

ANDRZEJ CHLEBICKI

*Zakład Mykologii
Instytut Botaniki im W. Szafera PAN
Lubicz 46, 31-512 Kraków
E-mail: a.chlebicki@botany.pl*

BIOFILMY WYSTĘPUJĄ POWSZECHNIE W PRZYRODZIE

WSTĘP

Niniejszy artykuł jest czwartym z kolei, poświęconym zagadnieniom związanym z geomikrobiologią. Poprzednie artykuły można znaleźć w Wiadomościach Botanicznych i Kosmosie (CHLEBICKI 2007, 2014; CHLEBICKI i WILCZEK 2012). Obecny artykuł jest poświęcony specyficznym zespołom mikroorganizmów tworzącym biofilm. Biofilm jest osiadłą formą życia zbiorowisk wielu mikroorganizmów zanurzonych w specjalnie wytworzonej przez nie substancji organicznej zwanej w skrócie EPS (ang. extracellular polymers), zawierającej także składniki nieorganiczne. Biofilmy mogą składać się z wielu gatunków mikroorganizmów lub też tylko z jednego gatunku. W ich skład mogą wejść takie mikroorganizmy jak bakterie, archeony, chromisty, grzyby i protisty.

Biofilmy powstają w obszarach kontaktu dwu środowisk: wody i powietrza, powierzchni stałej i wody. Na styku tych środowisk powstaje dynamiczna i dobrze zorganizowana forma życia. REITNER (2011a) rozróżnia biofilmy i maty bakteryjne. Te ostatnie mają być znacznie grubsze, mierzone w centymetrach, a nie w milimetrach jak biofilmy, z często wyróżniającą się ekologiczną zoną, tzn. występowaniem różnych zbiorowisk

mikroorganizmów, które dodatkowo mogą mieć różną barwę.

Obecnie istnieje duża liczba publikacji oraz wyspecjalizowane czasopisma i serie wydawnicze omawiające tę problematykę, np. Springer Series on Biofilms. Ostatnio, w 2014 r. w Wiedniu, odbyła się konferencja poświęcona biofilmom (Biofilm 6, International Conference on Microbial Biofilms). Badania biofilmów trwają już 40 lat. Za pierwszą pracę na ten temat należy uznać opracowanie ZOBELL (1943), niemniej pierwszą hipotezę o powszechnym występowaniu biofilmów w przyrodzie zawdzięczamy Amerykaninowi Wiliamowi Costertonowi (COSTERTON i współaut. 1978). Uważa się, że biofilmy są najstarszą formą zbiorowisk organizmów żywych. Najbardziej znane są stromatolity, będące efektem działania cyjanobakterii. Największe stromatolity, sięgające 40 metrów wysokości odkryto w Turcji w zasadowym jeziorze Wan. Wytworzyły je cyjanobakterie z rodzaju *Pleurocapsa* (KEMPE i współaut. 1991). W Polsce odnotowano między innymi występowanie jurajskich stromatolitów w Zegarowych Skałach (MATYSZKIEWICZ i współaut. 2005) oraz ślady dewońskich stromatolitów w Górach Świętokrzyskich (SZULCZEWSKI 1971).

FORMOWANIE SIĘ I BUDOWA BIOFILMU

Swobodnie unoszące się w płynie komórki bakterii od czasu do czasu przyłączają się do podłoża, jest to tzw. adhezja odwracalna; czasem trwa to tylko kilka mi-

nut. Nie jest znany powód takiego zachowania się bakterii. Niemniej sądzi się, że bakterie podążają w kierunku substancji odżywczych lub też reagują na sygnały wy-

syłane przez istniejące już biofilmy. Ściana komórkowa bakterii jest złożoną strukturą. Bakterie Gram+ mają ścianę zbudowaną głównie z mureiny (peptydoglikan), której długie łańcuchy są połączone peptydowymi mostkami zakończonymi aminokwasami w formie prawoskrętnej (D). Taka ściana składa się czasem aż z 40 warstw zawierających również kwasy tejchojowe. Natomiast bakterie Gram- mają ścianę zbudowaną z jednej warstwy mureiny, bogatą w lipoproteidy i lipo polisacharydy oraz zewnętrzną błonę zbudowaną z fosfolipidów. Zewnętrzna powierzchnia ściany bakterii zawiera między innymi fimbrie, wici, fragmenty polisacharydowe i wiele innych. Adhezja nieodwracalna komórek bakteryjnych ma miejsce wtedy, gdy komórki pozostają przyczepione do podłoża i zaczynają produkować polisacharydową matrix. Również ultramikrobakterie (UMB) tworzące biofilmy znacznie się zmieniają po przyczepieniu się do podłoża. Wówczas ich niewielkie komórki ($\pm 0,3 \mu\text{m}$) znacznie się powiększają. Proces adhezji bakterii do różnych podłoży był i nadal jest przedmiotem badań w wielu laboratoriach. Nie jest do końca dobrze poznany. Najbardziej zaskakujące jest to, że bakterie unoszące się w roztworze mogą być szybko zabijane przez antybiotyki, natomiast osiadłe w biofilmie bakterie są na nie odporne, pomimo, że antybiotyk dociera do nich w ciągu kilku sekund (SUCI i współaut. 1994). Osiadłe bakterie produkują polisacharydowe otoczki, tzw. EPS (KONHAUSER 2007), który pełni rolę ochronną. Budowa chemiczna EPS jest bardzo skomplikowana. Głównymi substancjami są hetero-polisacharydy, kwasy uronowe, rzadziej białka, w tym enzymy, a także kwasy nukleinowe pochodzące z obumierających bakterii. Zawartość wody w EPS może dochodzić do 99%. Jednym z polisacharydów produkowanym przez bakterie jest lewan, fruktanowy polimer, mogący tworzyć łańcuchy składające się z setek, a nawet tysięcy jednostek. Lewan stabilizuje strukturę biofilmu, zwiększa jego lepkość, ponadto, jak wykazują eksperymenty STOPAR i współaut. (2014), łączy się również z wolnym DNA. Zmiana lepkości biofilmu jest związana ze stosunkiem ilości lewanu do DNA. EPS nie jest jednolitym polisacharydowym blokiem, ma strukturę podobną do pszczelich plastrów. Wewnątrz znajduje się sieć korytarzy, która pozwala przemieszczać się cząstkom o wielkości mniejszej niż $5 \mu\text{m}$ (COSTERTON 2007). Średnica wypełnionych wodą kanałów

