

1. Wprowadzenie. 2. Metody badań wielogatunkowych biofilmów. 3. Wielogatunkowy biofilm płytki nazębnej. 4. Wielogatunkowe biofilmy w wodzie. 5. Wielogatunkowe biofilmy w środowisku przemysłowym. 6. Wielogatunkowe biofilmy a rozwój zakażeń

How to gain and use knowledge about multi-species biofilms?

Abstract: Multi-species biofilms form in many natural settings: water, soil or even on dust particles in the air. These biofilms can be also found in the industrial water distribution systems, on surfaces of the metalworking fluids tanks, in food production plants, etc. Many chronic infections involve multi-species biofilms; moreover, commensal vaginal flora or dental plaque bacteria may create such complex microbial consortia. In order to study the composition of microbial community several molecular methods have to be employed; among them metagenomics and proteomics are the most promising. Confocal microscopy in conjunction with fluorescence in situ hybridization as well as the atomic force microscopy are both very useful techniques to study the three-dimensional structure of the mixed-species biofilms. However, many technical obstacles may occur with these consortia during experimentation, e.g., how to grow multi-species biofilms with high reproducibility regarding the quantitative composition of these communities, and whether it is possible to quantitate by assess the metabolic activity and virulence of particular species when grown together in multi-species biofilm. The knowledge of specific traits of multi-species biofilms may contribute to better understanding of the etiology of infectious diseases, increase the efficiency of energy production in microbial fuel cells and lower the cost of biofouling prevention.

1. Introduction. 2. Research methods in the multi-species biofilm studies. 3. Dental plaque multi-species biofilm. 4. Multi-species biofilms in water. 5. Multi-species biofilms in industrial environment. 6. Multi-species biofilms and the development of infections

Słowa kluczowe: wielogatunkowy biofilm, identyfikacja gatunków drobnoustrojów, metody molekularne

Key words: multi-species biofilm, microbial species identification, molecular methods

1. Wprowadzenie

Szeroko zakrojone badania biofilmów bakteryjnych i grzybiczych trwają już ponad 30 lat. Inicjatorem tych badań był profesor William C o s t e r t o n, który wraz ze swoim zespołem wykazał istotną rolę biofilmów bakteryjnych w zakażeniach człowieka i w środowisku [8]. Badania osiadłych populacji bakterii stosunkowo szybko zostały podjęte przez innych uczonych, zwłaszcza w mikrobiologii środowiska, a następnie w mikrobiologii klinicznej. W ich wyniku poznano trójwymiarową strukturę, mechanizmy powstawania, sposoby wzajemnej komunikacji drobnoustrojów, a także szczególne cechy fenotypowe biofilmów, takie jak ich zwiększona tolerancja na środki przeciwdrobnoustrojowe i wytwarzanie pozakomórkowej macierzy – EPS (extracellular polymeric substances). Badania biofilmów prowadzono na wielu modelach doświadczalnych, zarówno w warunkach laboratoryjnych *in vitro*, jak i z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych [33]. W przeważającej liczbie dotyczyły one biofilmów jednogatunkowych. Przegląd piśmiennictwa dokonany w maju 2012 r. w elektronicznej bazie ISI Web of Knowledge, (<https://apps.webofknowledge.com>) pokazał, że na ogólną liczbę 13 718 publikacji poświęconych badaniu własności biofilmów (w których tytule występuje słowo biofilm), jedynie 192, tj. 1,4%

stanowią doniesienia na temat biofilmów wielogatunkowych. Natomiast to właśnie te wielogatunkowe konsorcja stanowią najczęściej występującą w środowisku naturalnym i w organizmach wyższych postaci biofilmów [19]. Stąd w obecnie prowadzonych pracach doświadczalnych coraz częściej obiektem badań są biofilmy, w skład których wchodzi więcej niż jeden gatunek drobnoustrojów. Przykładami takich biofilmów są konsorcja drobnoustrojów występujące w zbiornikach wodnych, w glebie, na liściach roślin, w instalacjach przemysłowych, a także w organizmie człowieka w postaci mikroflory pochwy, jelita grubego lub płytki nazębnej. Wykorzystanie dostępnych narzędzi biologii molekularnej, w tym zwłaszcza metagenomiki, pozwala już na poznanie przybliżonego składu gatunkowego tych biofilmów. Szacunkowe wyliczenia wskazują, że jedynie 0,1–1% tych drobnoustrojów jest zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych na rutynowo stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej podłożach hodowlanych.

