



Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne

Katarzyna Czaczyk, Kamila Myszka

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Mechanisms determining bacterial biofilm resistance to antimicrobial factors

Summary

Bacterial biofilm resistance is a very serious problem of modern medicine and industry practice. Microorganisms forming biofilm initiate multilevel resistance mechanisms that protect cells against antibacterial substances. This resistance is higher than antibiotics and disinfectants tolerance of planktonic bacteria. Ineffective of antibacterial compounds action on biofilm depends on biofilm structure, slowing down the antibiotics diffusion speed, environmental factors in which biofilm is formed, the presence of capsule of bacteria and the activity of "efflux pumps" proteins. The process of signal molecules formation by bacteria and releasing them to the medium is also very relevant aspect. In this paper, the changes in the molecular level that induces bacterial biofilm resistance against antimicrobial agents are also described.

Key words:

biofilm, adhesion, antimicrobial resistance, efflux pumps, quorum sensing.

Adres do korespondencji

Katarzyna Czaczyk,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza
im. A. Cieszkowskiego,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
kasiacz@owl.au.poznan.pl

1. Wstęp

Drobnoustroje występujące w różnych środowiskach wykształciły mechanizmy osiadania na powierzchniach abiotycznych i biologicznych. Taka forma bytowania stwarza im możliwość łatwiejszego dostępu do składników odżywczych, a także chroni komórki przed niekorzystnym wpływem czynników środowiskowych. Uzdolnienia adhezyjne mikroorganizmów wpływają na

stopień ich inwazyjności oraz zdolności do wywoływania zakażeń, są przyczyną próchnicy i paradontozy, mogą także decydować o rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych, zwłaszcza w warunkach szpitalnych (1-3). W przemyśle spożywczym, przywieranie bakterii do powierzchni kontaktujących się z żywnością, może powodować skażenie drobnoustrojami powodującymi zepsucie lub chorobotwórczymi (4).

Mikroorganizmy ulegające adhezji do powierzchni tworzą trwałe, cienkie warstewki nazywane błonami biologicznymi lub biofilmami. Obecnie biofilmy są definiowane jako złożone wielokomórkowe struktury bakterii otoczone warstwą substancji organicznych i nieorganicznych, produkowanych przez te drobnoustroje, wykazujące adhezję zarówno do powierzchni biologicznych jak i abiotycznych. Tworzenie biofilmów jest odpowiedzią drobnoustrojów na warunki środowiska, umożliwia ich rozwój i przeżycie (4,5). Charakterystyczną cechą fenotypową komórek bakteryjnych żyjących w środowisku biofilmu – cechą, która zwróciła uwagę naukowców na te populacje drobnoustrojów, jest ich oporność na większość obecnie dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Komórki mikroorganizmów stanowiące część biofilmu, są blisko 1000 razy bardziej odporne na działanie substancji toksycznych (środki dezynfekujące, antybiotyki, surfaktanty) niż te pozostające w zawiesinie (6-8). Dotychczas dostępne środki przeciwbakteryjne mogą wykazywać niższą aktywność w stosunku do odmiennych fenotypowo osiadłych bakterii, ponieważ dobierane były i wdrażane do produkcji na podstawie stwierdzenia ich wysokiej aktywności wobec planktonowych populacji bakterii, m.in. w oparciu na wartościach klasycznych wskaźników – minimalnego stężenia hamującego – MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) oraz minimalnego stężenia bakterioobójczego – MBC (ang. *minimal bactericidal concentration*).

Zjawisko tworzenia się biofilmu bakteryjnego na powierzchniach abiotycznych jest bezpośrednią przyczyną aż 65% występujących zakażeń u hospitalizowanych pacjentów, których koszt leczenia przekracza rocznie miliard dolarów (9). Problem powszechności oraz wysokiej oporności komórek drobnoustrojów, tworzących błony biologiczne, zainicjował poszukiwania skutecznych metod zwalczających i zapobiegających temu zjawisku.

2. Struktura biofilmu

Dojrzała postać biofilmu składa się z dużej liczby mikrokolonii, oddzielonych od siebie siecią kanalików, przez które dostarczane są składniki pokarmowe i usuwane produkty przemiany materii. System ten funkcjonuje jednak dobrze tylko na obrzeżach biofilmu. W głębszych jego warstwach skupiska bakterii, połączone substancjami pozakomórkowymi, utrudniają jego prawidłowe działanie. Ponadto mikroorganizmy wchodzące w skład błon biologicznych wytwarzają cząsteczki sygnałowe pozwalające im na komunikowanie się i tworzenie kolonii o skomplikowanej struk-

turze i różnorodnych funkcjach. W ten sposób biofilm zaczyna być postrzegany jako prymitywny organizm wielokomórkowy (3,10).