między polisacharydową matrix w badanym przez nas naskalnym biofilmie była większa; wahała się w granicach $14\text{--}34 \mu\text{m}$ (CHLEBICKI i współaut. 2014). Między bakteriami najczęściej zachowany jest odstęp około $5\text{--}10 \mu\text{m}$; w przypadku *Escherichia coli* bakterie są połączone siecią pili (fimbrii) tworząc w ten sposób przestrzenną strukturę (MAY i współaut. 2006). Fimbrie są też połączeniami, przez które przedostają się nanocząstki, w tym fragmenty DNA (GORBY i współaut. 2006). EPS jest ustawicznie zmieniającą się strukturą, w której poszczególne mikrokolonie bakterii stale zmieniają swój kształt, a nawet mogą podlegać oscylacjom (LEWANDOWSKI i STOODLEY 1995). Dojrzały biofilm odtwarza także pojedyncze, swobodnie unoszące się komórki bakterii. Dyspersja zmienionych morfologicznie komórek bakteryjnych pozwala kolonizować nowe obszary. Ameby potrafią chwycić i konsumować pojedyncze komórki bakterii, natomiast pobrany przez nie fragment biofilmu nie jest trawiony i po jego wydaleniu podejmuje dalszą działalność. W ten sposób ameby rozprzestrzeniają bakteryjny biofilm, co przypomina proces zoochorii.

EPS stanowi barierę dla toksycznych jonów metali, zatrzymuje substancje odżywcze, działa jak system wymiany jonów, zabezpiecza bakterie przed bakteriofagami i amebami, chroni bakterie przed wysychaniem (SINGLETON 2005), a także przed podwyższoną temperaturą i zamarzaniem (KONHAUSER 2007). Badania prowadzone w naszym zespole wskazują, że EPS może także chronić bakteryjne biofilmy przed ekspansją grzybów (CHLEBICKI i współaut. 2014). EPS ponadto umożliwia przesyłanie sygnałów i komunikację pomiędzy bakteriami. COSTERTON (2007) sugerował nawet, że pozycja komórek bakterii w biofilmie jest genetycznie uwarunkowana; bakterie zachowują się tak, jak organelle w komórkach eukariotycznych.

Jednak pomimo 40 lat badań biofilmów, EPS nadal pozostaje wyzwaniem, i takie dosadne określenie jak „magiczne działanie” (CHRISTENSEN i CHARACKLIS 1990) nadal pozostaje w pewnym sensie prawdziwe (NEU 2014). Z pewnością EPS jest kolektywnym tworem, który nie jest jedynie sumą tworzących go organizmów, ale jest rozbudowaną matrix tworzącą swoiste środowisko bytowania mikroorganizmów. EPS jest strukturą, w której występują gradienty stężenia tlenu, wartości pH i potencjału oksydo-redukcyjnego, różne stężenia substancji odżywczych oraz duża różnorodność enzymów wydzie-

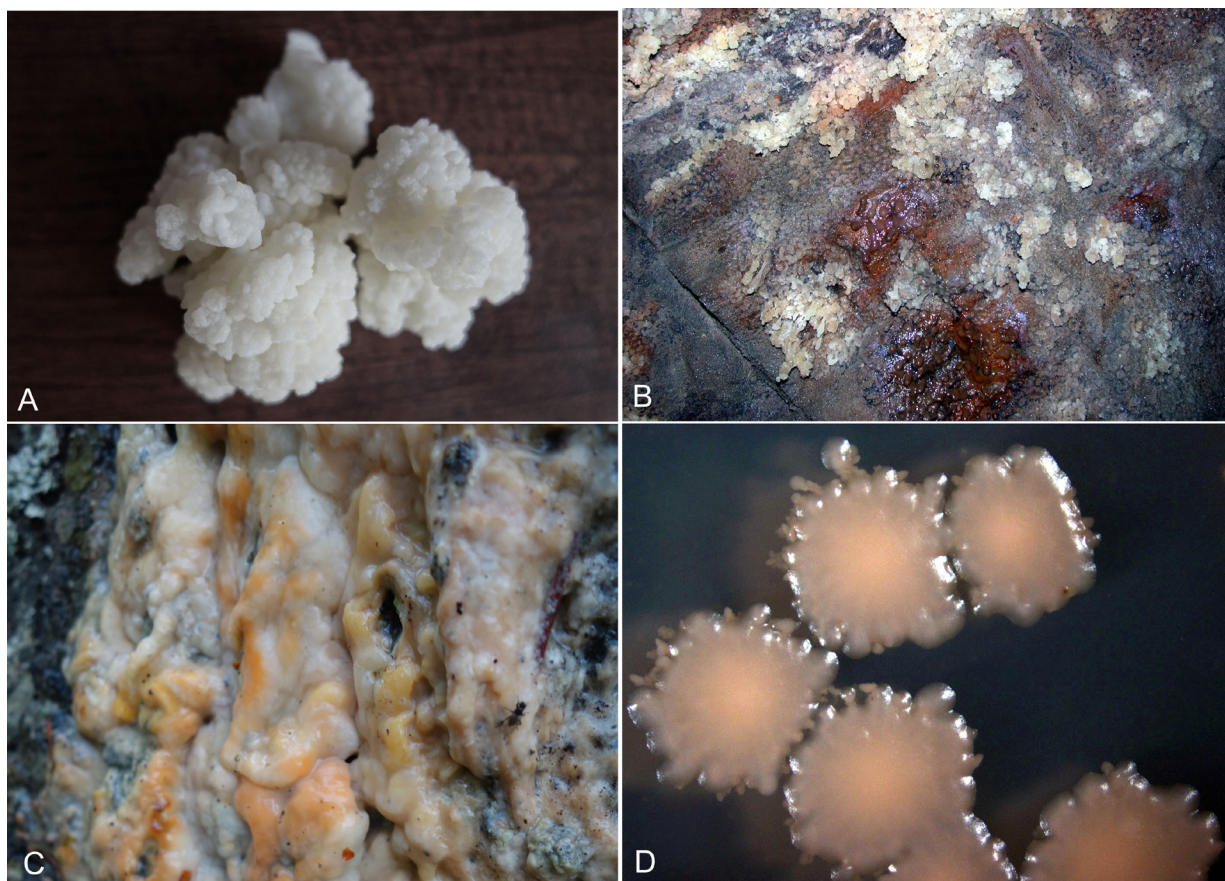
lanych przez mikroorganizmy. Umożliwia to rozkład nierozpuszczalnych materiałów kontaktujących się z biofilmem. Tak więc, w bio-

