, P.M. HUCK, R.M. SLAWSON: Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems. *Journal American Water Works Association* 2003, Vol. 95, No. 1, pp. 87–97.
73. A. KOTOWSKI: Analiza hydrauliczna zjawisk wywołujących zmniejszenie przepływności rurociągów *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 1, ss. 27–32.
74. M. ŚWIDERSKA-BRÓŻ: Czynniki współdecydujące o potencjale powstawania i rozwoju biofilmu w systemach dystrybucji wody. *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 3, ss. 8–13.

Kolwzan, B. Analysis of Biofilms – Their Formation and Functioning. *Ochrona Srodowiska* 2011, Vol. 33, No. 4, pp. 3–14.

Abstract: Adhesion of bacterial cells to a diversity of surfaces is attributable primarily to the extracellular polymers produced by some microorganisms, and, additionaly, to such structures as fimbria and cilia. A mature biofilm is composed of many different microcolonies, where microbial cells are integrated with each other by an extracellular polymeric substance (EPS). An EPS consists of polysaccharides, proteins, nucleic acids, surfactants, lipids and water. The cells in the biofilm interior are highly specialized forms capable of fulfilling a variety of functions, and their properties differ noticeably from those of the free cells. The structure and organization of these specialized microbial clusters protect them against adverse external influences. Proper functioning of the biofilm is guaranteed by quorum sensing *via* signaling molecules that freely diffuse from one bacterium to another. Being active participants in various microbiological processes, biofilms have now become commonplace. They are largely to blame for heavy losses in a country's economy, and for the potential to spread infections that are difficult to treat. The colonization of a water-pipe network by a biofilm carries serious risk to public health. In conclusion, good knowledge of the biofilm structure, as well as the proper understanding of the mechanisms underlying the formation and functioning of a biofilm, is a requisite not only for upgrading the efficiency of a technological process conducted in the presence of a biofilm, but also for developing new and effective methods of biofilm degradation.

Keywords: Biofilm, microorganisms, extracellular polymeric substance (EPS), quorum sensing.