Struktura błon bakteryjnych powoduje nie tylko wolniejszą dyfuzję biocydów przez matrix biofilmu, ale także utrudnia dotarcie czynników toksycznych do głębszych warstw błony biologicznej. Kinetyka dyfuzji związków przeciwdrobnoustrojowych, o względnej masie cząsteczkowej wynoszącej około 100 kDa, przez warstwy dojrzałego biofilmu może osiągać wartość niższą nawet o 60-80% w porównaniu z dyfuzją tych substancji przez agregaty komórek zawieszonych w płynie hodowlanym (11,12). Ponadto drobnoustroje pozostające w zawieszynie są narażone na kontakt z substancjami toksycznymi na całej powierzchni komórki, podczas gdy dla komórek tworzących biofilm, powierzchnia ta jest tylko częściowo dostępna dla bezpośredniej penetracji. Spowolnioną penetrację cząsteczek chloru przez biofilm *Pseudomonas aeruginosa*/*Klebsiella pneumoniae* wykazał de Beer i wsp. (11). Suci i wsp. (13) badając efektywność bakteriobójczą ciprofloksacyny na biofilm *Pseudomonas aeruginosa* odnotowali 20% redukcję tempa penetracji antybiotyku przez warstwy błony biologicznej.

Darouiche i wsp. (14) wykazali natomiast, że pomimo obecności vankomycyny w głębszych warstwach biofilmu *Staphylococcus epidermis*, w ilości przekraczającej minimalne stężenie bójcze antybiotyku, nie obserwuje się spadku aktywności metabolicznej badanych drobnoustrojów. Zdaniem autorów wysoka oporność komórek *Staphylococcus epidermis* na działanie vankomycyny nie jest efektem wolniejszej dyfuzji antybiotyku przez warstwy biofilmu, lecz wynika z redukcji, bądź nawet utraty bójczego działania zastosowanego antybiotyku. Anderl i wsp. (15) badając efektywność penetracji ampiciliny oraz ciprofloksacyny przez biofilm *Klebsiella pneumoniae* również odnotowali brak dyfuzji ampiciliny przez matrix biofilmu. Było to spowodowane syntezą przez badane drobnoustroje enzymu β -laktamazy. Ciprofloksacyna z kolei, pomimo swobodnej dyfuzji przez warstwy dojrzałej błony biologicznej *Klebsiella pneumoniae*, stopniowo traciła swą bakteriobójczą aktywność (15). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wskazuje się zatem na istnienie innych, metabolicznych mechanizmów warunkujących oporność drobnoustrojów w biofilmie na czynniki toksyczne.

3. Rola otoczek komórkowych

Zewnętrzna powierzchnia ściany komórkowej wielu bakterii pokryta jest warstwą substancji o różnym składzie chemicznym, zwaną otoczką lub śluzem. Zdolność do syntezy określonych substancji otoczkowych jest uwarunkowana genetycznie, a skład chemiczny otoczek różni się w zależności od rodzaju czy gatunku, a niekiedy nawet w obrębie gatunku. Synteza otoczek jest zazwyczaj uzależniona od dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu bakterii, obecności tlenu czy fazy wzrostu drobnoustrojów. Większość otoczek składa się z polisacharydów,

które oprócz glukozy zawierają aminocukry, ramnozę, kwasy uronowe i kwas pirogronowy czy octowy. Otoczki niektórych gatunków składają się z polipeptydów lub mogą mieć strukturę złożoną, białkowo-cukrową czy cukrowo-lipidową. U drobnoustrojów chorobotwórczych otoczki występują w postaci fibrylli wielocukrowych, które wiążą się z polimerem kwasu teichojowego (u bakterii gramododatnich) lub częścią cukrową cząsteczek lipopolisacharydu (LPS) (u bakterii gramujemnych) (16,17).

Warstwy zewnątrzkomórkowe są barierą przepuszczalności do powierzchni komórek, chronią je przed fagocytozą i wysychaniem, mogą wiązać jony metali ciężkich lub kationy niezbędne komórce do metabolizmu (18). Zewnętrzna powierzchnia ściany komórkowej drobnoustrojów odgrywa również istotną rolę w procesach adhezji komórek do powierzchni stałych i obniża tempo dyfuzji środków przeciwdrobnoustrojowych przez warstwy biofilmu (12,16).

Materiał otoczki jako integralna część biofilmu bakteryjnego chroni komórki przed bezpośrednim wpływem środków bakteriobójczych. Struktura oraz właściwości zewnątrzkomórkowych otoczek tych samych gatunków bakterii, tworzących biofilm lub pozostających w zawieszynie, istotnie różni się (19). Różnice dotyczą przede wszystkim komponentów polisacharydowych otoczek. Gen *algC*, stymulujący syntezę zewnątrzkomórkowego alginianu komórek *Pseudomonas aeruginosa*, uaktywnia się tylko w procesie tworzenia błony biologicznej na płaszczyźnie stałej. Zjawisko to występuje już po 15 minutach od momentu osadzenia się badanych drobnoustrojów na powierzchni abiotycznej (20). Synteza alginianu jest induktorem wzrostu hydrofilowych właściwości zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej *Pseudomonas aeruginosa*, co wyraźnie opóźnia penetrację hydrofobowych czynników bakteriobójczych przez warstwy biofilmu (20-22). Gordon i wsp. (23) zaobserwowali, że wzmożona synteza cząsteczek alginianu o wypadkowym, ujemnym ładunku elektrycznym, wyraźnie spowalnia dyfuzję przez warstwy biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* dodatnio naładowanych cząstek antybiotyków aminoglikozydowych (tj. streptomycyny i gentamycyny). Hentzer i wsp. (24) wykazali, że również nadprodukcja zewnątrzkomórkowego alginianu obniża wrażliwość biofilmu *Pseudomonas* spp. na działanie tobramycyny.