filmie istnieje bardzo duży wachlarz siedlisk. Umożliwia to egzystencję wielu gatunków o różnych wymaganiach troficznych.

RÓŻNORODNOŚĆ TWORZONYCH BIOFILMÓW

Biofilmy występują bardzo często i niemal wszędzie, na dnie oceanów, w skorupie ziemskiej do głębokości około 1500 m, w naturalnych środowiskach, a także w przemysłowych konstrukcjach, takich jak np. wodociągi, rurociągi, w plastikowych protezach o różnym medycznym zastosowaniu, na powierzchni zębów, na martwych zwierzętach i roślinach. Są pierwszymi zbiorowiskami kolonizującymi świeżo zakrzepłe skały bazaltowe tuż po erupcji wulkanicznej. Naturalne biofilmy najczęściej składają się z bardzo wielu (nawet kilkuset) gatunków mikroorganizmów. Natomiast w organizmie człowieka i innych ssaków mamy do czynienia z biofil-

mami jednego lub też kilku gatunków bakterii lub grzybów. Najwięcej informacji można znaleźć na temat biofilmów bakteryjnych. Biofilmy są porównywane także do metabolicznych „konsorcjów” składających się z wielu gatunków. Jednym z takich biofilmów jest np. tzw. „grzybek tybetański” składający się z bakterii *Lactobacillus lactis*, *L. kefirii*, *L. acidophilus*, *L. caucasicus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Leuconostoc mesenteroides* i drożdży *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Torulaspora* sp. (Ryc. 1A). Służy do produkcji kefiru zarówno w warunkach domowych, jak i na skalę przemysłową. Zarówno „grzybek tybetański”, jak

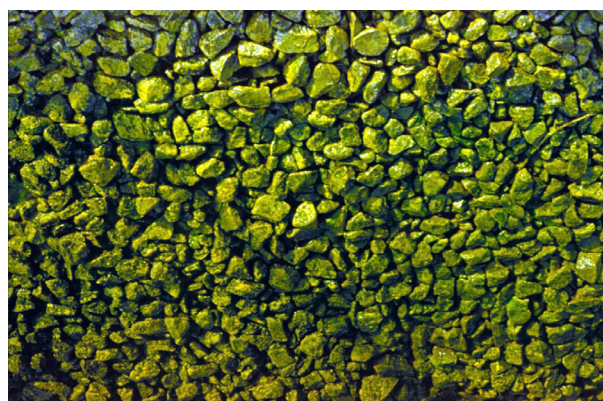


Ryc. 1. Bakteryjne i grzybowe biofilmy.

A – „grzybek tybetański”; B – bakteryjny biofilm na skalnych ścianach w korytarzu Gertruda, Kopalnia Złota w Złotym Stoku, C – biofilm wytworzony przez glony i bakterie na zamierającym pniu świerka w słowackich Pieninach; D – polisacharyd pullulan wytworzony przez *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* wyizolowany z korzeni *Juncus trifidus* (fot. A. Chlebiński).

i bakteryjny biofilm (Ryc. 1A, B) ze skał w kopalni złota są dość okazałych rozmiarów, jednak brak zonacji pozwala je uznać za biofilmy, a nie maty. Rozmieszczenie propagul grzybowych (żywych fragmentów strzępek, zarodników itp.) w naskalnym biofilmie było jednakowe na całej grubości biofilmu (CHLEBICKI i ZIELENKIEWICZ 2008).

Szczególnie interesujące są biofilmy wytworzone przez bakterie chemoautotroficzne, które pobierają energię wykorzystując procesy redukcji lub utleniania minerałów (Ryc. 1B). Są to zapewne najstarsze sposoby zaopatrywania się w energię. Ziemia na początku istnienia miała atmosferę, która w niewielkim stopniu chroniła organizmy przed promieniowaniem UVB i promieniowaniem kosmicznym. Życie z konieczności zasiedlało obszary pozbawione promieniowania słonecznego, dlatego chemoautotrofizm był podstawową strategią, zwłaszcza w okresie tzw. „Snow Ball”, czyli śnieżnej kuli, gdy cała powierzchnia Ziemi była pokryta lodem. W Polsce badaniami naturalnych biofilmów występujących na skałach zajmowali się DREWNIAK i SKŁODOWSKA (2007), DREWNIAK i współaut. (2007), TOMCZYK-ŻAK i współaut. (2011, 2013), CHLEBICKI (2008) i CHLEBICKI i współaut. (2005, 2014). Naskalny biofilm znajdujący się w kopalni arsenu (dawniej kopalni złota) w Złotym Stoku składa się z bardzo wielu bakterii, w tym przy wykorzystaniu analizy 16S rRNA zidentyfikowano następujące rodzaje bakterii: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Cryobacterium*, *Desemzia*, *Frigoribacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Variovorax* (DREWNIAK i współaut. 2007, TOMCZYK-ŻAK i współaut. 2013). Spośród nich bakterie z rodzaju *Sinorhizobium* potrafiły utleniać lub redukować nieorganiczne związki arsenu (DREWNIAK i SKŁODOWSKA 2007). CHLEBICKI i współaut. (2014) zidentyfikowali w biofilmie propagule 8 gatunków grzybów glebowych: *Cephalotrichum stemonitis*, *Coemansia aciculifera*, *Geomyces pannorum*, *Mortierella elongata*, *Mortierella dichotoma*, *Oidiodendron truncatum* i *Trichoderma viridescens*. Biofilmy na korze drzew składają się głównie z chromistów (np. *Chlorella*, *Myrmecia*) i cyjanobakterii (np. *Nostoc*, *Leptolyngbya*, *Gloeocapsa*, *Scytonema* i inne), rzadziej w ich skład



