Biofilmovi: višestaničnost kod bakterija

Mijakovac, Anika

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:719773

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

BIOFILMOVI: VIŠESTANIČNOST KOD BAKTERIJA

BIOFILMS: MULTICELLULARITY IN BACTERIA

SEMINARSKI RAD

Anika Mijakovac

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate study of biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Sadržaj

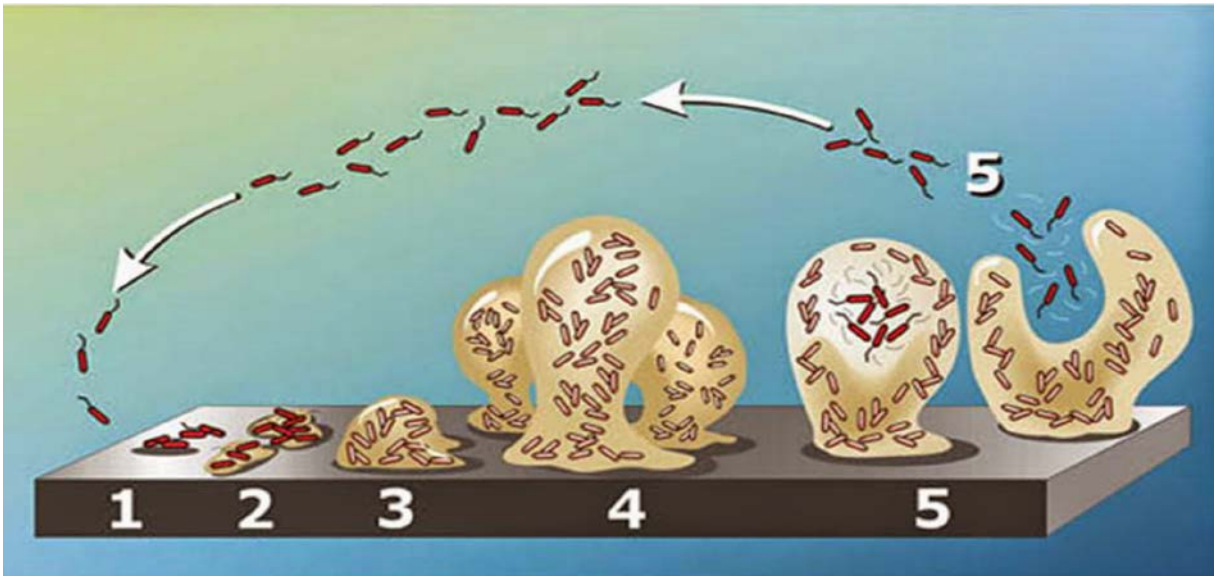
1. Uvod 3
2. Općeniti model stvaranja biofilmova 4
2.1. Pričvršćivanje bakterijskih stanica za površinu 4
2.2. Sazrijevanje biofilma 5
2.3. Disperzija bakterijskih stanica 6
3. Biofilmovi kao višestanični organizmi 7
3.1. Quorum sensing 7
3.2. Diferencijacija stanica 9
3.3. Podjela rada 10
3.4. Programirana stanična smrt 12
4. Biofilmovi kao zajednice bakterijskih stanica 12
4.1. Heterogenost bez koordinacije 13
4.2. Kooperacija i kompeticija 14
5. Zaključak 16
6. Literatura 17
7. Sažetak 20
8. Summary 20