2. Metody badań wielogatunkowych biofilmów

Metody badania struktur biofilmów jedno- i wielogatunkowych nie różnią się istotnie pomiędzy sobą. Zarówno techniki mikroskopowe, takie jak skaningowa

* Autor korespondencyjny: e-mail: e.trafny@wihe.waw.pl

mikroskopia elektronowa, mikroskopia konfokalna i mikroskopia sił atomowych oraz techniki fizyczne, jak przykładowo mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera będą równie przydatne dla oceny wielkości mikrokolonii i stopnia adhezji drobnoustrojów do powierzchni w obu typach biofilmów [6]. Natomiast bardzo popularne i wykorzystywane na znaczną skalę metody badania biofilmów w formie mikropłytki z użyciem fioletu krystalicznego lub barwników fluorescencyjnych nie znajdują zastosowania w badaniach wielogatunkowych biofilmów ze względu na brak swoistości znaczników do poszczególnych gatunków drobnoustrojów. Wówczas jednym z rozwiązań może być mikroskopia konfokalna wykorzystana do obserwacji wielogatunkowych konglomeratów z wykorzystaniem techniki FISH (fluorescent in situ hybridization), w której oligonukleotydy sondy znakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi hybrydują z wybranymi fragmentami rybosomalnego RNA drobnoustrojów w sposób specyficzny. Techniki te umożliwiają analizę przestrzennych interakcji różnogatunkowych komórek bakterii lub grzybów [2, 15, 25].

Do analizy wielogatunkowych konsorcjów zaproponowano ostatnio modyfikację techniki FISH poprzez wprowadzenie sond PNA (peptide nucleic acid probes). Sondy PNA są to syntetyczne analogi DNA, które wiążą się z wybranymi sekwencjami RNA/DNA z wyższym powinowactwem, ponieważ ich wypadkowy ładunek elektryczny jest obojętny. Technika ta została z powodzeniem wykorzystana do obserwacji procesu tworzenia wielogatunkowego biofilmu przez *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*, w którym po 48 godzinach wzrostu komórki *E. coli* liczbowo dominowały ($2,1 \times 10^8$ komórek/cm²) nad *L. monocytogenes* ($6,8 \times 10^7$ komórek/cm²) i *S. enterica* ($1,4 \times 10^6$ komórek/cm²). Obserwacje prowadzone za pomocą PNA FISH i mikroskopii konfokalnej wykazały przestrzenne zróżnicowanie umiejscowienia bakterii z poszczególnych gatunków w obrębie biofilmu: pałeczki *E. coli* w postaci jednogatunkowej warstwy rosły w górnych warstwach biofilmu, natomiast biomasa przylegająca do substratu adhezji stanowił mieszany biofilm dwóch gatunków: *L. monocytogenes* i *S. enterica* [1].

W badaniach wielogatunkowych biofilmów odzwierciedlanie wzajemnych relacji ilościowych pomiędzy poszczególnymi gatunkami drobnoustrojów podczas niezależnych powtórzeń eksperymentów może być związane z pewnymi metodycznymi trudnościami, zwłaszcza w warunkach *in vivo*. Badania wielogatunkowych biofilmów na mysim modelu zakażonej rany wykazały ostatnio, że w prosta inokulacja rany za pomocą zawiesiny bakterii czterech gatunków, takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Finogoldia magna* nie prowadziła do zrównoważonego wzrostu tych gatunków w obrębie biofilmu. Pałeczki

P. aeruginosa całkowicie dominowały liczbowo (100% populacji) w biofilmie hodowanym w ciągu dwóch dni, nawet wówczas gdy w wyjściowym inokulum komórki tego gatunku stanowiły jedynie 1% liczby bakterii w zawieszynie. Obserwacje te wskazały na konieczność przeszczepu biofilmu czterech gatunków bakterii, który hodowano w probówkach laboratoryjnych na fragmentach polipropylenu na powierzchnię rany. Dopiero w takich warunkach możliwe było uzyskanie zrównoważonego rozwoju populacji czterech gatunków bakterii w ranie, chociaż wzajemne proporcje liczebne komórek tych bakterii ulegały zmianom, a liczebność *E. faecalis* zmniejszyła się wyraźnie (z 23,4 do 6,0%) po 12 dniach wzrostu biofilmu w zakażonej ranie [10].

Utrzymanie stałych proporcji gęstości komórek drobnoustrojów określonego gatunku w obrębie konsorcjum w zadanych warunkach przez dłuższy okres czasu może być też utrudnione ze względu na brak wiedzy na temat wzajemnych relacji pomiędzy gatunkami drobnoustrojów. Dotychczas nie wykonano badań mających na celu charakterystykę wielogatunkowych biofilmów, w skład których wchodziłyby drobnoustroje o zdefiniowanych typach wzajemnych oddziaływań, takich jak np. konkurencja lub komensalizm. Inną trudnością w hodowli wielogatunkowych biofilmów może być sposób pozyskiwania izolatów z próbek środowiskowych lub klinicznych. Już w trakcie izolacji bakterii z hodowli płynnych w namnażających pożywkach dokonywana jest wstępna selekcja klonów bakterii danego gatunku, prowadząc do wystąpienia zjawiska dryftu genetycznego. Namnażane są głównie te klony, które w probówce laboratoryjnej występują w postaci planktonowej, faworyzowana jest ponadto ekspresja genów kodujących produkty podstawowego metabolizmu bakterii przy jednoczesnej eliminacji klonów zjadliwych oraz tych, które przejawiają cechy pożądanego dla tworzenia wielogatunkowych biofilmów [9]. Stąd trudnym zadaniem może być pozyskanie powtarzalnych hodowli wielogatunkowych biofilmów z wykorzystaniem laboratoryjnych wzorcowych szczepów bakterii.