Ponadto wzrost udziału polisacharydowych komponentów w otoczce zwiększa liczbę wolnych grup funkcyjnych, co również determinuje wysoką oporność mikroorganizmów w biofilmie. Oporność ta dotyczy przede wszystkim wpływu cząsteczek biocydów, kationowych antybiotyków czy przeciwdrobnoustrojowych peptydów na komórki bakteryjne (19). Reaktywne grupy funkcyjne egzopolisacharydów łącząc się z zastosowanymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, zapobiegają przenikaniu czynników toksycznych do cytoplazmy. Adsorpcja środków bakteriobójczych na powierzchni komórek tworzących biofilm nie jest jednak zjawiskiem stałym. Długotrwałe oddziaływanie na biofilm mikrobiologiczny środkami przeciwdrobnoustrojowymi, prowadzi do zmniejszenia roli otoczek bakteryjnych w zjawisku oporności. Jest to spowodowane stopniowym brakiem w łańcuchach egzopolisacharydów bakteryjnych wolnych grup funkcyjnych (12).

4. Pompy bakteryjne

Oporność komórek bakteryjnych na środki antymikrobiologiczne coraz częściej tłumaczona jest także aktywnością białek o właściwościach pomp (ang. *efflux proteins*; *pumps*). Białka te u bakterii gramujemnych rozpoznają np. różnego typu antybiotyki i usuwają je z cytoplazmy. Proces ten odgrywa główną rolę w oporności bakterii na tetracyklinę, fluorochinolony, makrolity i β -laktamy. Pompy bakteryjne są zaliczane do jednej z pięciu klas, zwanych też superrodzinami (ang. *superfamilies*), klasyfikowanych na podstawie liczby segmentów transmembranowych oraz źródła pozyskiwania energii (25). Są to: MFS (ang. *major facilitator superfamily*), transportery kasetonowe ABC, czyli tzw. wielobiałkowe systemy transportu (ATP, ang. *binding cassette*), SMR (ang. *small multidrug resistance*), RND (ang. *resistance-nodulation-division*) oraz MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*). Białka należące do rodziny: MFS, SMR oraz RND wykorzystują energię z pompy protonowej (PMF, ang. *proton motive force*). Transportery kasetonowe ABC pozyskują energię na drodze hydrolizy ATP (w tym przypadku przekazywanie energii odbywa się za pośrednictwem domeny złożonej z około 215 aminokwasów, która warunkuje przyłączenie się i hydrolizę cząsteczek ATP) (25,26).

Rodzina MFS obejmuje białka posiadające 12 (podrodzina 12-TSM) oraz 14 (podrodzina 14-TMS) segmentów transmembranowych. Do 12-segmentowych transporterów należą białka warunkujące oporność biofilmów *Bacillus subtilis* czy *Staphylococcus aureus* na tetracykliny, bromek etydyny czy akryflawiny (27). Białka podrodziny 14-TMS obniżają wrażliwość komórek *Staphylococcus aureus* i *Mycobacterium* spp. na działanie IV-rzędowych związków amoniowych (28).

Do rodziny SMR transporterów błonowych należą białka o 4 lub 10 segmentach transmembranowych. Białka te odpowiedzialne są za czynne usuwanie środków dezynfekcyjnych, w tym IV-rzędowych soli amoniowych, z wnętrza komórek *Enterobacteriaceae* tworzących biofilm na powierzchniach stałych (29). Za zwiększony poziom oporności komórek bakteryjnych na środki dezynfekcyjne odpowiadają przede wszystkim produkty duplikacji genu *ebr*, który łącznie z ekspresją genów: *smr*, *gacC* oraz *gacD*, koduje zmiany fenotypowe tych drobnoustrojów (30).

Pompy typu RND, występujące wyłącznie u bakterii gramujemnych, zawierają trójskładnikowe systemy białek z 12. segmentami transmembranowymi o bardzo szerokim zakresie substratowym. W przeciwieństwie do pomp pozostałych klas, rodzina RND warunkuje najefektywniejsze usuwanie antybiotyków i innych chemioterapeutyków, detergentów, rozpuszczalników oraz inhibitorów metabolizmu komórek bakteryjnych (29). W procesie aktywnego usuwania środków przeciwdrobnoustrojowych z wnętrza komórek tworzących biofilm, uczestniczy system trzech białek. Do tego systemu należą molekuly transportujące związki przez błonę cytoplazmatyczną komórek, molekuly transportujące związki w przestrzeni peryplazmatycznej i molekuly tworzące kanał w zewnętrznej błonie drobnoustrojów, którym ostatecznie związek jest usuwany poza komórkę (31). Do transporterów takich na-

leżą np. białka ArcB/ArcA/TolC czy Melb/MexA/OprM (32). Podobne działanie wykazują także pompy typu MATE (33,34).

Oporność komórek *Escherichia coli* na działanie erytromycyny warunkowana jest obecnością białek należących do rodziny transporterów kasetonowych ABC. Erytromycyna jest słabą zasadą i staje się słabiej zjonizowana w miarę wzrostu pH środowiska (35). Forma niezjonizowana antybiotyku znacznie łatwiej penetruje przez błonę zewnętrzną drobnoustrojów. Dotarcie antybiotyku do wnętrza komórek uaktywnia proces, odpowiadający czterem stanom konformacyjnym kompleksu HisQMP₂. Kompleks HisQMP₂ złożony jest z dwóch podjednostek transbłonowych HisQ i HisM oraz z dwóch podjednostek HisP. Zmiany przestrzenne HisQMP₂ umożliwiają całkowite otwarcie kanału transbłonowego i efektywne usunięcie antybiotyku z wnętrza komórek (26,33).