1. Uvod

Bakterijske stanice su dugi niz godina predstavljale savršeni primjer jednostaničnih organizama (Claessen i sur. 2014). Danas znamo da većina mikroorganizama živi u kompleksnim zajednicama koje zovemo biofilmovi. Ovaj koncept je prvi formulirao J. W. Costerton (Nikolaev i Plakunov 2007) koji je i uveo pojam biofilmova u medicinu (Høiby 2017). Biofilmove možemo definirati kao visoko strukturirane i kompleksne zajednice bakterija povezane izvanstaničnim matriksom koji same izlučuju (Aguilar i sur. 2015). Takva strukturalna i fiziološka kompleksnost je dovela do ideje koja pretpostavlja da su biofilmovi analogni višestaničnom organizmu (Nadell i sur. 2008). Ova ideja koju je postavio James Shapiro 1988. godine se dosta preispituje. Svojstva kao mogućnost stanica da se međusobno povežu, komunikacija između stanica koja omogućuje koordinaciju aktivnosti i programirana stanična smrt su zajednička višestaničnim organizmima i bakterijama (Aguilar i sur. 2015). Ipak postoje i neke fundamentalne razlike od kojih se kao jedna od najbitnijih navodi nemogućnost biofilmova da postignu trajnu, ireverzibilnu diferencijaciju što je osnovno svojstvo tkiva višestaničnih organizama (Nikolaev i Plakunov 2007). Zbog toga neki autori biofilmove smatraju kompleksnim bakterijskim zajednicama (Nikolaev i Plakunov 2007, Watnick i Kolter 2000, Nadell i sur. 2008) dok drugi o biofilmovima govore kao o pravim višestaničnim organizmima (Webb i sur. 2003, Aguilar i sur. 2015, Claessen i sur. 2014).

2. Općeniti model stvaranja biofilmova

Bakterijske stanice moraju proći kompleksnu prostornu i vremensku reorganizaciju kako bi nastali biofilmovi. Stvaranje biofilma uključuje reverzibilne i ireverzibilne stadije koji mogu biti konzervirani, ali i specifični za određenu vrstu (Kostakioti i sur. 2013). Općeniti model stvaranja biofilma je prikazan na Slici 1



Slika 1. Shematski prikaz stvaranja biofilma. 1: Pričvršćivanje stanica na površinu. 2: Izlučivanje izvanstaničnih polimernih tvari te ireverzibilno pričvršćivanje bakterijskih stanica na površinu. 3: Početni razvoj arhitekture biofilma 4: Sazrijevanje arhitekture biofilma. 5: Disperzija bakterijskih stanica iz zrelog biofilma (Stoodley i sur. 2002).

2.1. Pričvršćivanje bakterijskih stanica za površinu

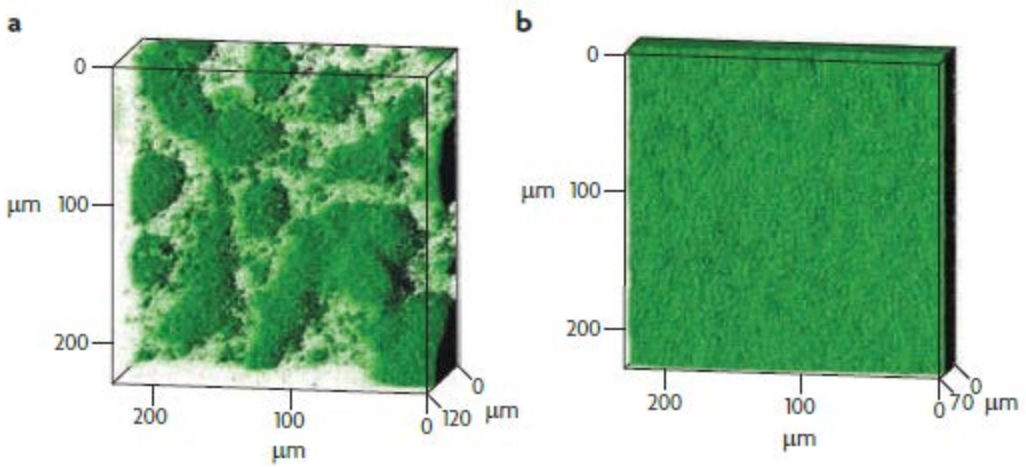
Prvotni kontakt bakterije i određene površine je uvjetovan Brownovim gibanjem, gravitacijom i hidrodinamikom pa možemo reći da je to stohastički proces. Hoće li bakterija biti privučena na površinu također ovisi o svojstvima medija kao što su dostupnost nutrijenata, pH, ionska snaga, temperatura te o površinskom sastavu bakterijske stanice. (Kostakioti i sur. 2013). Bakterije povećavaju svoju ljepljivost izlučivanjem adhezina te se tako vežu za površinu te jedna za drugu (Lemon i sur. 2008). Ovakvo vezanje smatramo reverzibilnim jer bakterije lako mogu izaći iz takve asocijacije. Ireverzibilno vezanje za površinu varira od vrste do vrste. Neki sojevi *Escherichia coli* ireverzibilno vezanje postižu

