

Mikrobiální biofilmy

1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén

Bakterie v přírodních populacích jeví zřetelnou tendenci přisedat k nejrůznějším povrchům – existence v biofilmu je pro ně z mnoha důvodů výhodnějším a ve většině prostředí také základním způsobem přirozeného výskytu. Za biofilm lze označit přisedlé společenstvo mikroorganismů charakterizované tím, že buňky, které jsou nevratně přichyceny k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěné v matrici extracelulárních polymerních látek produkovaných těmito buňkami. Tyto buňky dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů. Ačkoli převládající složkou mnoha biofilmů jsou bakterie, kromě nich se zejména v přírodních biofilmech nacházejí i další mikroorganismy – houby, bičíkovci, nálevníci aj. V následujícím volném seriálu se budeme věnovat základní charakteristice, vzniku, vývoji a fungování biofilmu a přiblížíme biofilmy v přírodě a v medicínském prostředí.

Biofilmy se vyskytují prakticky všude, kde jsou přítomné mikroorganismy. Kromě přírodního prostředí se vyskytují i v mnoha typech humánního prostředí, kde způsobují četné problémy. Znečišťují totiž povrchy, na nichž se tvoří (obr. 4–7), případně je poškozují korozi (obr. 3); biofilm např. zvyšuje odpor lodního trupu při plavbě a poskytuje základ pro další usazování řas a larev bezobratlých. V potrubí rozvinutý biofilm způsobuje turbulenci protékající kapaliny a omezuje průsvit, v průmyslových výměnících tepla tvoří tepelnou izolační vrstvu a snižuje jejich účinnost. V mnoha odvětvích průmyslu, jako jsou biotechnologie, čištění odpadních vod nebo bioremediace (využití mikrobiálního metabolismu k odstraňování

polutantů z vody nebo půdy), je naopak přítomnost biofilmů nezbytná. Zcela samostatnou, ale nesmírně důležitou a v současnosti nejvíce studovanou otázkou je výskyt biofilmů v medicíně, především na cizích tělesech v lidském těle, jako jsou kanyly, katétrů nebo plastové protetiké implantáty, kde mohou vyvolávat řadu obtížně léčitelných infekcí. Tvorba biofilmů byla prokázána u většiny patogenních bakterií, např. u zástupců rodů *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* nebo *Mycobacterium*.

Proč vlastně biofilmy vznikají?

Již jsme uvedli, že růst ve formě biofilmu je pro mikroorganismy výhodný. Oproti

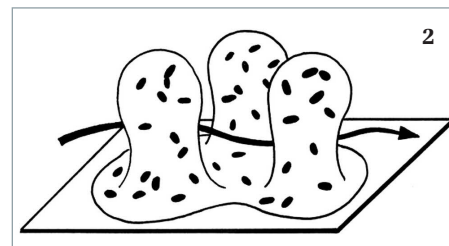
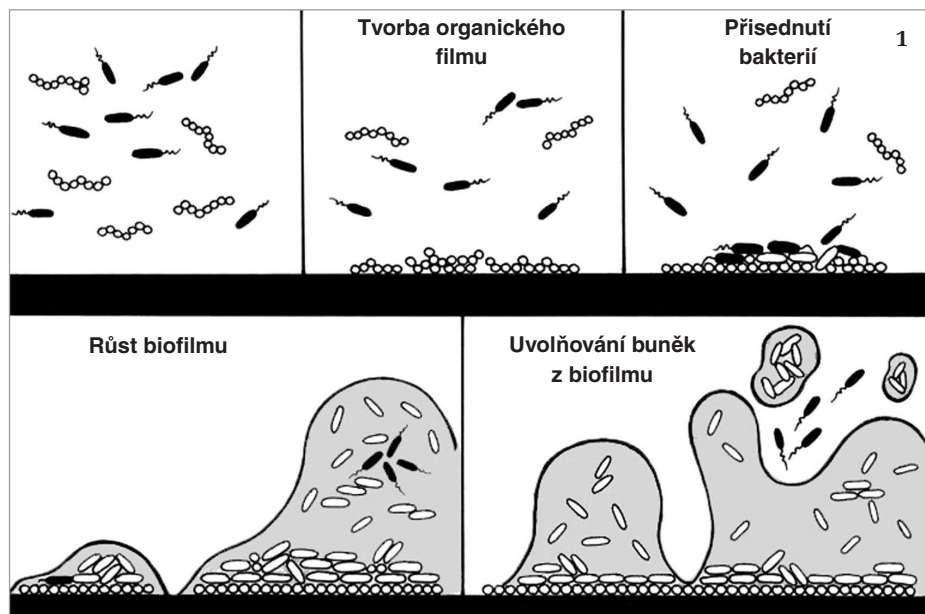
bakteriím rostoucím v planktonní formě (jako planktonní se nadále v textu označují bakterie suspendované nebo rostoucí v tekutém médiu, jako protiklad k přisedlým a rostoucím na povrchu) biofilm poskytuje bakteriálnímu buňkám ochranu. Vytvořená biofilmová vrstva obklopující buňky tedy představuje bariéru, která izoluje od okolí. Buňky v biofilmu tak mají např. vyšší odolnost vůči působení toxických látek a ultrafialového záření, proti mechanickému poškození, bakteriofágům i predátorům. V těle člověka nebo zvířete lépe odolávají imunitnímu systému nebo antibiotikům. Vykazují rovněž vyšší metabolickou aktivitu ve srovnání s planktonními bakteriemi, čehož lze úspěšně využívat v různých průmyslových aplikacích (např. při čištění odpadních vod).