Ryc. 2. Biofilm składający się z *Stigeoclonium tenue*, *Hypnomonas chlorococcoides* i *Chlorella vulgaris*, na kamiennym filtrze (fot. K. Wołowski).

wchodzą grzyby. Czasami takie nadrzewne biofilmy osiągają znaczne rozmiary (Ryc. 1C), będąc również dogodnym siedliskiem dla nicieni i larw owadów.

Wielogatunkowe biofilmy składające się z cyjanobakterii, chromistów (w tym okrzemek) i grzybów opisał WOŁOWSKI (1989). Autor prowadził obserwacje nad sukcesją mikroorganizmów tworzących biofilm na filtrach. Stopniowy wzrost bioróżnorodności biofilmu był związany także ze zmianą koloru powierzchni biofilmu. Skutecznie działający filtr z wytworzonym biofilmem miał kolor zielony, co było związane z obecnością takich chromistów jak *Stigeoclonium tenue*, *Hypnomonas chlorococcoides* i *Chlorella vulgaris* (Ryc. 2). Szary kolor wskazywał na pojawienie się bakterii *Sphaerotilus nutans* oraz *Zoogloea ramigera* na zamierających glonach. Świadczyło to o pogorszeniu się sprawności filtra. Pojawienie się koloru pomarańczowego wskazywało na występowanie saprofitycznego gatunku grzyba *Fusarium aqueductum* na obumierającym biofilmie. Taki filtr stawał się wówczas niefunkcjonalny. Była to pierwsza w Polsce tak dobrze udokumentowana praca o biofilmach.

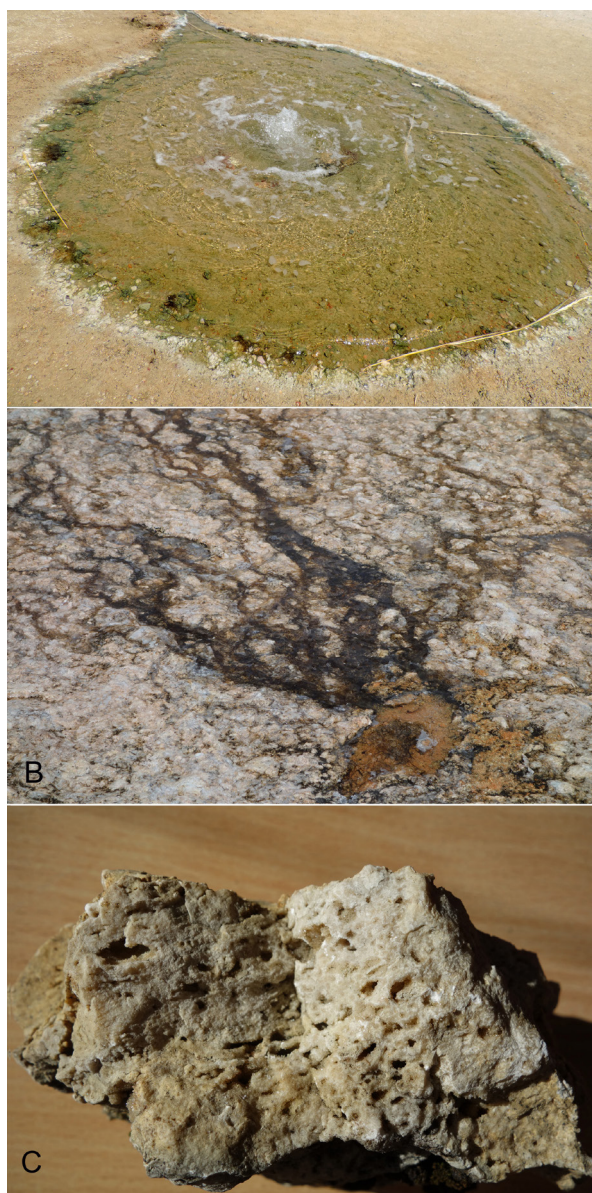
Biofilmy bakteryjne, tzw. epilitom (biofilm na skałach), powstają na powierzchni wień chłodniczych w Bełchatowie (HINDÁK i współaut. 2011). Taki złożony biofilm bakteryjno-chromistowy składał się z 16 gatunków mikroorganizmów. Interesujące jest także to, że możliwa była rewitalizacja cyjanobakterii (*Scytonema myochrous*, *Leptolyngbya gracillima*, *Gloeotheca rupestris*) z wysuszonego biofilmu po czterech latach przechowywania w warunkach pokojowych.



Ryc. 3. A – polewa pustynna na skałach w masywie Arasan (Tien Szan) (fot. A. Chlebicki), B – krystalizacja węglanu wapnia w wysychającym EPS naskalnego biofilmu z kopalni arsenu w Żłotym Stoku (fot. A. Chlebicki).