pomoću pila tipa 1, adhezivnih organela sastavljenih od nekoliko podjedinica. Pričvršćivanje je posredovano adhezinom FimH koji se nalazi na vrhu pila. Bakterije roda Enterococcus koriste različite tipove adhezina kao što su SagA, Ace i Acm koji vežu kolagen, a vrsta *Pseudomonas aeruginosa* koristi bičeve i pile tipa 4 (Kostakioti i sur. 2013).

2.2. Sazrijevanje biofilma

Nakon kontakta bakterijskih stanica s podlogom dolazi do promjena u ekspresiji gena te se počinje stvarati izvanstanični matriks (Kostakioti i sur. 2013). Izvanstanični matriks (ECM) se sastoji od tzv. izvanstaničnih polimernih tvari (EPS) koje uključuju polisaharide, lipide, nukleinske kiseline i proteine. Izvanstanični matriks stvara trodimenzinalnu polimernu mrežu koja povezuje i imobilizira stanice u biofilmu. Mutanti koji ne mogu sintetizirati izvanstanične polimerne tvari često ne mogu stvoriti zreli biofilm ili on ima promijenjenu morfologiju. Jedan od primjera je sinteza alginata, polisaharida uključenog u stvaranje biofilmova bakterije *P. aeruginosa*. Mutanti koji ne mogu proizvoditi alginat stvaraju plosnate i strukturalno homogene biofilmove. Utjecaj alginata na morfologiju biofilma prikazan je na slici 2. Bitnu strukturalnu ulogu ima izvanstanična DNA koja se otpušta u matriks autolizom stanica ili ima strano podrijetlo ovisno o vrsti. Kod bakterije *P. aeruginosa* dodavanje Dnaze koja razgrađuje DNA u potpunosti inhibira stvaranje biofilma. Uloga proteina u matriksu može biti enzimatska i strukturalna. Enzimi razgrađuju polimere kako bi oslobodili nutrijente koje bakterija može uzimati te su bitni u disperziji stanica. Strukturalni proteini stabiliziraju polisaharide te služe kao poveznica između bakterijske površine i samog matriksa. Lipidi također imaju bitnu ulogu kod mnogih bakterijskih vrsta. Bakterije *Thiobacillus ferrooxidans* i *Serratia marcescens* trebaju lipide kako bi se pričvrstili na površinu. Iz ovih primjera je očito da ECM određuje morfologiju biofilmova te stvaranje, sazrijevanje i održavanje strukturirane višestaničnosti bakterijskih zajednica u potpunosti ovisi o proizvodnji EPS-a (Flemming i Wingender 2010).

Sam proces sazrijevanja rezultira kompleksnom promjenom arhitekture biofilma. Dolazi do stvaranja kanala i pora te do redistribucije stanica u biofilmu. Promjena arhitekture biofilma je popraćena promjenom u ekspresiji gena te je pokazano da 50 % tada detektiranog proteoma zrelog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ima promjenu u ekspresiji (Stoodley i sur. 2002).



Slika 2. Snimke *P. aeruginosa* biofilma laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. a) Soj s prekomjernom ekspresijom alginata koji tvori nejednaki biofilm s puno izbočina; b) Soj koji ne može proizvesti alginate stvara plosnati, glatki biofilm.