Dosud ne zcela vyřešenou otázkou zůstává, proč bakterie přecházejí z volně plovoucí do biofilmové fáze růstu. Protože přichycení se k povrchu je účinnějším prostředkem, jak setrvat ve vhodném prostředí, než se nechat strhnout proudem, dala by se v extrémním případě planktonní či volně plovoucí mikrobiální fáze chápat jako mechanismus pro přemísťování z jednoho povrchu na druhý, tedy pouze jako nutný mezikrok mezi biofilmovými, přisedlými fázemi života bakterie. Někteří autoři však považují naopak biofilmy za stabilní fázi biologického cyklu, která zahrnuje stadium vývoje, zrání, udržování a rozpouštění. Vývoj biofilmu podle nich začíná jako odpověď na specifické vnější podmínky, např. dostupnost živin.

Vznik a vývoj biofilmu

Vznik, vývoj a stabilizace biofilmu probíhají v několika následných krocích: transport a adsorpce organických molekul na pevný povrch, transport mikrobiálních buněk k pevnému povrchu, zachycení mikroorganismů (v první fázi především bakterií) na povrchu, replikace buněk a produkce extracelulární matrice (blíže dále v textu), vývoj biofilmu na pevném povrchu, odtrhávání a disperze buněk z biofilmu zpět do kapaliny (obr. 1).

Po přichycení na vhodném povrchu se buňky začnou dělit, shlukovat a produkuje primární biofilm, na který se mohou při-



- 1 Fáze vývoje biofilmu. Blíže v textu. Orig. J. Kosturová (podle různých autorů)
 2 Schematická představa biofilmu tvořeného shluky mikrokolonií houbovitěho tvaru, spojenými navzájem kanálky a póry. Orig. J. Kosturová, upraveno podle: J. W. Costerton a kol. (1999)
 3 Poškození kamenných památek rozvojem biofilmů. Kostel Nanebevzetí Panny Marie, Dobrá voda, Novohradské hory
 4 Mikrobiální biofilmy jsou běžné i v našich koupelnách, kde způsobují nevzhledné povlaky.



chytávat další buňky tzv. sekundárního biofilmu. Drsné povrchy, materiály s porézní strukturou nebo bohaté na živiny obvykle pozitivně ovlivňují utváření biofilmu. K tomu může v zásadě docházet na jakémkoli rozhraní dvou fází, tedy na hranici pevné a plynné (např. plicní infekce), pevné a kapalné (např. potrubí, katétrů a kloubní implantáty) i kapalné a plynné fáze (např. povlaky aerobních bakterií na hladině kultivačních médií a bakteriální povlaky na hladině znečištěných stojatých vod). Buňky primárního biofilmu vykazují během svého růstu určitou prodlevu, která je pravděpodobně spojena s adaptací na podmínky přisedlého způsobu života nebo s fenotypovými změnami přisedlých buněk. Primární kolonizátoři povrchu substrátu mají relativně vysokou růstovou rychlost, po určité době se však rychlost snižuje a tloušťka biofilmu dosáhne ustálené hodnoty. Zpomalení růstu je dáno omezením transportu substrátu do hlubších vrstev biofilmu a zvýšením vlivu odumírání a rozkladu buněk ve stárnoucím biofilmu.