EPS bakteryjny biofilmów naskalnych zawiera różne jony, które w trakcie wysychania biofilmu łączą się w związki lub minerały (Ryc. 3B). W starzejącym się biofilmie mogą wytrącać się kryształy aragonitu CaCO_3 (DECHO i współaut. 2011). W ten sposób powstają inkrustacje, a później polewa pustynna (ang. desert varnish), nazywana też „pustynnym lakierem” (Ryc. 3A). Składa się on przede wszystkim z minerałów ilastych, które są usztywnione przez tlenki manganu i żelaza (DORN 1998). Uważa się, że to raczej bakterie i grzyby wchodzące w skład biofilmu naskalnego spowodowały nagromadzenie się tak dużej ilości związków manganowych w polewie pustynnej niż np. zmiany pH (abiotyczna interpretacja pochodzenia pustynnej polewy).

W rezerwacie Siva Brada na Słowacji znajduje się kilka hydrotermalnych źródeł wzbogaconych dwutlenkiem węgla. Zlokalizowane w ich pobliżu zbiorowiska cyjano-



Ryc. 4. Trawertyn wytwarzany w hydrotermalnych źródłach w rezerwacie „Siva Brada” na Słowacji, A – mały gejzer (fot. L. Dohojda), B – zbiorowiska cyjanobakterii na powierzchni naskorupień, C – „martwica karniowicka” (fot. A. Chlebicki).

bakterii, tworzące bakteryjny biofilm (Ryc. 4), pochłaniają dwutlenek węgla przyspieszając w ten sposób sedymentację trawertynu. Uważa się, że cyjanobakterie są odpowiedzialne za powstanie około 10% trawertynu, reszta powstaje w procesach abiotycznych. Wzgórze trawertynowe w rezerwacie ma wysokość 25 metrów i szerokość około 500 m. Jego wiek oszacowano na około 10 000 lat. W skład biofilmów powstałych w pobliżu źródeł wchodzi cyjanobakterie: *Phormidium*, *Geitlerinema*, *Chroococcus*,

Oscillatoria i inne (LHOTSKÝ i współaut. 1974). Biofilmy w rezerwacie Siva Brada są nadal aktywne. Natomiast obok znajduje się wysoki, martwy już trawertynowy kopiec, na którym stoi Spiski Zamek oraz nieco niższy kopiec objęty rezerwatem Drevenik. W Polsce mamy z kolei kopalne trawertyny, tzw. martwicę karniowicką występującą koło Krzeszowic (Ryc. 4C). Martwica ta powstała na przełomie karbonu i permu wokół gorących źródeł zlokalizowanych w pobliżu wulkanu. Zawiera w swoim składzie szczątki roślin, cyjanobakterii i ślimaków.

Oprócz powszechnie znanych biofilmów bakteryjnych znane są także biofilmy grzybowe, które również wytwarzają EPS (CHANDRA i współaut. 2001). Biofilm wytwarzany przez anamorfę (stadium konidialne) *Candida albicans* jest często notowany w tkankach człowieka i zwierząt. Inny grzyb, *Aureobasidium pullulans*, wytwarza biofilm, w którym polisacharydem (SINGH i współaut. 2008) jest pullulan (Ryc. 1D). Pullulan został dopuszczony do stosowania w krajach Unii Europejskiej, np. wykorzystuje się go do powlekania tabletek, a także pokrywania jabłek, serów i mięs chroniąc je przed atakiem mikroorganizmów. Otrzymał oznaczenie E1204. Jest nieszkodliwy dla zdrowia człowieka, a nawet ma działanie prebiotyczne, gdyż wspomaga rozwój bakterii dobroczynnych w przewodzie pokarmowym. Z kolei grzyb *Trichosporon pullulans*, formujący na wiosnę biofilm na ściętej powierzchni pni, wytwarza mykocyny, które zabijają szczepy tego samego gatunku, ale nie wytwarzające mykocyn (GOLUBEV i współaut. 2002). Mykocyny to allelopatyczne (szkodliwe dla innych organizmów) substancje produkowane przez grzyby.

Według FAROOQ (2014) oceany to gigantyczne biofilmy. Okazuje się, że wody oceanów są wypełnione żelowymi nićmi EPS, łączącymi bakterie i archeony. W tej sieci rozlokowana jest materia organiczna w postaci ognisk, tzw. „hot spots” (np. martwe zwierzęta i rośliny, odpady itp.). Rozumienie oceanu jako biofilmu jest raczej zbyt szerokie i od razu nasuwa się porównanie z koncepcją superorganizmu „Gaji” propagowaną przez LOVELOCKA (1979) i MARGULIS (2000). W tej sytuacji, oprócz klasycznego biofilmu i mat bakteryjnych, należałoby wyróżnić jeszcze je-



Ryc. 5. Kopalny odcisk myszy *Apodemus atavus* z późnego pliocenu, Willershausen Dolna Saksonia, przechowywany w Muzeum Geologicznym w Getyndze. Źródło: www.springerimages.com

den rodzaj biofilmów, w którym wodne korytarze byłyby o wiele szersze.

Biofilmy zasiedlają także tkanki martwych zwierząt. O ile tkanki znajdują się w beztlenowych warunkach, jak np. na dnach oceanów lub w mule jezior, wówczas mogą zachować się kopalne ślady takich biofilmów (WUTTKE 1983, BRIGGS 2003). To, co kiedyś uznawano za mineralne kopie tkanek miękkich, w rzeczywistości okazało się mineralnymi pozostałościami biofilmów. Bakterie konsumują wnętrza komórek organizmów eukariotycznych, ich enzymy w warunkach tlenowych dokonują lizy, natomiast w warunkach beztlenowych pozostają przyczepione do ścian komórkowych. Wewnątrz takich komórek powstaje bakteryjny biofilm, który następnie produkuje kryształy fosforanu wapnia $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lub też węglanu wapnia CaCO_3 . Dzięki inkrustacji tkanek kryształami można zobaczyć nawet drobne szczegóły struktury komórek, tkanek i kształt bakterii (RAFF i RAFF 2008). W niemieckiej literaturze takie odwzorowania są nazywane „Hautschatten” (WUTTKE 1983). Również struktura miękkich części kości dinozaurów została odwzorowana przez bakteryjne biofilmy (KAYE i współpr. 2008). Jednym z bardziej znanych przykładów są doskonale zachowane mineralne odwzorowania biofilmów wypełniających tkanki myszy *Apodemus atavus* (Ryc. 5) z późnego pliocenu z Saksonii (REITNER 2011b).