2.3. Disperzija bakterijskih stanica

Nakon što biofilm sazrije bakterija ga mogu napustiti i vratiti se u planktonski način života. Napuštanje biofilma može biti pasivno zbog mehaničkog stresa ili inducirano različitim okolišnim faktorima kao što su dostupnost nutrijenata, fluktuacija u količini kisika, povećanje toksičnih tvari, itd. Npr. disperzija stanica kod vrste *P. aeruginosa* se događa u uvjetima povećane količine tvari bogatih ugljikom i dušikom.

Postoje razni sustavi koji detektiraju promjene u okolišu te dovode do promjene ekspresije gena. Dosta istraživana signalna molekula koja je ključna u disperziji bakterija je ciklički digvanilat (c-di-GMP) kod bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa*. Manjak c-di-GMP-a uzrokuje povećanje pokretnosti bakterijskih stanica te time inducira disperziju. Osim njega bitnu ulogu u ovom procesu ima c-di-GMP vezujući protein, BdcA, koji smanjuje količinu dostupnog c-di-GMP-a te time smanjuje proizvodnju EPS-a i povećava pokretljivost stanica.

Kako bi stanice uspješno napustile biofilm ECM se mora razgraditi. Zato se luče razni enzimi te surfaktanti koji ometaju interakcije bakterija s površinom. Zanimljiv način

disperzije je otkriven kod vrste *P. aeruginosa* gdje dolazi do stanične smrti dijela bakterija što omogućuje disperziju okolnih stanica. Bakterije koje su napustile biofilm mogu ga ponovno stvoriti na novoj površini (Kostakioti i sur. 2013).

3. Biofilmovi kao višestanični organizmi

Višestanični organizmi se najjednostavnije mogu definirati kao nakupine međusobno povezanih stanica. Malo stroža definicija višestaničnosti uključuje komunikaciju između stanica te njihovu diferencijaciju u različite stanične tipove (Niklas i Newman 2013). U prethodnom poglavlju je opisan općeniti model stvaranja bakterijskog biofilmova iz kojeg se vidi da je mogućnost povezivanja bakterija u agregat osnova za nastanak biofilma. Pokazano je da su komunikacija između stanica te diferencijacija stanica također osnovne karakteristike biofilmova, kao i programirana stanična smrt, proces neophodan za razvoj višestaničnih organizama (Claessen i sur. 2014).

3.1. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) je naziv za mehanizam kojim bakterijske stanice komuniciraju jedna s drugom. Komunikacija ovisi o produkciji, otpuštanju te detekciji malih signalnih molekula čime bakterije reguliraju ekspresiju gena. Signalne molekule uključene u QS kod bakterija su podijeljene u 3 razreda: oligopeptidi, autoinduceri i acil homoserin laktoni (Hooshangi i Bentley 2008). U visokim koncentracijama ove molekule induciraju kaskadni prijenos signala koji dovodi do specifičnog odgovora stanice. QS kontrolira razne procese kod bakterija uključujući i stvaranje biofilmova (Lopez i sur. 2010). Pokazano je da QS regulira proizvodnju i degradaciju egzopolisaharida kod mnogih bakterija. Primjer takve regulacije otkriven je kod bakterije *Pantoea stewartii* koja koristi EsaI/EsaR QS sustav kako bi kontrolirala proizvodnju stewartana, polimera glukoze, galaktoze u glukoronske kiseline. Mutanti defektni u ovom QS sustavu formiraju nestrukturirane i plosnate biofilmova. QS kod bakterija je odgovoran i za proizvodnju izvanstanične DNA. Otkriveno je da mutanti u QS genima lasI/rhlI imaju smanjenu količinu izvanstanične DNA u matriksu. Disperzija stanica

je također regulirana QS sustavom. Dodavanjem acil homoserin laktona u biofilmove bakterije *Rhodobacter sphaeroides* i *Yersinia pseudotuberculosis* dolazi do disperzije stanica (Aguilar i sur. 2015). Utjecaj pojedinih QS sustava na biofilmove je prikazan u tablici 1.