Hodowla wielogatunkowych biofilmów, w których bakterie różnych gatunków przylegały do siebie nawzajem powiodła się ostatnio w eksperymentach, w których zasiedlano siatkę polipropylenową, stosowaną w leczeniu przepuklin, za pomocą trzech gatunków bakterii: *S. aureus*, *E. faecalis* i *Enterobacter cloacae*. Szczepy te pozyskano bezpośrednio z fragmentów siatki polipropylenowej usuniętej pacjentowi z powodu ropnia. Po siedmiu dniach hodowli biofilmu na siatce *in vitro* stwierdzono, że *S. aureus* był dominującym liczbowo gatunkiem w biofilmach. Trójwymiarowa struktura biofilmu przypominała strukturę charakterystyczną dla jednogatunkowych biofilmów, z kanałami wodnymi łączącymi mikrokolonie. Mikrokolonie w obrębie badanego biofilmu utworzone były przez przylegające

do siebie gronkowce, enterokoki i komórki *Enterobacter*, co potwierdzono stosując technikę FISH i mikroskopię konfokalną. Natomiast wzajemne liczbowe proporcje komórek poszczególnych gatunków zmieniały się w czasie, pomimo, że polipropylenowa siatkę inokulowano zawiesiną trzech gatunków bakterii o tej samej gęstości 6×10^3 CFU/ml [36].

Na innym modelu, który miał odzwierciedlać *in vitro* warunki występujące w ranie, tzw. „colony-drip-flow reactor model”, w którym biofilmy hodowano na membranie, nie obserwowano wzajemnego przylegania do siebie bakterii z następujących gatunków: *S. aureus* (szczep MRSA), *P. aeruginosa* i *Clostridium perfringens* pomimo, że w mikroskopie obserwowano typową trójwymiarową strukturę biofilmu. Liczba komórek MRSA i *C. perfringens* wynosiła około 10^7 CFU/membranę, natomiast liczba pałeczek *P. aeruginosa* przewyższała liczbę pozostałych dwóch gatunków bakterii o trzy rzędy wielkości. Poszczególne gatunki bakterii tworzyły odrębne warstwy w przekroju biofilmów [41].

Metody hodowlane są obecnie jeszcze niezastąpione przy ocenie ilościowej liczby bakterii różnorodnych gatunków w obrębie biofilmów. Metody molekularne, poza jedną – reakcją PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) nie pozwalają na rzetelną ocenę wzajemnych stosunków ilościowych poszczególnych jednostek taksonomicznych w obrębie biofilmów. Natomiast wykonanie ilościowej analizy składu gatunkowego złożonej populacji z użyciem RT-PCR jest zadaniem praktycznie niewykonalnym ze względu na wymagany znaczny nakład pracy. Zatem ilościowe badania składu gatunkowego biofilmów ograniczają się praktycznie do badania bakterii i grzybów dających się hodować na pożywkach laboratoryjnych [34]. Należy też uwzględnić fakt, że badania jakościowe z użyciem technik molekularnych są obciążone pewnym błędem wynikającym z stosowania w metodzie PCR i wszelkich jej odmianach starterów o sekwencjach zaczerpniętych z baz danych, w których gromadzone są najczęściej sekwencje DNA i RNA tych gatunków drobnoustrojów, które możliwe są do namnażania w laboratorium.

3. Wielogatunkowy biofilm płytki nazębnej

Skład wielogatunkowego biofilmu jamy ustnej jest charakterystyczny dla każdego człowieka. Jednostki taksonomiczne drobnoustrojów wchodzące w skład biofilmów jamy ustnej zostały już stosunkowo dobrze poznane. Wiedza ta została pozyskana z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, których zastosowanie wydaje się być kluczowe dla badań tych konsorcjów. Techniki te pozwalają na wykrycie drobnoustrojów żywych lecz nie dających się hodować na bogatych w składniki odżywcze podłożach, stosowanych w labo-

ratoriach mikrobiologicznych. Ponadto wprowadzenie oligonukleotydowych fragmentów DNA do genomu bakterii w określonych pozycjach umożliwiło uzyskanie fluorescencyjnego sygnału – GFP (green fluorescent protein), wówczas gdy badany gen ulega ekspresji. Technika ta wraz z transkryptomiką i proteomiką przyczyniła się do uzyskania wstępnych danych na temat interakcji i procesów metabolicznych zachodzących w złożonych konsorcjach drobnoustrojów [29, 40].