Synteza białek o właściwościach pomp indukowana jest oddziaływaniem na komórki subletalnych dawek środków przeciwdrobnoustrojowych. W biofilmie *Escherichia coli* produkcja pomp bakteryjnych warunkowana jest wiekiem populacji i rozpoczynała się po osiągnięciu przez poszczególne warstwy komórek stacjonarnej fazy wzrostu (36). Działanie tych białek ma wpływ na zdolności adaptacyjne komórek bakteryjnych do niekorzystnych warunków, np. obecności rozpuszczalników organicznych w środowisku ich wzrostu. Mikroorganizmy na skutek zwiększania swoich wymiarów, zmniejszają stosunek powierzchni komórki do objętości (powierzchnia względna), co determinuje mniejszą adsorpcję składników pokarmowych przez jednostkę powierzchni (37). Wraz ze zmniejszaniem się powierzchni względnej drobnoustrojów może wzrastać efektywność działania pomp błonowych (38). Przy ograniczonej dostępności substancji pokarmowych w środowisku hodowlanym obserwowana jest sytuacja odwrotna – komórki zmniejszają swoje wymiary, co powoduje zwiększenie ich względnej powierzchni i ułatwia pobór i konsumpcję składników odżywczych w tych warunkach wzrostu (38,39). Przy założeniu, że komórki tworzące biofilm nie zmieniają swojej objętości, ale za to znacząco ograniczona jest powierzchnia wymiany różnych substancji, drastycznie będzie malała ich powierzchnia względna, przez co efektywność działania *efflux pumps* (szczególnie białek należących do rodziny transporterów kasetonowych ABC) musi być naprawdę duża i substancje toksyczne będą szybko usuwane z komórki (26,40).

5. Warunki wzrostu (czynniki środowiskowe)

Komórki pozostające w głębszych warstwach biofilmu mają mniej składników odżywczych i tlenu, zmieniają swoją fizjologię, zmniejszając tempo wzrostu i przechodząc w stan zbliżony do anabiozy. Wykazują wtedy zmniejszoną wrażliwość na działanie substancji toksycznych (12). W kontrolowanych warunkach wzrostu komórki tworzące biofilm i komórki w zawiesinie wykazują zwiększoną oporność na środki antymikrobiologiczne w miarę zaawansowania hodowli (faza wzrostu). Wol-

niejszy wzrost lub nawet jego brak, chroni komórki przed działaniem substancji antimikrobiologicznych (9). Działanie bakteriobójcze antybiotyków polega głównie na modyfikacji szlaków biosyntezy poszczególnych składników ściany komórkowej i błony protoplazmatycznej bakterii (35). W dojrzałych postaciach biofilmów, których komórki osiągnęły stacjonarną fazę wzrostu, a zatem są mniej aktywne metabolicznie, działanie bakteriobójcze antybiotyku staje się nieefektywne. Tanaka i wsp. (41), badając stopień wrażliwości biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na β -laktamowe antybiotyki, potwierdzili te zależności. W przeprowadzonych eksperymentach oporność komórek *Pseudomonas aeruginosa* na zastosowane antybiotyki, wzrosła po osiągnięciu przez mikroorganizmy stacjonarnej fazy wzrostu (41). Brooun i wsp. (42) zaobserwowali również wpływ zredukowanego tempa wzrostu komórek na oporność biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na tetracyklinę. W przeprowadzonych doświadczeniach nie odnotowano natomiast wpływu zmniejszonego tempa wzrostu drobnoustrojów na oporność na tobramycynę (42). Na podstawie przedstawionych wyników można zatem przypuszczać, że komórki w biofilmie, osiągając stan zbliżony do anabiozy, nie nabywają trwałej oporności na wszystkie czynniki przeciwdrobnoustrojowe. Obserwowana oporność komórek, znajdujących się w fazie spowolnionego wzrostu lub fazy stacjonarnej, związana jest raczej z opóźnionym działaniem na drobnoustroje pewnych środków bakteriobójczych.

Aktywność metaboliczna drobnoustrojów w poszczególnych warstwach biofilmu determinowana jest także zróżnicowaną podażą tlenu (19). Komórki z różnych warstw błony biologicznej, odznaczają się zatem odmienną wrażliwością na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych. Za wysoką oporność mikroorganizmów, występujących w głębszych częściach biofilmu, gdzie praktycznie panują warunki beztlenowe, odpowiada synteza wysokocząsteczkowych białek, których funkcje nie zostały dotychczas wyjaśnione (22). Walters i wsp. (43) także wykazali, że oporność biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na działanie ciprofloksacyny oraz tobramycyny zwiększała się wraz z ograniczeniem dostępności do komórek tlenu.