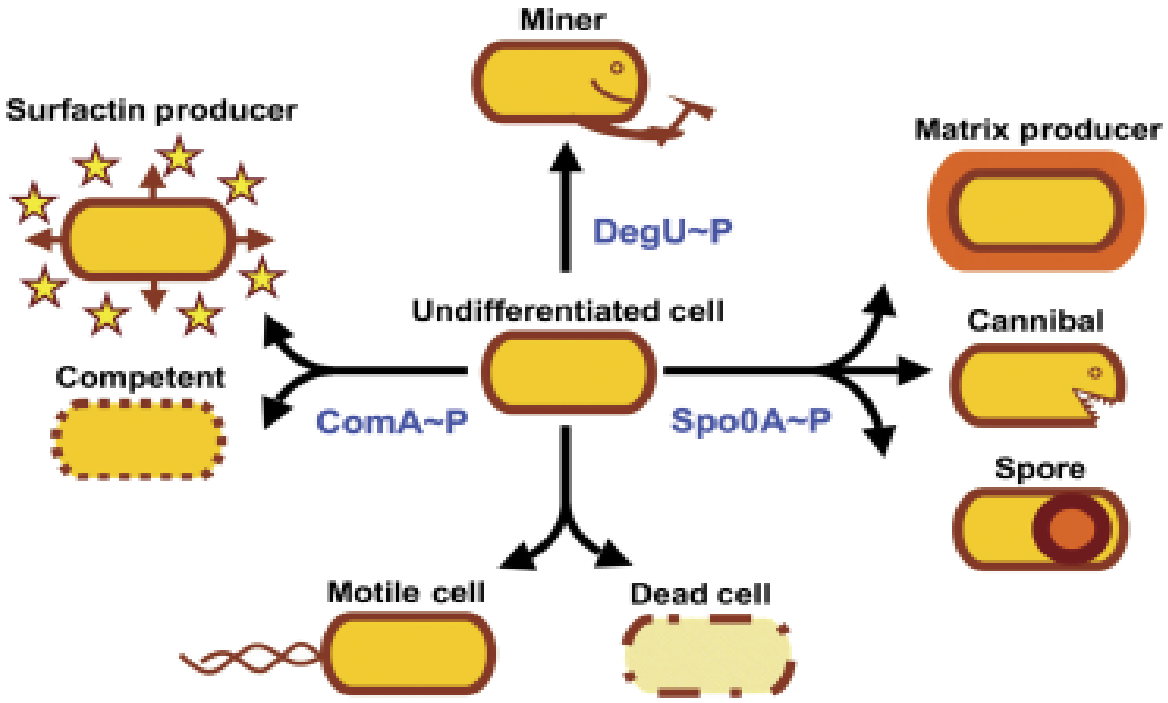
Većina signalnih molekula uključenih u QS djeluju autokrino odnosno sve stanice u populaciji proizvode i odgovaraju na isti signal. U stvaranju biofilma bakterije *Bacillus subtilis* između ostalog sudjeluju signalna molekula surfaktin. Jedna subpopulacija stanica u biofilmu proizvodi surfaktin dok druga odgovara na proizvodnju ove signalne molekule te zauzvrat stvara ECM. Stanice koje proizvode surfaktin ne reagiraju na njega i ne proizvode ECM. To je primjer parakrinog signaliziranja što je još jedna karakteristika koju biofilmovi dijele s višestaničnim organizmima (Lopez i sur. 2009).

Tablica 1. Učinak onesposobljenog QS sustava na razvoj biofilmova pojedinih vrsta bakterija (Irie i Parsek, 2008).