W skład biofilmów jamy ustnej wchodzi około ponad 600 różnych jednostek taksonomicznych bakterii, z których około 65,5% stanowią gatunki, które mogą być hodowane w laboratorium (De whirst [11], <http://www.homd.org>). Pozostałe jednostki taksonomiczne poznano dzięki analizie sekwencji ich DNA. Wiele z tych drobnoustrojów występuje jedynie w jamie ustnej, np. zaliczane do rodzaju TM7 [3]. Skład gatunkowy biofilmów nawet u jednego człowieka różni się w zależności od miejsca ich występowania w jamie ustnej. W jednym biofilmie może współistnieć około 100 gatunków bakterii właściwych dla danego osobnika. Jedną z istotnych technik biologii molekularnej, która umożliwiła poznanie różnorodności genetycznej bakterii w biofilmach jamy ustnej była technika RCCH (reverse-capture checkerboard hybridization), polegająca na amplifikacji fragmentów genów kodujących 16S rRNA, znakowanych digoksygeniną z całej populacji drobnoustrojów badanego biofilmu i następnie poddanie ich hybrydyzacji z oligonukleotydami komplementarnymi do wszystkich znanych sekwencji rDNA w formie mikromacierzy [28, 31]. W wyniku analizy sekwencji genów 16S rRNA amplifikowanych z użyciem uniwersalnych starterów F24/Y36 stwierdzono, że podstawowymi typami (phylum) bakterii w biofilmach są *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria*, do których należy 96% gatunków bakterii. Pozostałe 4% jednostek taksonomicznych należy do typów *Euryarchaeota*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, SR1, *Synergistetes*, *Tenericutes* i TM7 [11].

Bakterie różnych gatunków w obrębie tych biofilmów wchodzi z sobą w złożone interakcje, przykładowo mogą to być oddziaływania synergistyczne lub współzawodnictwo, bez których gęstość bakterii poszczególnych gatunków w dojrzałym biofilmie byłaby jedynie wypadkową szybkości podziałów komórkowych bakterii poszczególnych gatunków [37]. Wśród bakterii wchodzących w skład biofilmów jamy ustnej wyróżnia się gatunki tzw. wczesnych i późnych kolonizatorów. Do gatunków wczesnych kolonizatorów zalicza się paciorkowce, oraz bakterie z rodzajów *Eikenella*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Propionibacterium* i *Veillonella*. Późnymi kolonizatorami są bakterie z następujących rodzajów *Eubacterium*, *Treponema* oraz *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* [5].

Gatunki wczesnych kolonizatorów, występujące na powierzchni szkliwa w niewielkiej liczbie, tworzą już wielogatunkowy biofilm [26]. Próchnica zębów jest wynikiem metabolicznych procesów biofilmu płytki nazębnej, które zaburzyły równowagę mineralną powierzchni zęba, na której rosną drobnoustroje. Natomiast choroby przyzębia powstają na skutek wielorakich interakcji złożonego wielogatunkowego biofilmu z tkankami gospodarza, co prowadzi do utrwalenia stanu przewlekłej infekcji. Dla poznania patomechanizmów tkanek przyzębia zakażenia istotne będzie poznanie przestrzenno-czasowego występowania poszczególnych gatunków zarówno hodowlanych, jak i niehodowlanych bakterii wielogatunkowego biofilmu płytki nazębnej. Już jest wiadomym, że komunikacja pomiędzy gatunkami bakterii zachodząca w obrębie tych biofilmów za pomocą cząsteczek autoinduktora-2 (AI-2), który jest wykrywany i/lub syntetyzowany przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie, jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju biofilmów jamy ustnej [35]. Niemniej istotna w rozwoju choroby jest odpowiedź gospodarza na obecność biofilmów w jamie ustnej, w postaci aktywowania mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej. Poznanie tych złożonych interakcji przybliży możliwość zwalczania przewlekłych infekcji w jamie ustnej [30].

4. Wielogatunkowe biofilmy w wodzie

Innym przykładem stosunkowo dobrze poznanych wielogatunkowych biofilmów są konsorcja występujące w wodzie, w warunkach niskich stężeń składników odżywczych. Dla monitorowania składu gatunkowego tych biofilmów przydatne są metody określania różnorodności mikrobiologicznej ekosystemów, takie jak DGGE, czyli elektroforeza w żelu z użyciem czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis) i TRFLP, czyli polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (terminal restriction fragment length polymorphism). Metoda DGGE polega na amplifikacji fragmentów DNA z użyciem starterów bogatych w pary GC oraz ich analizie za pomocą elektroforezy w żelu o zwiększającym się stężeniu czynnika denaturującego. Liczba pozyskanych prążków świadczy o stopniu różnorodności badanego środowiska. Podobnie w metodzie TRFLP przedmiotem badań są amplicony pozyskane z wykorzystaniem specyficznych starterów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Analizie poddaje się pozycję miejsca restrykcyjnego najbliższego w stosunku do końca amplifikowanego fragmentu genu. Wynikiem takiej analizy jest charakterystyczny „odcisk palca” (fingerprint) badanej populacji drobnoustrojów. Techniki te z powodzeniem są też stosowane dla oceny różnorodności mikrobiologicznej środowiska gleby [14]. Wyniki przeprowa-

dzonych ostatnio badań z wykorzystaniem tych metod wykazały wysoką zmienność sezonową i dynamikę wymiany gatunków w obrębie biofilmów występujących w rzekach [39].