Růst, diferenciace a zrání biofilmu

Genetické práce ukázaly, že tvorba biofilmu vyžaduje mezibuněčnou signalizaci a mikroorganismy rostoucí v této formě se od svých planktonních forem odlišují fyziologickými vlastnostmi. Vzniká tak jakýsi biofilmový fenotyp. Cílem mnoha studií je proto porozumět přechodu mezi planktonní a biofilmovou fází růstu a naopak. Těsně před přilnutím se u bakterií spouští řada genů: při dotyku s vhodným povrchem se aktivuje především vznik bičíků, v biofilmu se pak jejich tvorba ve většině případů snižuje nebo úplně ustává. V přichycení (adhezi) pomáhají bakteriím další buněčné struktury, např. fimbrie, které na rozdíl od bičíků vypadají spíše jako třásně nebo chloupky a na povrchu buňky tvoří husté kartáčky. Bezprostředně po kontaktu s povrchem se aktivují geny zajišťující produkci polysacharidů a polymerů potřebných pro vznik biofilmové vrstvy. Po úspěšném

přichycení bakterií k povrchu následuje fáze růstu (akumulace), diferenciace a zrání (maturace) biofilmu. V této době bakterie vylučují na svůj povrch poměrně velké množství extracelulární polymerní matrice (EPM) – slizu různého chemického složení. Společně s bakteriálními buňkami je základní stavební složkou biofilmu a výrazně ovlivňuje jeho vlastnosti. EPM produkují kromě bakterií případně i eukaryotní buňky v biofilmu a v této matici jsou bakterie fixovány. Extracelulární matrice významně přispívá k uspořádání biofilmového společenstva a působí také většinu ekonomických škod spojovaných s tvorbou biofilmů. Její složení vychází z kombinace vnitřních faktorů, jako jsou genotyp nebo druhové složení přisedlých buněk, a vnějších vlivů, které zahrnují okolní fyzikálně-chemické prostředí a povahu kolonizovaného substrátu. Tvoří ji až z 97 % voda a dále anorganické a organické látky, přičemž významnou roli ve struktuře hrají (exo)polysacharidy. Ačkoliv nejsou hlavní složkou matrice (představují



obvykle 1–2 %), považují se za hlavní strukturální prvek, který staví kostru (framework) pro celý biofilm. Stručně řečeno, exopolymery poskytují skelet, do něhož jsou mikrobiální buňky a jejich bioaktivní produkty zapuštěny. Z ostatních látek se v matici spolu s vodou a mikrobiálními buňkami nachází komplex vyloučených polymerů, absorbovaných živin a metabolitů, produktů buněčné lyze (rozkladu) a někdy i drobného materiálu a detritu z okolního prostředí. Vedle hlavních skupin makromolekul – proteinů, polysacharidů, DNA a RNA jsou zde přítomny rovněž peptidoglykany, lipidy, fosfolipidy a další složky buněk. Kromě fixace buněk slouží EPM jako vysoce selektivní síto ovlivňující pohyb plynů, rozpuštěných solí a makromolekul do a z jednotlivých mikrokolonií biofilmu.

Jinou významnou vlastností biofilmů je vychytávání a hromadění živin a organických látek z okolního prostředí, což umožňuje bakteriím růst i v extrémně oligotrofních podmínkách. Biofilmy mohou také zadržovat a skladovat organické složky, které se později rozkládají v přítomnosti extracelulárních enzymů produkovaných bakteriemi. Tak jsou schopny rozkládat vysokomolekulární látky, jako např. lignin, které jsou jinak jako potravní zdroj pro volně žijící buňky nedostupné. Další funkcí EPM je velmi účinná ochrana před nepříznivými účinky vnějšího prostředí.

Struktura a fungování biofilmu

Struktura vlastního biofilmu závisí na interakcích, jež v něm probíhají mezi fyzikálními a biologickými procesy. V prostředí s vyšší rychlostí proudění, kde dochází k silnému tlaku na odtrhávání, jsou biofilmy hustší a hladší, naopak ty, které rostou při pomalejším proudění, jsou více porézní. Plně vyztáhlý biofilm není homogenní, ale má heterogenní strukturu – buňky a kupy buněk rozptýlených v matici s mezerami a kanálky naplněnými vodou a propojenými s okolní kapalnou fází. Z různých pozorování a měření, především za použití laserového konfokálního mikroskopu, byl vytvořen trojrozměrný model architektury biofilmu (obr. 2). Bakterie jsou v něm rozloženy nerovnoměrně, rostou v mikrokoloniích – shlucích kuželovitého nebo houbovitého tvaru – navzájem spojených spletitými kanálky, jež mohou většími mikrokoloniemi i procházet; tyto kanálky jsou však tenčí.