Bakterija	Onesposobljeni QS sustav	Učinak na biofilm
Aeromonas hydrophila	Ahy	Nemogućnost sazrijevanja biofilma
Burkholderia cenocepacia	Cci	Osjetljivost biofilma na SDS
Klebisella pneumoniae	AI-2	Odgođen razvoj biofilma
P. aeruginosa	Las	Plosnat, nestrukturiran biofilm osjetljiv na SDS
Pseudomonas putida	Ppu	Više strukturiran biofilm s izraženijim mikrokolonijama i kanalima
Serratia liquefaciens	Swr	Tanji biofilm
Serratia marcescens	Swr	Nemogućnost disperzije stanica

3.2. Diferencijacija stanica

Kod mnogih biofilmova dolazi do diferencijacije bakterijskih stanica u različite stanične tipove promjenom ekspresije gena. *B. subtilis* je bakterija tla kod koje je ovaj proces najviše istraživan zbog izrazite kompleksnosti njenih biofilmova te je uočeno nekoliko staničnih tipova (Aguillar i sur. 2015). U prvom stadiju razvoja *B. subtilis* biofilma, gdje dolazi do eksponencijalnog rasta, većina stanica se diferencira u pokretne stanice. U stacionarnoj fazi signalna molekula ComX uzrokuje diferencijaciju u stanice koje proizvode surfaktin te u kompetentne stanice koje mogu primiti izvanstaničnu DNA. Proizvodnja surfaktina uzrokuje daljnju diferencijaciju u stanice koje proizvode matriks/kanibalne stanice. Ove stanice osim stvaranja izvanstaničnog matriksa proizvode i dvije vrste peptidnih toksina. Ovi toksini ubijaju ostale stanice te se time otpuštaju nutrijenti kako bi se odgodio proces sporulacije dok su same stanice koje proizvode toksine imune na njih. U zadnjem koraku razvoja *B. subtilis* biofilma, kada se potroše nutrijenti, stanice se diferenciraju u one koje proizvode egzopreoteaze te u sporulirajuće stanice. Spore su metabolički inaktivne stanice koje omogućuju preživljavanje bakteriji u nepovoljnim uvjetima. Svi ovi procesi su pod kontrolom tri glavna regulatora: Spo0A, DegU i ComA kao što prikazuje Slika 3. (Lopez i Kolter 2010). Kompleksna regulacija te organizacija stanica u različite stanične tipove je još jedno svojstvo zajedničko biofilmovima i višestaničnim organizmima (Lopez i sur. 2008).