Inne badania przeprowadzone z wykorzystaniem metody DGGE pozwoliły na ocenę szybkości i wydajności powstawania wielogatunkowego biofilmu na różnych materiałach wykorzystywanych do dystrybucji wody pitnej w systemach miejskich i pokazały, że największa różnorodność gatunkowa występuje w obrębie biofilmów powstałych na powierzchni rur stalowych w tych instalacjach. Ogółem pozyskano 176 kolonii bakterii, rosnących na podłożu R2A, spośród których 66% zaliczono do *Proteobacteria*, 20% nie zaklasyfikowano do żadnej jednostki taksonomicznej, 6% stanowiły *Actinobacteria*, 2% laseczki z rodzaju *Bacillus*, natomiast 6% drobnoustrojów nie oznaczono. Wśród *Proteobacteria* dominującym gatunkiem były pałeczki z rodzaju *Sphingomonas* [21]. Z perspektywy zdrowia publicznego istotnym zagadnieniem jest wzrost pałeczek *Legionella* w wielogatunkowych biofilmach w systemach dystrybucji wody. Pałeczka ta przejawia zdolność do bytowania w biofilmach, wykorzystując produkty rozpadu bakterii innych gatunków jako składniki odżywcze. Jednakże wiele badań wskazuje na to, że w obrębie wielogatunkowych biofilmów drobnoustrojów ten nie namnaża się ze względu na brak dostępności L-cysteiny w odpowiednich stężeniach. Wydajne namnażanie pałeczek *Legionella* zachodzi wewnątrz komórek ameb z rodzajów *Naegleria*, *Acanthamoeba* i *Hartmannella*, które też bytują w obrębie biofilmów w środowisku wodnym [38]. Ostatnio wykazano, że w biofilmach występujących w systemach wody pitnej, oczyszczanej metodą filtracji membranowej, dochodzi do zwiększenia udziału patogennych pałeczek z rodzaju *Legionella* i *Chromobacterium* w wielogatunkowych biofilmach [27].

5. Wielogatunkowe biofilmy w środowisku przemysłowym

Wielogatunkowe biofilmy występują też w wielu instalacjach przemysłowych. W procesach przemysłowych, które są lub w najbliższej przyszłości będą wykorzystywane w praktyce w browarnictwie, bioremediacji i energetyce, podczas wytwarzania energii w mikrobiologicznych ogniach paliwowych, wzrost drobnoustrojów w postaci wielogatunkowych biofilmów przyspiesza bądź zwiększa wydajność pożądaných procesów technologicznych i może przynieść wyraźne korzyści ekonomiczne. Jednakże w innych gałęziach przemysłu, takich jak przemysł spożywczy, farmaceutyczny i maszynowy występowanie biofilmów przynosi wyraźne straty ekonomiczne i powoduje trudności w utrzymaniu odpowiedniej higieny środowiska pracy a także wydajnego

przebiegu procesów technologicznych, których istotnymi elementami są systemy dystrybucji wody [24].

W przemyśle maszynowym biofilmy występujące na ściankach zbiorników, na opiłkach metali, w wanienkach tokarek i szlifierek przyczyniają się do skażenia płynów chłodząco-smarujących wykorzystywanych podczas obróbki metali i w znacznym stopniu wpływają na pogorszenie jakości wytwarzanych wyrobów metalowych. Stwarzają też poprzez swoją tolerancję na biocydy wyraźne zagrożenie dla zdrowia pracowników tej gałęzi przemysłu, ponieważ umożliwiają przetrwanie osiadłych populacji bakterii podczas zabiegów mycia i konserwacji maszyn, a następnie ponowne namnożenie się drobnoustrojów, w tym wielu gatunków chorobotwórczych bakterii do wysokiej gęstości (10^7 – 10^8 CFU/ml) w płynnych chłodziwach. Chłodziwa te w procesie obróbki metali rozpraszane są w postaci mgły olejowej, bioaerozolu, który umożliwia wnikanie drobnoustrojów lub produktów ich rozpadu (LPS, kwasy tejchojowe) do dróg oddechowych, stanowiąc przez to bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia pracowników. W biofilmach rosnących w układach chłodziw zaobserwowano ciekawe zjawisko ograniczonej różnorodności gatunkowej, nawet wówczas gdy badania prowadzono za pomocą technik metagenomiki. Dominującymi gatunkami w tych konsorcjach są pałeczki z rodziny *Pseudomonaceae*, wraz z innymi pałeczkami Gram-ujemnymi, takimi jak *Shewanella putrefaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Comamonas testosteroni*, *Morganella morganii* i *Citrobacter freundii* [17]. Niepokojącym zjawiskiem jest występowanie w obrębie tych wielogatunkowych konsorcjów w zbiornikach chłodziw niektórych gatunków prątków szybko rosnących, takich jak: *M. immunogenum*, *M. chelonae/M. abscessus* i *M. diernhoferi*. Prątki te nawet w hodowli planktonowej przejawiają oporność na biocydy, która wyraźnie zwiększa się podczas wzrostu tych drobnoustrojów w postaci biofilmu [23]. Wówczas, ich wysoka tolerancja na środki bójcze prowadzi do liczbowej dominacji tych bakterii w wielogatunkowych biofilmach zbiorników i instalacji dystrybucji chłodziw, w których stosowano biocydy uwalniające formaldehyd jako środek przeciwbakteryjny. Dotychczas opisano już 27 wybuchów epidemicznych alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych (hypersensitivity pneumonitis) w zakładach przemysłowych, w których z chłodziw pozyskano metodami hodowlanymi lub wykryto w nich za pomocą technik molekularnych obecność tych prątków [4].