Oporność biofilmu bakteryjnego wzrasta także w miarę upływu czasu. Podczas „starzenia się” biofilmu przyłączone komórki rosną, namnażając się tworząc wielowarstwową populację, która utrudnia przenikanie substancji toksycznych. LeChevallier i wsp. (44) wykazali, że 7-dniowy biofilm jest bardziej odporny na chlorowanie niż 2-dniowy, rosnący w tych samych warunkach. Podobne obserwacje poczynili Lee i Frank (45), którzy opisują wzrost oporności komórek tworzących 8-dniowy biofilm na IV-rzędowe sole amoniowe jako efekt tworzenia mikrokolonii, które nie były obecne po 4 h.

Spośród innych czynników środowiskowych, determinujących wysoką oporność komórek bakteryjnych na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowych, istotną rolę odgrywa rodzaj powierzchni, na której wytworzona została błona biologiczna. Taką zależność zaobserwowali Krysiński i wsp. (46), badając wrażliwość biofilmu *Listeria monocytogenes* na działanie różnych czynników antimikrobiologicznych. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że biofilm *Listeria monocytogenes* łatwiej

jest inaktywować i usunąć z powierzchni stalowych niż z powierzchni tworzyw sztucznych (polistyren, poliuretan). Podczas zastosowania mikroskopii skaningowej nie wykazano znaczących różnic w topografii i nie wyjaśniono tego zjawiska.

6. *Quorum sensing*

Quorum sensing to zjawisko chemicznego „komunikowania się” drobnoustrojów, polegające na wytwarzaniu i wydzielaniu do otoczenia molekuł sygnałowych (autoinduktorów), które wykorzystywane są w różnych procesach fizjologicznych, m.in. w tworzeniu biofilmu. Wzrost stężenia autoinduktorów jest funkcją liczby komórek. „Porozumiewanie się” mikroorganizmów może zachodzić między komórkami jednego gatunku lub różnych gatunków. Natura chemiczna sygnałów, mechanizmy ich działania, oraz geny kontrolujące *quorum sensing* różnią się w każdym przypadku (47).

Wyróżnia się dwie grupy systemów komunikacji bakterii gramdodatnich i gramujemnych. Drobnoustroje gramdodatnie komunikują się za pośrednictwem molekuł białkowych, wykorzystując dwuelementowy system detekcji i odpowiedzi na obecność autoinduktora. Proces przekazywania sygnału opiera się na kaskadzie reakcji: fosforylacji i defosforylacji. W początkowym etapie, komunikacji komórek wzrasta ilość autoinduktora białkowego proporcjonalnie do wzrostu gęstości mikroorganizmów. Następnie białko to jest rozpoznawane przez transbłonową kinazę białkową, która w kontakcie z ligandem ulega procesowi fosforylacji, zapoczątkowując tym samym kaskadę przemian kończących się ufosforylowaniem białka regulatorowego. Następnie ufosforylowane białko regulatorowe wiąże się z odpowiednim odcinkiem DNA, inicjując tym samym transkrypcję genów docelowych (47,48).

Drobnoustroje gramujemne komunikują się za pośrednictwem niskocząsteczkowych acetylowanych laktonów homoseryny (acyl-HSL, ang. *acylated homoserine lactones*), syntaz autoinduktora LuxI oraz rodziny białkowych regulatorów transkrypcyjnych LuxR (49). Białko z rodziny LuxR jest czynnikiem zależnym od cząsteczki acyl-HSL. N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego białka LuxR rozpoznaje i wiąże się specyficznie z acyl-HSL. W ten sposób LuxR może oddziaływać z sekwencją promotorową operonu, co prowadzi do transkrypcji genów docelowych (50,51). Cząsteczki LuxI uczestniczą w szlaku biosyntezy laktonów homoseryny (52). Autoinduktory acyl-HSL w strukturze biofilmu swobodnie dyfundują z jednej komórki do drugiej (53). Ze względu na odległości jakie musi pokonać cząsteczka sygnałowa w biofilmie, system komunikacji międzykomórkowej jest o wiele bardziej prawdopodobny niż w populacjach bakterii pozostających w zawiesinie. Zjawisko to zostało potwierdzone w błonach biologicznych, utworzonych przez następujące rodzaje mikroorganizmów: *Yersinia* spp., *Serratia* spp., *Vibrio* spp., *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. oraz *Aeromonas* spp. (54).

Przekazywanie i odbiór sygnałów może być użyteczny w różnicowaniu się komórek w biofilmie. Rola *quorum sensing* w oporności komórek tworzących biofilm na środki antymikrobiologiczne nie została dotychczas dokładnie wyjaśniona. Davis i wsp. (55) wykazali, że mutanty *Pseudomonas aeruginosa*, zdolne do wytwarzania substancji sygnałowych, nie tworzą biofilmu o normalnej strukturze. Są także bardziej wrażliwe na działanie SDS (siarczan dodecyłu sodu). Podobne obserwacje poczynili także Hastett i wsp. (56), którzy wykazali większą wrażliwość mutantów *Pseudomonas aeruginosa* na stężenie 50 mM H₂O₂ (woda utleniona) w stosunku do szczepów dzikich, nie wykazujących zjawiska *quorum sensing*. Brooun i wsp. (42) nie stwierdzili natomiast różnic w oporności komórek *Pseudomonas aeruginosa* tworzących biofilm, na SDS, ofloxacynę i tobramycynę, bez względu na ich zdolności do komunikowania się. Jednakże autorzy tych badań sugerowali, że może to być zależne od rodzaju powierzchni na której osadzają się drobnoustroje.