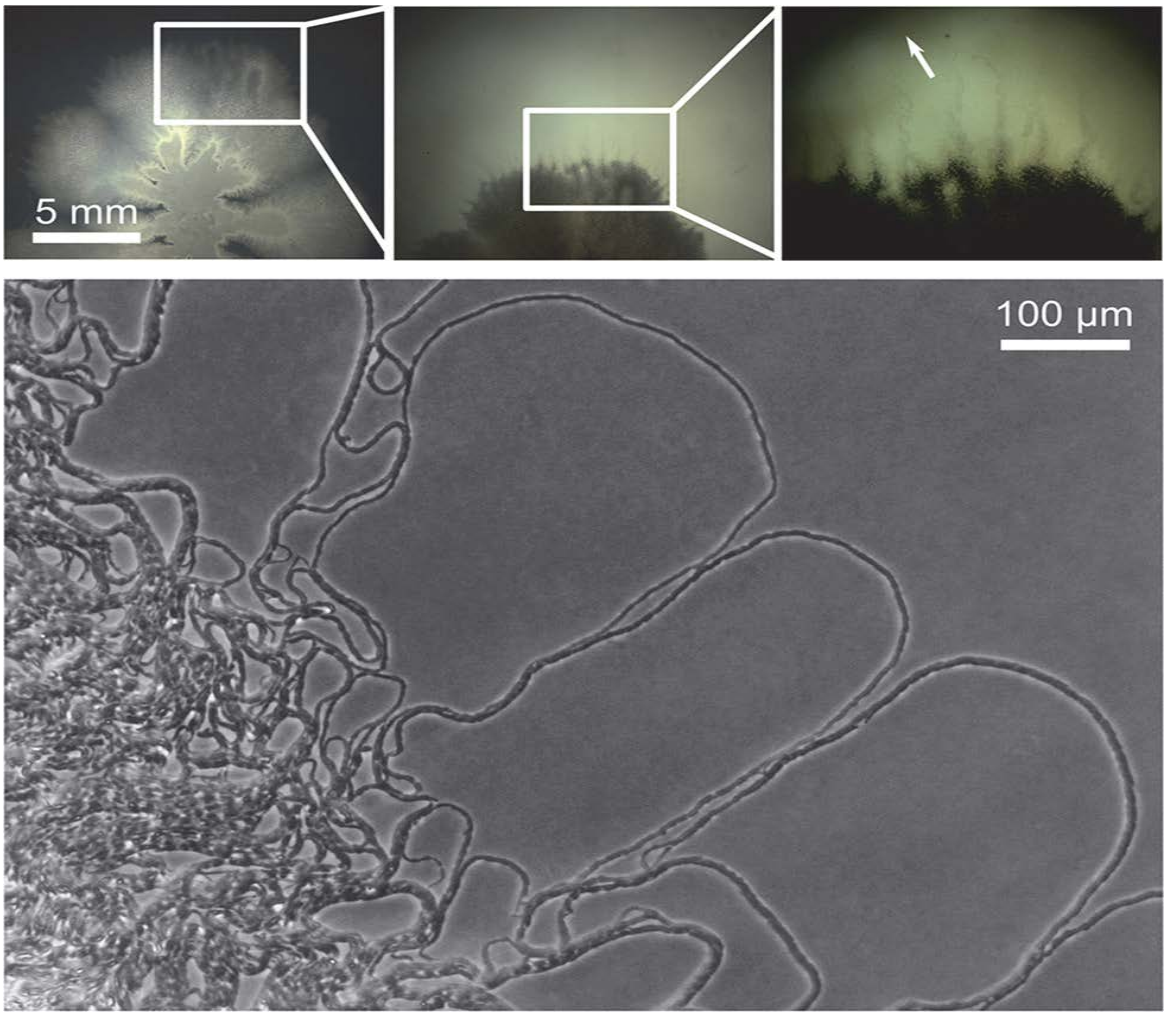


Slika 3. Shematski prikaz različitih staničnih tipova bakterije *B. subtilis*. Strelice pokazuju proces diferencijacije. Glavni regulatori su prikazani plavom bojom. Mrtve stanice su također prikazane iako one ne spadaju u poseban stanični tip (Lopez i Kolter 2010).

3.3. Podjela rada

Višestanični organizmi su sastavljeni od mnogo različitih stanica koje obavljaju specifične zadatke. Osim same diferencijacije stanica višestaničnost podrazumijeva i kooperaciju između različitih staničnih tipova odnosno podjelu rada. Bitno je naglasiti da postojanje različitih staničnih tipova ne mora za posljedicu imati podjelu rada. Diferencijacija stanica odnosno fenotipska specijalizacija bez kooperacije može predstavljati samo prilagodbu stanica na trenutne okolišne uvjete. Razlika između fenotipske specijalizacije i podjele rada se ogleda u fitnessu stanice odnosno kolonije. Ako je fitness kolonije povećan, a fitness individualne stanice smanjen došlo je do podjele rada, a ne samo do prilagodbe stanica na trenutne uvjete (van Gestel i sur. 2015a). U prethodnom je poglavlju na primjeru bakterije *B. subtilis* pokazano da kod biofilmova dolazi do diferencijacije stanica. Dvije vrste tih stanica također i surađuju kako bi omogućili migraciju stanica *B. subtilis* biofilma neovisnu o bičevima. S obzirom da je *B. subtilis* bakterija tla migracija je jako bitna za pokretanje s jedne čestice tla na drugu. Stanice koje izlučuju matriks te stanice koje proizvode surfaktin su