Natomiast nie zawsze wielogatunkowe biofilmy bytujące w środowisku przemysłowym wiążą się ze zjawiskami niekorzystnymi dla człowieka ze względów ekonomicznych lub zdrowotnych. Ogromne nadzieje na pozyskanie alternatywnych źródeł energii wzbudzają ostatnio badania naukowe podjęte w celu pozyskania mikrobiologicznych ogniw paliwowych, w których zarówno anodę jak i katodę stanowić będą konsorcja

bakterii, wielogatunkowe biofilmy, ściśle zdefiniowane gatunkowo [20]. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe działają na zasadzie przekształcania energii chemicznej zawartej w związkach organicznych (np. odpadach przemysłowych, morskich osadach dennych) w energię elektryczną przy udziale złożonych konsorcjów bakterii [13]. Na powierzchni anod, które instalowano w morskich osadach dennych występowały w przeważającej liczbie przedstawiciele następujących grup bakterii: *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Rhizobiales* i *Clostridia*. Większość z tych drobnoustrojów identyfikowano za pomocą technik molekularnych. Podjęto szereg badań zmierzających do izolacji gatunków bakterii, które w jednogatunkowym biofilmie, po odpowiednich modyfikacjach genetycznych, w sposób o wiele wydajniejszy niż wielogatunkowe konsorcja uczestniczyłyby w wytwarzaniu energii na powierzchni. Wyniki badań porównawczych wydajności obu rodzajów biofilmów; jedno- i wielogatunkowych nie są jednoznaczne, choć już teraz wielu autorów podkreśla, że znajomość wzajemnych interakcji pomiędzy drobnoustrojami jest konieczna dla efektywnego wykorzystania potencjału wielogatunkowych biofilmów w procesie wytwarzania energii. Właśnie dla aplikacji wiedzy o biofilmach w „energetyce przyszłości” bardzo istotne jest pozyskanie wiedzy o powtarzalnym procesie rozwoju wielogatunkowych biofilmów o odpowiednich proporcjach liczbowych komórek drobnoustrojów, wchodzących w skład tych biofilmów [18]. Porównano wydajność wytwarzania prądu przez pięć gatunków bakterii, takich jak *Geobacter sulfurreducens*, *P. aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Clostridium acetobutylicum* i *E. faecium* rosnących w jednogatunkowych biofilmach lub w wielogatunkowym biofilmie pałeczek Gram-ujemnych i *E. faecium* rosnących na powierzchni anody w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym i stwierdzono, że najwyższą wydajność miał biofilm wielogatunkowy. Może być to uwarunkowane zdolnością bakterii Gram-dodatnich do wykorzystywania mediatorów (nośników elektronów) wytwarzanych przez *P. aeruginosa* lub też aktywnym udziałem systemu quorum sensing w tym procesie [32].

6. Wielogatunkowe biofilmy a rozwój zakażeń

Badania występujących w jamach ciała i tkankach człowieka wielogatunkowych biofilmów, aczkolwiek jeszcze nieliczne, już weryfikują akceptowane szeroko poglądy na patogenezę niektórych zakażeń. Opisano ostatnio doświadczenia, w których hodowano biofilmy *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *S. gordonii* i *S. sanguinis in vitro* na modelu nabłonka jamy ustnej. Modelowa tkanka nabłonkowa złożona była z dwóch typów komórek: keratynocytów linii OKF6/TERT-2 hodowanych wraz z rosnącymi na kolagenie typu I

fibroblastach linii 3T3, które hodowano w ciągu 2–3 tygodni. Na powierzchni tak przygotowanej tkanki, przypominającej nabłonek wielowarstwowy płaski (stratified squamous epithelia) inokulowano zawieszone w pobranej od ochotników ślinie komórki *C. albicans* o gęstości 10^6 CFU/ml i *S. oralis* o gęstości 10^7 CFU/ml, w ciągu 30 min. przy przepływie o średniej prędkości 100 μ l/min. Czas hodowli biofilmów wynosił maksymalnie 24 godziny. Wyniki tych eksperymentów pokazały, że w obecności *C. albicans* paciorkowce tworzą wydajniej biofilm niż podczas wzrostu w postaci jednogatunkowego biofilmu. Jednocześnie ich obecność indukuje proces inwazji tkanki nabłonkowej przez strzępki grzyba. Zgodnie z opinią autorów obserwacje te przeczą akceptowanemu dotychczas pogładowi, że obecność komensalnych bakterii zapobiega rozwojowi kandydozy w jamie ustnej [12].