INTERAKCJE

Oprócz symbiotycznych oddziaływań w biofilmie, jest też w nich miejsce na konkurencję i komensalizm. FOSTER (2014) przeprowadził eksperymentalne badania biofilmów, które ujawniły, że w zbiorowiskach tych przeważa jednak konkurencja nad kooperacją. Również nasze badania (CHLEBICKI i współaut. 2014) to potwierdzają. Można powiedzieć też, że biofilmy pełnią rolę sanitarną, oczyszczając środowisko z różnych materiałów organicznych, wpływają na cykle obiegu takich pierwiastków jak węgiel, tlen, azot, fosfor, siarka i wiele metali (FLEMMING 2014).

FLEMMING (2014) uznał, że interakcje między mikroorganizmami powinny stanowić przedmiot nowej gałęzi naukowej: socjologii mikroorganizmów (ang. sociomicrobiology).

Jak już poprzednio wspomniano, mikroorganizmy tworzące biofilm należą do bardzo różnych grup taksonomicznych. Spośród różnych możliwych grup opiszę interakcje między bakteriami i grzybami. Grzyby mają wydłużone strzępki i potrafią dość głęboko penetrować podłoże, natomiast bakterie są rozproszone w wodzie lub też przyłączone do powierzchni podłoża. Antagonizm między bakteriami i grzybami jest bardzo dobrze znany. Grzyby produkują antybiotyki, które zabijają bakterie. Bakterie glebowe potrafią zahamować wzrost grzybów fitopatogenicznych (DE BOER i współaut. 2005). Również MILLE-LINDBLOM (2005) badająca relacje między grzybami i bakteriami w wodnym detrytusie *Phragmites australis* zauważyła, że wzrost grzybów był zawsze hamowany przez bakterie. Grzyb *Rhodotorula rubra* występujący razem z bakterią *Thiobacillus ferrooxidans* stymulował zarówno wzrost, jak i szybkość reakcji utleniania siarczanów przez bakterię (LÓPES-ARCHILLA i współaut. 1995, FOURNIER i współaut. 1998). Z kolei *Cryptococcus neoformans* uzyskuje od bakterii *Klebsiella aerogenes* prekursora (dopaminę) do produkcji melaniny (FRASES i współaut. 2006). NURMIAHO-LASILLA i współaut. (1997) oraz BIANCIOTTO i BONFANTE (2002), zauważyli, że bakterie mogą przemieszczać się wzdłuż strzępek grzyba. Nasze obserwacje z bakterią *Serratia proteamaculans* i grzybem

Mortierella elongata są identyczne. Z kolei bakteria *Pseudomonas aeruginosa* może wytworzyć biofilm na strzępkach grzyba *Candida albicans* i uśmiercić je, podczas gdy komórki *Candida albicans* w fazie drożdżowej (unoszące się w roztworze) nie są atakowane przez bakterie (HOGAN i KOLTER 2002, KIRKWOOD 2002). W naszych badaniach okazało się, że ograniczona ilość substancji pokarmowych w EPS blokuje rozwój grzybni grzybów glebowych (CHLEBICKI i współaut. 2014). Równocześnie okazało się, że propagule grzybów w EPS naskalnego biofilmu mogą pozostawać żywe przez dłuższy czas. Oznacza to, że EPS można będzie wykorzystać do przechowywania żywych zarodników grzybów. Obecnie żywe kolonie grzybów przechowuje się w niskotemperaturowych zamrażarkach. Jednak część szczepów grzybów zamiera w takich warunkach.

Biofilmy są pospolitą formą występowania mikroorganizmów. Panuje ogólne przekonanie, że są one zbiorowiskami efemerycznymi. WARD i współaut. (1998) odnotowali stosunkowo długi czas trwania (dziesięciolecia) mat bakteryjnych występujących w gorących źródłach, co jest uwarunkowane stałym i nie zmieniającym się dopływem substancji odżywczych. Jeśli uwzględnimy, że bakteria żyje około 30 minut, wówczas biofilm staje się jednym z najbardziej trwałych zbiorowisk organizmów żywych, jeżeli czas jego trwania podzielimy przez długość życia jego składników. Biofilm z kopalni złota w Złotym Stoku ma już ponad 10 lat i jest nadal w dobrym stanie, bez śladów obumierania. Okazuje się, że od czasu jego powstania zaistniało około 180 tysięcy pokoleń bakterii. Które ze zbiorowisk roślin są w stanie tak długo egzystować bez widocznych zmian?

Dziękuję prof. Konradowi Wołowskiemu za udostępnienie pracy oraz Frantiskowi Hindakowi za informacje o sinicach z rezerwatu Siva Brada, a także recenzentowi za cenne uwagi. Artykuł został wykonany w ramach działalności statutowej Instytutu Botaniki PAN w Krakowie.

BIOFILMY WYSTĘPUJĄ POWSZECHNIE W PRZYRODZIE

Streszczenie

Biofilmy są formą życia mikroorganizmów występującą na granicy faz ciała stałe-woda, woda-powietrze. Biofilmy wytwarzają polisacharydową otoczkę, tzw. EPS, składający się oprócz polisacharydów z glikoprotein, enzymów, kwasów nukleinowych i wody (do 99%). EPS pełni bardzo ważną rolę ochronną dla tworzących go mikroorganizmów. Biofilmy są bardzo szeroko rozpowszechnione, występują nawet w ekstremalnych warunkach, od zamarzniętej aż po wrzącą wodę, pH od 1-12, na skałach, wewnątrz organizmów, na wszelkich powierzchniach, tworzą

tzw. lakier pustynny na skałach, występują na dnach oceanów i na świeżo zastygniętych powierzchniach lawy. Biofilmy to także najstarsze zbiorowiska żywych organizmów na Ziemi zwane stromatolitami lub mikrobialitami. W opuszczonej kopalni arsenu (dawniej złota) w Złotym Stoku wytworzył się naskalny biofilm składający się z bakterii i grzybów. EPS tego biofilmu okazuje się być doskonałym środowiskiem do przechowywania żywych propagul grzybów glebowych w warunkach laboratoryjnych.