7. Zmiany na poziomie molekularnym

Drobnoustroje tworzące biofilm, zmieniając swój metabolizm i ekspresję materiału genetycznego, stają się wysoce odporne na działanie różnorodnych środków antymikrobiologicznych. Zjawisko to dotyczy również komórek potomnych, uwalnianych z biofilmu do środowiska zewnętrznego (57). Zastosowanie metod biologii molekularnej, polegających m.in. na wykrywaniu specyficznego mRNA metodą RT PCR czy identyfikacji komórkowego rRNA techniką hybrydyzacji *in situ*, dostarczyło nowych informacji o zmianach na poziomie molekularnym, zachodzących w komórkach mikroorganizmów tworzących biofilm (57,58).

Drobnoustroje, tworzące błony biologiczne, uruchamiają różnorodne mechanizmy genetyczne, które umożliwiają eliminację wpływu na komórki środków przeciwdrobnoustrojowych lub reperację powstałych w komórkach uszkodzeń. Może to być mechanizm konstytutywny, który związany jest z ekspresją odpowiednich genów, lub mechanizm indukcyjny, inicjowany obecnością czynnika antymikrobiologicznego. Odpowiedzi adaptacyjne biofilmów są kontrolowane w głównej mierze przez czynniki transkrypcyjne sigma (σ , RpoS), które uaktywniają się po osiągnięciu przez drobnoustroje stacjonarnej fazy wzrostu. Czynniki σ jest tą częścią transkryptazy, która ma zdolność specyficznego wiązania się z DNA. W biofilmie *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* regulacja inicjacji transkrypcji z udziałem czynnika σ umożliwia wytworzenie białek uodparniających populację komórek na działanie antybiotyków (59,60).

W badaniach przeprowadzonych przez Xu i wsp. (60) wykazano wzmożoną ekspresję 1% analizowanych genów biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Geny te kodowały białka, uczestniczące w procesach translacji, transportu cząsteczek przez zewnętrzne struktury komórek oraz w procesach sekrecji. Produkty ekspresji tych genów bezpośrednio determinowały wysoką oporność biofilmu *Pseudomonas spp.* na dzia-

łanie biocydów i innych środków przeciwdrobnoustrojowych (60). Parkins i wsp. (61) wykazali, że oporność populacji *Pseudomonas aeruginosa* na działanie tobramycyny warunkowana jest także przez produkty ekspresji genu *gacA*. Uszkodzenie tego genu uniemożliwiło tworzenie się dojrzałej matrycy biofilmu bakteryjnego na powierzchni stałej i tym samym wyraźnie zwiększyło wrażliwość badanych drobnoustrojów na działanie antybiotyku.

W osiadłych populacjach drobnoustrojów następuje również aktywacja genów, których produkty ekspresji neutralizują działanie bójcze cząsteczek antybiotyków oraz substancji dezynfekujących (19). W gramdodatnich komórkach (głównie *Enterococcus* spp.) tworzących biofilm, aktywowany jest gen *tolA*, który obniża stopień powinowactwa antybiotyków aminoglikozydowych do receptorów dla Ca^{2+} i Mg^{2+} , zlokalizowanych w lipopolisacharydach otoczki komórkowej. Na skutek braku możliwości wiązania się aminoglikozydów z lipopolisacharydami osłony bakteryjnej, gen *tolA* skutecznie zabezpiecza błonę protoplazmatyczną komórek przed uszkodzeniem przez antybiotyki (35).

W komórkach bakteryjnych tworzących błonę biologiczną aktywowane są także geny odpowiedzialne za syntezę enzymów rozkładających wolno dyfundujące substancje antymikrobiologiczne (21). Przypuszcza się, że enzymy te także modyfikują budowę i tym samym właściwości przeciwdrobnoustrojowe różnych substancji (12). Przyleganie komórek *Pseudomonas aeruginosa* do powierzchni stałych powoduje de-represję genów warunkujących syntezę β -laktamaz, które kumulowane są w wysokich stężeniach w śluzie otaczającym komórki. β -laktamazy, degradują cząsteczki antybiotyków, zanim przenikną one do błony zewnętrznej komórek *Pseudomonas aeruginosa* (62).

Whiteley i wsp. (63) wykazali, że długotrwałe oddziaływanie na biofilm *Pseudomonas aeruginosa* tobramycyny, zmieniło stopień ekspresji dodatkowych 20 genów. Oprócz genów pomp bakteryjnych, aktywowane były geny *dnaK* oraz *groES*, których produkty ekspresji inaktywowały działanie tobramycyny na komórki (63). Podobne zależności zaobserwował Anwar i wsp. (64) oraz Vergeers i Blaser (65) badając oporność biofilmu *Staphylococcus* spp. na tobramycynę, cefaleksynę i amikacynę.

Długotrwała ekspozycja biofilmów drobnoustrojowych na wysokie stężenia antybiotyków, może być induktorem punktowych mutacji genów, których produkty ekspresji podnoszą poziom oporności komórek. Długotrwałe oddziaływanie piperacyliny na biofilm *Streptococcus pneumoniae* spowodowało wystąpienie punktowej mutacji w genie *cpoA* kodującym białko, wykazujące homologię do glikozylotransferaz (66). Produkt ekspresji genu *cpoA* jest wymagany podczas biosyntezy kwasu tejchojowego, występującego w ścianie komórkowej *Streptococcus pneumoniae* (67). Mutacja genu *cpoA* doprowadziła do modyfikacji syntezy cząsteczki kwasu tejchojowego, co skutecznie zabezpieczyło powierzchniowe struktury badanego biofilmu na działanie antybiotyków (67).