Inne badania dwugatunkowych biofilmów bezotoczkowego szczepu *Haemophilus influenzae* (NTHi) i szczepu *Streptococcus pneumoniae*, pozyskanych od chorego z przewlekłym zapaleniem nosogardła podważyły pogląd o wzajemnej konkurencji pomiędzy tymi dwoma gatunkami bakterii w drogach oddechowych człowieka. Wyniki tych badań sugerują, że wzajemne oddziaływanie obu tych gatunków obrębie biofilmu wzmagają ekspresję genu *pilA*, kodującego pilinę, białko fimbrii typu IV, odpowiedzialne u szczepów NTHi za przyleganie do nabłonka. W dwugatunkowym biofilmie dochodzi też do wzmoczenia syntezy oksydazy pirogromianu, która u pneumokoków warunkuje wytwarzanie nadtlenku wodoru. W tych warunkach wzrostu dochodzi także do zahamowania ekspresji genów *ply* i *pavA*, kodujących u pneumokoków odpowiednio pneumolysinę i adhezynę A (pneumococcal adherence factor A). Obserwacje te mogą stanowić wsparcie hipotezy o występowaniu zjawiska populacyjnej wirulencji w złożonych konsorcjach drobnoustrojów w trakcie przebiegu przewlekłych zakażeń [7]. Po raz pierwszy hipotezę o możliwości indukcji lub supresji wirulencji w wielogatunkowych biofilmach wysunuli Jenkinson i Lamont [22], omawiając rolę złożonych konsorcjów drobnoustrojów w zdrowiu i podczas zakażeń jamy ustnej. Hipoteza ta jest obecnie weryfikowana zarówno w odniesieniu do patogenów zwierzęcych i człowieka, jak i patogenów roślin [16].

8. Podsumowanie

Techniki molekularne, takie jak sekwencjonowanie oraz analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych lub amplikonów DNA pozyskanych techniką PCR umożliwiają obecnie poznanie podstawowych jednostek taksonomicznych drobnoustrojów wchodzących w skład wielogatunkowych biofilmów. Jednakże metody te

pozwalają jedynie na ocenę jakościową, a nie ilościową tych złożonych konsorcjów drobnoustrojów. Metody mikroskopowe, a zwłaszcza mikroskopia konfokalna w połączeniu z techniką FISH umożliwia poznanie trójwymiarowych struktur wielogatunkowych biofilmów, a także umiejscowienia poszczególnych gatunków w obrębie mikrokolonii lub biofilmów typu „colony blot”. Obecnie w stosunkowo najmniejszym stopniu poznane są wzajemne oddziaływania drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach. Związane jest to ze złożonością analiz chemicznych, biochemicznych lub immunochemicznych, koniecznych do monitorowania całkowitej aktywności metabolicznej tych złożonych konsorcjów. Z tego też względu, choć fakt występowania licznych wzajemnych oddziaływań pomiędzy komórkami bakterii w wielogatunkowych biofilmach uważa się za dobrze udokumentowany, to nadal ocena udziału poszczególnych gatunków bakterii, a zwłaszcza sposobów regulacji określonych szlaków metabolicznych, które mogą prowadzić do większej zjadliwości drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach stanowi wyzwanie dla uczonych prowadzących badania tych złożonych konsorcjów. Badania te są kluczowe dla wyjaśnienia wielu zjawisk zachodzących w środowisku, przemyśle a także podczas rozwoju przewlekłych i nawracających zakażeń, które w znacznym odsetku przebiegają z udziałem wielogatunkowych biofilmów.

Piśmiennictwo

- Almeida C., Azevedo N.F., Santos S., Keevil C.W., Vieira M.J.: Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One*, **6**, e14786 (2011)
- Amann R., Fuchs B.M.: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 339–348 (2008)
- Brinig M.M., Lepp P.W., Ouverney C.C., Armitage G.C., Relman D.A.: Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1687–1694 (2003)
- Burton C.M., Crook B., Scaife H., Evans G.S., Barber C.M.: Systematic review of respiratory outbreaks associated with exposure to water-based metalworking fluids. *Ann. Occup. Hyg.* **56**, 374–388 (2012)
- ten Cate J.M.: Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, **94**, 1–9 (2006)
- Coenye T., Nelis H.J.: In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, **83**, 89–105 (2010)
- Cope E.K., Leid J.G. i wsp.: Regulation of virulence gene expression resulting from *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae* interactions in chronic disease. *PLoS One*, **6**, e28523 (2011)
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J.: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 435–64 (1987)
- Costerton J.W.: The biofilm primer. Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, 2007