BIOFILMS COMMONLY OCCUR IN NATURE

Summary

Biofilms are living systems formed by different microorganisms. and contained within enveloping surface made of secreted, highly hydrated, exopolisacharydes (EPS), and in small amounts of enzymes, glycoproteins and nucleic acids.

EPS plays important protective roles against antimicrobials and environmental stresses. Biofilms are widespread, they occur on solid surfaces, air-water

interface, on living tissues of plants and animals. Biofilms penetrate also extreme environments. They belong to the oldest forms of life on Earth.

On a rock wall in the abandoned Złoty Stok gold mine a microbial biofilm was found the EPS of which appeared to serve as a good environment for preservation of fungal propagules in the laboratory conditions.

LITERATURA

- BIANCOTTO V., BONFANTE P., 2002. *Arbuscular mycorrhizal fung: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek 81, 365-371.
- BRIGGS D. E. G., 2003. *The role of decay and mineralization in the preservation of soft-bodied fossils*. Ann. Rev. Earth Planet. Sci. 31, 275-301.
- CHANDRA J., KUHN D. M., MUKHERJEE P. K., HOYER L. L., MCCORMICK T. i współaut., 2001. *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. J. Bacteriol. 183, 53-85.
- CHLEBICKI A., 2007. *Nielichenizujące grzyby epi- i endolityczne (litobionty)*. Wiad. Bot. 51, 5-13.
- CHLEBICKI A., 2008. *Cephalotrichum stemonitis as biofilm inhabitant in gold mine in Poland*. Acta Mycol. 43, 67-70.
- CHLEBICKI A., 2014. *Czy życie zostało przyniesione z kosmosu?* Kosmos 3, 481-488.
- CHLEBICKI A., ZIELENKIEWICZ U., 2008. *Grzyby mikroskopijne występujące w bakteryjnym biofilmie ze Sztolni Gertrudy (Złoty Stok)*. Przyroda Sudetów 11, 43-56.
- CHLEBICKI A., WILCZEK A., 2012. *W stronę geomikrobiologii*. Wiad. Bot. 56, 7-15.
- CHLEBICKI A., GODZIK B., LORENC M. W., SKŁODOWSKA A., 2005. *Fungi and arsen-tolerant bacteria in the hypogean environment of an ancient gold mine in Lower Silesia SW Poland*. Polish Bot. Stud. 19, 81-95.
- CHLEBICKI A., ZIELENKIEWICZ U., WILCZEK A. M., 2014. *Fungi are not involved in biofilm formation on rock wall in subterranean arsenic mine in Poland*. Nova Hedwigia 99, 255-269.
- CHRISTENSEN B. E., CHARCKLIS W. G., 1990. *Physical properties of biofilm*. [W:] *Biofilms*. CHARACKLIS W. G., MARSCHALL K. C. (red.). Wiley, New York, 93-130.
- COSTERTON J. W., 2007. *The biofilm primer*. Springer series on biofilms, Vol. 1. Springer Verlag, Berlin-New York.
- COSTERTON J. W., GEESEY G. G., CHENG K.-J., 1978. *How bacteria stick*. Sci. Am. 238, 86-95.
- DECHO A. W., VISCHER P. T., REID R. P., 2011. *Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite*. Palaeogeogr. Palaeoclim. Palaeoecol. 219, 71-86.
- DE BOER W., FOLMAN L., SUMMERBELL R. C., BODDY L., 2005. *Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development*. FEMS Microbiol. Rev. 29, 795-811.
- DORN R. I., 1998. *Rock coating*. Amsterdam: Elsevier.
- DREWNIĄK Ł., SKŁODOWSKA A., 2007. *Isolation and characterization of psychrotolerant arsenite-oxidizing bacterium from gold mine in Złoty Stok*. Adv. Mat. Res. 20-21, 576.
- DREWNIĄK Ł., STYCZEK A., SKŁODOWSKA A., 2007. *Arsenic hypertolerant bacteria isolated from gold mine rocks biofilms*. Adv. Mat. Res. 20-21, 575.
- FAROOQ A., 2014. *Oceans as microbial biofilms*. Biofilms6.univie.ac.at/fileadm/.../Programm Biofilms6_SCREEN.pdf
- FLEMMING H. C., 2014. *Biofilms – how microbes organize their social life*. Biofilms6.univie.ac.at/fileadm/.../Programm Biofilms6_SCREEN.pdf
- FOSTER K. R., 2014. *Cooperation and competition in microbial communities*. Biofilms6.univie.ac.at/fileadm/.../Programm Biofilms6_SCREEN.pdf
- FOURNIER D., LEMIEUX R., COUILLARD D., 1998. *Essential interactions between Thiobacillus ferrooxidans and heterotrophic microorganisms during wastewater sludge bioleaching process*. Environ. Poll. 101, 303-309.