Różnice w elektroforetycznych profilach białek drobnoustrojów tworzących na powierzchniach stałych biofilm oraz komórek pozostających w zawiesinie, są rezul-

tatem różnej podaży substancji pokarmowych. Komórki znajdujące się w głębszych warstwach biofilmu, gdzie dociera mniej składników pokarmowych, dążą do minimalizacji wydatku energetycznego, związanego z biosyntezą białka (67). Nie oznacza to jednak całkowitego zahamowania ekspresji materiału genetycznego u tych mikroorganizmów. Drobnoustroje tworzące błonę biologiczną, syntetyzują *de novo* specyficzne białka, których obecność w komórkach warunkuje oporność biofilmu na działanie szeregu czynników antybakteryjnych (8). Whiteley i wsp. (63) zaobserwowali wzmożoną syntezę ponad 50% z 800 analizowanych białek dojrzałej matrycy biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Syntetyzowane białka przez komórki badanej błony biologicznej warunkowały oporność przede wszystkim na oksydacyjne uszkodzenia (63).

8. Podsumowanie

Oporność biofilmów bakteryjnych na działanie chemioterapeutyków czy powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych, stanowi poważny problem współczesnej medycyny i praktyki przemysłowej. Żyjąc w skupiskach, drobnoustroje wykształcają wielopłaszczyznowe mechanizmy obrony przed degradacyjnym wpływem na komórki substancji antymikrobiologicznych. Wytwarzanie cząsteczek sygnałowych umożliwia komórkom komunikowanie się i tworzenie kolonii wysoce opornych na działanie biocydów. Struktura błon biologicznych powoduje nie tylko wolniejszą dyfuzję środków antymikrobiologicznych przez matrix biofilmu, ale także utrudnia dotarcie czynników toksycznych do komórek zlokalizowanych w głębszych warstwach biofilmu. Problem wysokiej oporności błon biologicznych na działanie substancji antymikrobiologicznych związany jest także ze specyfiką zmian metabolicznych i genetycznych, indukowanych fazą wzrostu komórek współtworzących biofilm. Do tych przemian zalicza się przede wszystkim biosyntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów, białek enzymatycznych oraz białek *efflux pumps*.

Nieustannie poszukuje się nowych możliwości zapobiegania zjawisku tworzenia się biofilmu oraz leczenia zakażeń, wywołanych przez wysoce odporne drobnoustroje. Opracowanie nowej generacji antybiotyków czy środków dezynfekcyjnych, może nie zapewnić długotrwałego efektu. Problem oporności biofilmów bakteryjnych prędzej czy później będzie również dotyczył nowych substancji antymikrobiologicznych. Jedyną, skuteczną strategią jest lepsze zrozumienie natury składników komórkowych i ich funkcji w oporności na biocydy bakterii pozostających w biofilmie.

Literatura

1. Cunliffe D., Smart C. A., Alexander C., Vulfson E. N., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11), 4995-5002.
2. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P., (2002), *Trends Microbiol.*, 10(5), 238-245.

3. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., (1999), *Science*, 284, 1318-1322.
4. Bower C. K., McGuire J., Daeschel M. A., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 152-157.
5. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Krober D. R., Lappin-Scott H. M., (1995), *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 711-745.
6. Nickel J. C., Ruseska I., Wright J. B., Costerton J. W., (1985), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, 619-624.
7. Frank J. F., Koffi R. A., (1990), *J. Food Protect.*, 53, 550-554.
8. Trafny E. A., (2000), *Post. Mikrobiol.*, 39, 55-71.
9. Mah T. C., O'Toole G. A., (2001), *Trends Microbiol.*, 9, 34-39.
10. Kaprelyants A. S., Kell D. B., (1996), *Trends Microbiol.*, 4(6), 237-242.
11. de Beer D., Srinivasan R., Stewart P. S., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4339-4344.
12. Stewart P. S., (2002), *Int. J. Med. Microbiol.*, 292, 107-113.
13. Suci P. A., Mittelman M. W., Yu F. P., Geesey G. G., (1994), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 2125-2133.
14. Darouiche R. O., Dhir A., Miller A. J., Landon G. C., Raad I. I., Musher D. M., (1994), *J. Infect. Dis.*, 170, 720-723.
15. Anderl J. N., Franklin M. J., Stewart P. S., (2000), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 1818-1824.
16. Libudzisz Z., Kowal K., (2000), *Mikrobiologia techniczna*, 88-90, Wyd. PŁ, Łódź.
17. Markiewicz Z., (1993), *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, 220-228, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
18. Nicklin J., Graeme-Cook K., Killington R., (2004), *Mikrobiologia – krótkie wykłady*, 89-90, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
19. Drenkard E., (2003), *Microb. Inf.*, 5, 1213-1219.
20. Davies D. G., Geesey G. G., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 860-867.
21. Nichols W. W., Dorrington S. M., Slack M. P. E., Walmsley H. L., (1988), *Antimicrob. Mol. Microbiol.*, 40, 1215-1226.
22. Sauer K., Camper A. K., (2001), *J. Bacteriol.*, 183, 6579-6589.
23. Gordon C. A., Hodges N. A., Marriott C., (1988), *J. Antimicrob. Chemother.*, 22, 670-674.
24. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givkov M., Parsek M. R., (2001), *J. Bacteriol.*, 183, 5395-5401.
25. Levy S. B., (1992), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 695-703.
26. Adamek-Świerczyńska S., (2001), *Post. Biol. Komórki Suppl.*, 28(16), 229-242.
27. Neyfakh A. A., (1992), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 484-495.
28. Palusen I. T., Brown M. H., Skurray R. A., (1996), *Microbiol. Rev.*, 60, 575-608.
29. Nikaido H., (1998), *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 516-523.
30. Sasatsu M., Shibata Y., Noguchi N., Kono M., (1992), *FEMS Microbiol. Lett.*, 93, 109-114.
31. Nikaido H., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 5853-5859.
32. Fernandes P., Ferreira B. S., Cabral J. M. S., (2003), *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 22, 211-216.
33. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A., (2001), *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*, 126, 158-160, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
34. Kumar A., Schweizer H. P., (2005), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1486-1513.
35. Dzierżanowska D., (2000), *Antybiotykoterapia praktyczna*, 73-96, Wyd. α-medica Press, Bielsko-Biała.
36. Ma D., Alberti M., Lynch C., Nikaido H., Hearst J. E., (1996), *Mol. Microbiol.*, 19, 101-112.
37. Koch A. L., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 317-348.
38. Neuman G., Veeranagouda Y., Karegoudar T. B., Sahin Ö., Mäusezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Heipieper H. J., (2005), *Extremophil.*, 9, 163-168.
39. Myszka K., Czaczyk K., (2006), *Post. Mikrob.*, (w druku).
40. Paulsen I. T., (2003), *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 446-451.
41. Tanaka G., Shigeta M., Komatsuzawa H., Sugai M., Suginaka H., Usui T., (1999), *Chemotherapy*, 45, 28-36.
42. Brooun A., Liu S., Lewis K., (2000), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 640-646.
43. Walters III M. C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M. J., Stewart P. S., (2003), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 317-323.

44. LeChevallier M. W., Cawthon C. D., Lee R. G., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 649-654.
45. Lee S. H., Frank J. F., (1991), *J. Food Protect.*, 54, 4-6.
46. Krysiński E. P., Brown L. J., Marchisello T. J., (1992), *J. Food Protect.*, 55, 246-251.
47. Dunny G. M., Leonard B. A., (1997), *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 527-564.
48. de Saizieu A., Gardes C., Flint N., Wagner C., Kamber M., Mitchell T. J., Keck W., Amrein K. E., Lange R., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 4696-4703.
49. Fuqua C., Winans S. C., Greenberg E. P., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 727-751.
50. Finney A. H., Blick R. J., Murakami K., Ishihama A., Stevens A. M., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 4520-4528.
51. Horng Y. T., Deng S. C., Daykin M., Soo P. C., Wei J.R., Luh K. T., Ho S. W., Swift S., Lai H. C., Williams P., (2002), *Mol. Microbiol.*, 45, 1655-1671.
52. Jiang Y. M., Camara S. R., Chhabra K. R., Hardie B. W., Bycroft A., Lazdunski G. P., Salmond G. S., Williams P. S., (1998), *Mol. Microbiol.*, 28, 193-203.
53. Lawrence J. R., Krober D. R., Hoyle B. D., Costerton J. W., Caldwell D. E., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 6558-6567.
54. Eberl L., (1999), *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 493-506.
55. Davis D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P., (1998), *Science*, 280, 295-298.
56. Hassett D. J., Ma J. F., Elkins J. G., McDermott T. R., Ochsner U. A., West S. E., Huang C. T., Fredericks J., Burnett S., Stewart P. S., McFeters G., Passador L., Iglewski B. H., (1999), *Mol. Microbiol.*, 34, 1082-1093.
57. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H., (1995), *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
58. Dahm H., Strzelczyk E., (2004), *Post. Mikrob.*, 43, 251-265.
59. Hengge-Aronis R., (2002), *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 4, 341-346.
60. Xu K. D., Franklin M. J., Park C.-H., McFeters G. A., Stewart P. S., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 199, 67-71.
61. Parkins M. D., Ceri H., Storey D. G., (2001), *Mol. Microbiol.*, 40, 1215-1226.
62. Gilbert P., Brown M. R. W., (1998), *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, 571-578.
63. Whiteley M., Banger M. G., Bumgarner E. R., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S., Greenberg E. P., (2001), *Nature*, 413, 860-864.
64. Anwar H., Strap J. L., Costerson J. W., (1992), *Can. J. Microbiol.*, 38, 618-625.
65. Vergeres P., Blaser L., (1992), *J. Infect. Dis.*, 165, 281-289.
66. Guenzi E., Gasc A.-M., Sicard M. A., Hakenbeck R., (1994), *Mol. Microbiol.*, 12, 505-515.
67. Grebe T., Paik J., Hakenbeck R., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 3342-3349.