Okolní kapalina obsahuje molekuly živin a dalších nezbytných organických a anorganických látek, prostřednictvím kanálků a pórů v mikrokoloniích vstupuje do biofilmu, těmito živinami ho zásobuje a naopak odnáší metabolické produkty. Z kanálků proudí kapalina póry do nitra větších mikrokolonií a dále se již dostává pouhou difuzí. Ta je však účinná pouze do určité hloubky biofilmu. S rostoucí hloubkou proto dochází ke zřetelnému úbytku koncentrace kyslíku a dalších životně důležitých látek. Protože matrice izoluje mikrokolonie od proudící kapaliny, umožňuje biofilmová vrstva metabolické aktivity zcela odlišné od okolí. Tak je možné, aby např. anaerobní aktivity (produkce metanu) probíhaly v aerobním prostředí a aerobní i anaerobní procesy,

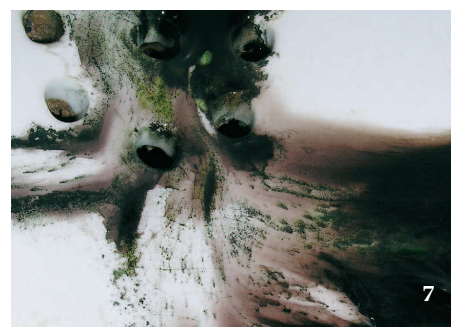
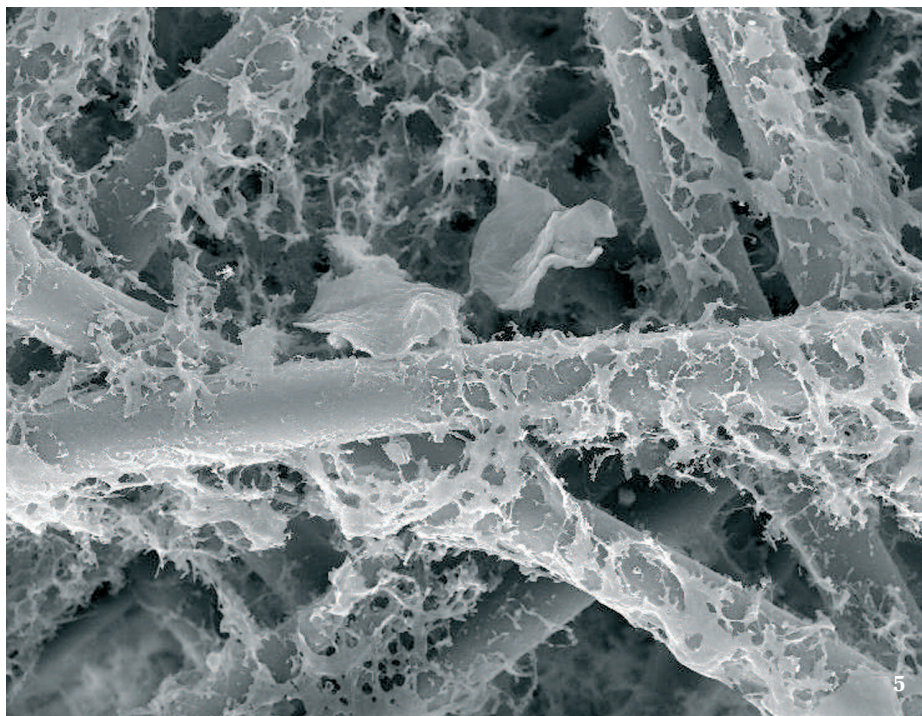
jako např. oxidace sulfidů a redukce síranů, v odlišných vrstvách téhož biofilmu. Struktura biofilmu a koncentrační gradienty různých látek se odrážejí rovněž v distribuci metabolicky aktivních a neaktivních buněk: v bazální části jsou obvykle buňky neživé, zatímco v nejsvrchnější vrstvě dominují rostoucí buňky. Zdá se, že během vývoje biofilmu primární kolonizátoři – aerobní bakterie, které byly původně v kontaktu s okolní kapalinou, přerostly vyvíjejícím se biofilmem, staly se neaktivními a postupně odumírají.

Buňky v biofilmu vzájemně metabolicky spolupracují a dochází u nich k vyššímu stupni genetické výměny – díky poměrně úzkému kontaktu se mezi nimi intenzivně vyměňují genetická informace, zvláště konjugací a přenosem plazmidů. Tímto způsobem se mohou mezi jednotlivými populacemi v biofilmu rychle šířit např. plazmidy kódující rezistenci k antibiotikům (viz také seriál Horizontální přenos genetické informace; Živa 2006, 1–6).