- FRASES S., CHASKES S., DADACHOVA E., CASADEVALL A., 2006. *Induction by Klebsiella aerogenes of a melanin-like pigment in Cryptococcus neoformans*. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1542–1550.
- GOLUBEV W. I., PFEIFFER I., GOLUBEVA E., 2002. *Mycocin production in Trichosporon pullulans populations colonizing tree exudates in the springs*. FEMS Microbiol. Ecol. 40, 151–157.
- GORBY Y. A., YANINA S., MCLEAN J. S., RUSSO K. M., MOYLES D. i współaut. 2006. *Electrically conductive bacterial nanoviruses produced by Shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 11358–11363.
- HINDÁK F., WOŁOWSKI K., HINDÁKOVÁ A., 2011. *The epilithon of a cooling tower of the power plant at Běchatów, Poland*. Oceanol. Hydrobiol. Stud. 40, 38–48.
- HOGAN D. A., KOLTER R., 2002. *Pseudomonas-Candida interactions: and ecological role of virulence factors*. Science 296, 2229–2232.
- KAYE T. G., GAUGLER G., SAWLOWICZ Z., 2008. *Dinosaur soft tissues interpreted as bacterial biofilms*. PLOS One 3, e2808.
- KEMPE S., KAZMIERCZAK J., LANDMANN G., KONUK T., REIMER A., LIPP A., 1991. *Largest known microbialites discovered in Lake Van in Turkey*. Nature 349, 605–608.
- KIRKWOOD M. L., 2002. *Bacteria-fungi interactions: pathogenesis meets ecology*. Trends Microbiol. 10, 397–398.
- KONHAUSER K., 2007. *Introduction to Geomicrobiology*. Blackwell Publishing, Hong Kong.
- LEWANDOWSKI Z., STOODLEY P., 1995. *Flow induced vibrations, drag force, and pressure drop in conduits covered with biofilm*. Wat. Sci. Technol. 32, 19–26.
- LÓPES-ARCHILLA A. I., MARIN I., AMILS R., 1995. *Microbial ecology of an acidic river: biotechnological applications*. [W:] *Biohydrometallurgical processing. Proceedings of the International Biohydrometallurgical Symposium*. JEREZ C. A., VARGAS T., TOLEDO H., WIERTZ J. W. (red.). Vina del Mar, University of Chile, IBS-95, 2, 63–73.
- LOTSKÝ O., ROSA K., HINDÁK F., 1974. *Supis sinic a rias Slovenska*. Vydavateľstvo Slovenskej Akadémie Vied. Bratislava.
- LOVELOCK J. E., 1979. *Gaia: a new look at life on Earth*. Oxford, Oxford University Press.
- MARGULIS L., 2000. *Symbiotyczna planeta CiS*, Warszawa.
- MATYSZKIEWICZ J., KRAJEWSKI M., KĘDZIERSKI J., 2005. *Origin and evolution of Upper Jurassic complex of carbonate buildups from Zegarowe Rocks (Kraków-Wieluń Upland, Poland)*. DOI 10.1007/s10347-005-0038-9.
- MAY T., ITO A., OKABE S., 2006. *F-phenocopies: the characteristics of natural conjugative plasmid-bearing Escherichia coli biofilms*. [W:] *Proceedings of the 11th meeting of the International Society of Microbial Ecology*, 173.
- MILLE-LINDBLOM C., 2005. *Interaction between bacteria and fungi on aquatic detritus-causes and consequences*. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology 46, 1–42.
- NEU T., 2014. *The extracellular space of biofilm*. Biofilms6.univie.ac.at/fileadm/.../Programm_Biofilms6_SCREEN.pdf
- NURMIAHO-LÄSSILÄ E. L., TIMONEN S., HAAHTELA K., SEN R., 1997. *Bacterial colonization patterns of intact Pinus sylvestris mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study*. Can. J. Microbiol. 43, 1017–1035.
- RAFF R., RAFF E., 2008. *Bacterial biofilms as fossil markers* http://www.eurekalert.org/pub_releases/2008-11/iu-bba112108.php
- REITNER J., 2011a. *Biofilms* [W:] *Encyclopedia of Geobiology*. REITNER J., THIEL V. (red.), 134–135.
- REITNER J., 2011b. *Biofilms and fossilization* [W:] *Encyclopedia of Geobiology*. REITNER J., THIEL V. (red.), 136–137.
- SINGH R. S., SAINI G. K., KENNEDY J. F., 2008. *Pullulan: microbial sources, production and applications*. Carbohydr. Polym. 73, 515–531.
- SINGLETON P., 2005. *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. John Wiley & Sons, Chippenhaim.
- STOPAR D., DOGSA I., TOMCIC M., BENIGAR E., STOJKOVIC B., SRETONOVIC S., JAMNIK A., POBERAJ I., 2014. *Nanostructure of extracellular space in biofilms*. http://www.biofilms6.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/k_dynamical_properties/Programm_Biofilms6_SCREEN.pdf
- SUCI P. A., NITTELMAN M. W., YU F. P., GEESEY G. G., 1994. *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 2125–2133.
- SZULCZEWSKI M., 1971. *Upper Devonian conodonts stratigraphy and facies development in the Holy Cross Mts*. Acta Geol. Pol. 21, 1–129.
- TOMCZYK-ŻAK K., KACZANOWSKI S., GÓRECKA M., ZIELENKIEWICZ U., 2011. *Novel application of the MSSCP method in biodiversity studies*. J. Basic Microbiol. 51, 1–6.
- TOMCZYK-ŻAK K., KACZANOWSKI S., DREWNIAK Ł., DMOCH Ł., SKŁODOWSKA A. i współaut. 2013. *Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock-biofilm from an ancient gold and arsenic mine*. Sci. Total Environ. 461–462, 330–340.
- WARD D. M., FERRIS M. J., NOLD S. C., BATESON M. M., 1998. *A natural view of microbial diversity within hot spring cyanobacterial mat communities*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1353–1370.
- WOŁOWSKI K., 1989. *The algae occurring in an uncovered trickling filter of a sewage treatment plant in Cracow*. Arch. Hydrobiol. 82 (Suppl.), 207–239.
- WUTTKE M., 1983. *“Weichteilerhaltung” durch lithifizierte Mikroorganismen bei mittel-eozänen Ver-tebraten aus den Ölschiefern der “Grube Messel” bei Darmstadt*. Senckenbergiana Lethaena 64, 509–527.
- ZOBELL C. E., 1943. *The effect of solid surfaces upon bacterial activity*. J. Bacteriol. 46, 39–56.