10. Dalton T., Dowd S.E., Wolcott R.D., Sun Y., Watters C., Griswold J.A., Rumbaugh K.P.: An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One*, **6**, e27317 (2011)
11. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G.: The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* **192**, 5002–5017 (2010)
12. Diaz P.I., Xie Z., Sobue T., Thompson A., Biyikoglu B., Ricker A., Ikononou L., Dongari-Bagtzoglou A.: Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. *Infect. Immun.* **80**, 620–632 (2012)
13. Franks A.E., Malvankar N., Nevin K.P.: Bacterial biofilms: the powerhouse of a microbial fuel cell. *Biofuels*, **1**, 589–604 (2010)
14. Fraç M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
15. Fröjd V., Chávez de Paz L., Andersson M., Wennerberg A., Davies J.R., Svensäter G.: In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. *Mol. Oral Microbiol.* **26**, 241–252 (2011)
16. Galiana E., Marais A., Mura C., Industri B., Arbiol G., Ponchet M.: Ecosystem screening approach for pathogen-associated microorganisms affecting host disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6069–6075 (2011)
17. Gilbert Y., Veillette M., Duchaine C.: Metalworking fluids biodiversity characterization. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 437–449 (2010)
18. Greenman J., Ieropoulos J., Melhuish C.: Microbial fuel cells – scalability and their use in robotics. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I. *Modern Aspects Electrochem.* **52**, 239–290 (2011)
19. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
20. He Z., Angenent L.T.: Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis*, **18**, 2009–2015 (2006)
21. Jang H.J., Choi Y.J., Ka J.O.: Effects of diverse water pipe materials on bacterial communities and water quality in the annular reactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 115–123 (2011)
22. Jenkinson H.F., Lamont R.J.: Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* **13**, 589–595 (2005)
23. Kapoor R., Yadav J.S.: Expanding the mycobacterial diversity of metalworking fluids (MWFs): evidence showing MWF colonization by *Mycobacterium abscessus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 392–399 (2012)
24. Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B., Biggs C.A.: „Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1869–1881 (2011)
25. Klug B., Rodler C., Koller M., Wimmer G., Kessler H.H., Grube M., Santigli E.: Oral biofilm analysis of palatal expanders by fluorescence in-situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *J. Vis. Exp.* **20**, pii: 2967 (2011)
26. Kolenbrander P.E.: Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int. J. Oral Sci.* **3**, 49–54 (2011)
27. Kwon S., Moon E., Kim T.S., Hong S., Park H.D.: Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant. *Microbes Environ.* **26**, 149–155 (2011)
28. Lima K.C., Coelho L.T., Pinheiro I.V., Rôças I.N., Siqueira J.F. Jr.: Microbiota of dental caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.* **45**, 21–30 (2011)
29. Nicolle O., Rouillon A., Guyodo H., Tamanai-Shacoori Z., Chandad F., Meuric V., Bonnaure-Mallet M.: Development of SNAP-tag-mediated live cell labeling as an alternative to GFP in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 357–363 (2010)
30. Palmer R.J., Darveau R., Lamont R.J., Nyvad B., Teles R.P.: Human oral bacterial biofilms: composition, dynamics, and pathogenesis. (w) Biofilm infections, red. T. Bjarnsholt, C. Moser, P.Ø. Jensen, N. Høiby, Springer, New York 2010, str. 35–68
31. Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E.: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* **2000**, **42**, 80–87 (2006)
32. Read S.T., Dutta P., Bond P.L., Keller J., Rabaey K.: Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *BMC Microbiol.* **1**, 98 (2010)
33. Rumbaugh K.P., Carty N.L.: In vivo models of biofilm infection. (w) Biofilm infections, red. T. Bjarnsholt, C. Moser, P.Ø. Jensen, N. Høiby, Springer, New York 2010, str. 267–290
34. Qian P.Y., Lau S.C., Dahms H.U., Dobretsov S., Harder T.: Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol. (NY)*, **9**, 399–410 (2007)
35. Saenz G.C., Rao D., Underwood A., Belapure S.A., Campagna S.R., Sun Z., Tammariello S., Rickard A.H.: Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiology*, mic.0.057182-0, doi:10.1099/mic.0.057182-0 (2012)
36. Stoodley P., Sidhu S., Nistico L., Mather M., Boucek A., Hall-Stoodley L., Kathju S.: Kinetics and morphology of polymicrobial biofilm formation on polypropylene mesh. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* w druku (2012)
37. Trafny E.A.: Wzajemne interakcje drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach. *Forum Zakazeń*, **3**, 13–17 (2012).
38. Taylor M., Ross K., Bentham R.: *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol.* **58**, 538–547 (2009)
39. Wey J.K., Jürgens K., Weitere M.: Seasonal and successional influences on bacterial community composition exceed that of protozoan grazing in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2013–2024 (2012)
40. Williamson K.S., Richards L.A., Perez-Osorio A.C., Pitts B., McInnerney K., Stewart P.S., Franklin M.J.: Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J. Bacteriol.* **194**, 2062–2073 (2012)
41. Woods J., Boegli L., Kirker K.R., Agostinho A.M., Durch A.M., de Lancey Pulcini E., Stewart P.S., James G.A.: Development and application of a polymicrobial, in vitro, wound biofilm model. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 998–1006 (2012)