Regulace tvorby biofilmu

Některé buňky se z kolonií odlučují, přecházejí do planktonního stavu a mohou kolonizovat další části povrchu. Pravděpodobnou příčinou tohoto chování je zvyšující se konkurence mezi buňkami v biofilmu. Produkované chemické signály upozorňují okolní buňky na jejich přítomnost a zabraňují dalšímu zahušťování populace. Produkce signálních látek stoupá se zvyšující se hustotou populace a tyto látky se ve vysokých koncentracích hromadí v buňkách a jejich okolí. Tento způsob vnitrobiofilmové komunikace se označuje pojmem vnímání množství (quorum sensing, QS) a v současnosti už máme o tomto fenoménu řadu informací. Quorum sensing byl poprvé rozpoznán v 70. letech 20. stol. u mořské bakterie *Vibrio fischeri*, kde kontroluje luminiscenci. Tyto bakterie fungují často jako mutualistický světelný orgán (fotofor) v symbióze s určitými mořskými organismy a jsou schopné luminiscence pouze tehdy, když dosáhnou dostatečné buněčné hustoty. Dosud bylo popsáno několik rozdílných typů signálu – gramnegativní bakterie využívají jako signální molekulu v QS systému nejčastěji N-acyl-homoserin laktony složené z mastné kyseliny a aminokyseliny serinu, u grampozitivních mikrobů jde obvykle o krátké oligopeptidy, které lze přirovnat k feromonům nebo hormonům. Signální látky řídí dělení buněk, a tím hustotu populace v biofilmu a tvorbu slizové polysacharidové matrice.

Mezibuněčná komunikace zprostředkovaná QS systémem se podílí na regulaci tvorby biofilmu a ovlivňuje zároveň expresi faktorů virulence u celé řady patogenických bakterií. Absence jedné či několika složek QS systému může způsobit výrazné snížení virulence. Otázkou je, jaký má pro bakterie vlastně význam tato kontrola pomocí QS. Zdá se, že je ekonomické vytvořit extracelulární faktory až poté, co bylo dosaženo kritické populační hustoty. QS totiž umožňuje bakteriálnímu patogenu koordinovat syntézu extracelulárních faktorů virulence tak, že se neuplatní v rané fázi infekce, kdy je bakteriální populace slabá. Naopak načasované pozdější uvol-



5 Nárůst biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na filtru z umělých vláken určeného pro úpravu pitné vody. Foto D. Erben

6 Biofilm na vnitřních stěnách pisoáru
7 V biofilmu z pisoárů byly dominantní mikroskopické houby (např. *Alternaria alternata* a *Cladosporium cladosporioides*) a sinice. Snímky M. Rulíka, pokud není uvedeno jinak

nění těchto faktorů umožní, že se patogen dostatečně pomnoží bez přílišného upozorňování na svou přítomnost a pak překvapí útokem, kdy vypustí faktory virulence v koordinované a ohromující podobě.

Uvolňování buněk a šíření biofilmu

Akumulace biofilmu na určitém povrchu je určována rovnováhou mezi procesy přichycení, růstu a disperze. Z těchto tří dějů je zatím nejméně známo o disperzi – tedy uvolňování jednotlivých mikrobiálních buněk i jejich shluků obalených v extracelulární matici z biofilmu do okolní kapaliny a jejich další šíření. Bylo popsáno několik mechanismů, jež mohou působit jako významné faktory disperze, některé z nich jsou čistě fyzikální, jiné mohou být založeny spíše na biologických principech. Z hlediska fyzikálního je nejčastější působení hydraulických střížných sil (proudění kapaliny). Z biologického pohledu se odtrhávání obvykle vysvětluje reakcí buněk na malé množství živin. Lokální nedostatek živin v biofilmu totiž

u některých buněk indukuje tzv. univerzální odpověď na stres, jejímž výsledkem může být právě oddělování. Dříve bylo odtrhávání části biofilmu považováno za pasivní chování závislé na rychlosti proudění nebo nedostatku živin. Může být však chápáno i jako strategie, kterou bakterie aktivně kolonizují nové niky ještě dříve, než se prostor a živiny na jejich původním místě stanou limitujícími. Určité druhy bakterií mohou totiž aktivně opouštět biofilm během procesu, který se v angličtině nazývá rozptýl (dispersion) nebo rozpuštění, zánik (dissolution). Dochází k němu pravděpodobně koordinací dvou kroků: štěpením extracelulární matrice produkcí polysacharidových lyáz nebo ektoenzymů a aktivací mobilních funkcí bakteriálních buněk (k nimž patří např. plavání pomocí bičíků). Předpokládá se, že tato aktivita představuje závěrečný krok vývoje biofilmu, v němž se buňky vracejí do planktonní fáze.

V příštím článku si povíme podrobněji o biofilmech ve vodním prostředí.