odgovorne za migraciju bakterija u *B. subtilis* biofilmu. Ovaj tip migracije ovisi o posebnim strukturama koje se zovu van Gogh snopovi. Oni se sastoje od filamenata koji sadrže stanice povezane u lance. Stanice koje izlučuju matriks omogućuju stvaranje van Gogh snopova dok stanice koje proizvode surfaktin smanjuju trenje između bakterija i površine. Na taj način se van Gogh snopovi pomiču sve dalje od kolonije stvarajući filamentne omče i omogućuju migraciju bakterija. Slika 4 prikazuje van Gogh snopove te filamentne omče pomoću kojih bakterije postižu migraciju (van Gestel i sur. 2015b).



Slika 4. van Gogh snopovi i filamentne omče na kraju na rubu *B. subtilis* biofilma starog 28 h. Prve tri slike predstavljaju 3 različita povećanja istog dijela kolonije. Donja slika predstavlja van Gogh snopove pod velikim povećanjem (van Gestel i sur. 2015).

3.4. Programirana stanična smrt

Programirana stanična smrt je ključan proces u razvoju višestaničnih organizama. Otkriveno je da regulirana stanična smrt ima bitnu ulogu i u stvaranju biofilmova (Bayles 2007). Izvanstanična DNA je važna komponenta ECM-a koja doprinosi stabilnosti bakterija u biofilmu promovirajući povezivanje stanica. QS mehanizmi reguliraju staničnu smrt dijela bakterijske populacije kako bi se otpustila izvanstanična DNA. U uvjetima gladovanja dio stanica autolizira kako bi se oslobodili nutrijenti potrebni ostalim bakterijskim stanicama da koloniziraju nova mjesta (Allocati i sur. 2015). Kod *B. subtilis* biofilmova stanična smrt prostorno fokusira mehaničke sile te time uzrokuje stvaranje bora. Što je više bakterija prošlo kroz proces stanične smrti to su bore izraženije. S obzirom da boranje čini biofilmove rezistentnijima na prodor tekućina i plinova, stanična smrt u ovoj slučaju ima ulogu u bakterijskom odgovoru na stres (Asally i sur. 2012). Stanična smrt također ima ulogu u disperziji bakterija te mnogim drugim procesima uključenim u životni ciklus biofilmova (Allocati i sur. 2015). Pokazana je visoka funkcionalna analogija između događaja koji dovode do stanične smrti eukariota i bakterija te postoji mogućnost da neki regulatornih proteini eukariota, uključeni u programiranu staničnu smrt, imaju bakterijsko podrijetlo (Bayles 2014).

4. Biofilmovi kao zajednice bakterijskih stanica

Biofilmovi definitivno imaju jako puno zajedničkih karakteristika s višestaničnim organizmima, ali se razlikuju u nekoliko aspekata. Razvoj višestaničnih organizama započinje jednom stanicom kod koje dolazi do proliferacije dok biofilmovi nastaju agregacijom stanica jedne ili više vrsta bakterija. Biofilmovi su često sačinjeni od različitih vrsta bakterija što za posljedicu ima izražen konflikt između individualnih stanica. Zbog toga se o biofilmovima nekad govori kao o zajednicama stanica analognim jatu ptica ili roju pčela u životinjskom svijetu. Kompeticija je jako izražena u biofilmovima koji se sastoje od više vrsta te je pokazano da nekooperativne jedinke proliferiraju u takvoj asocijaciji te kompromitiraju debljinu i rast biofilmova. Ovakvo ponašanje podiže pitanje mogu li se stanice u biofilmu ponašati kooperativno i koordinirano (Claessen i sur. 2014).

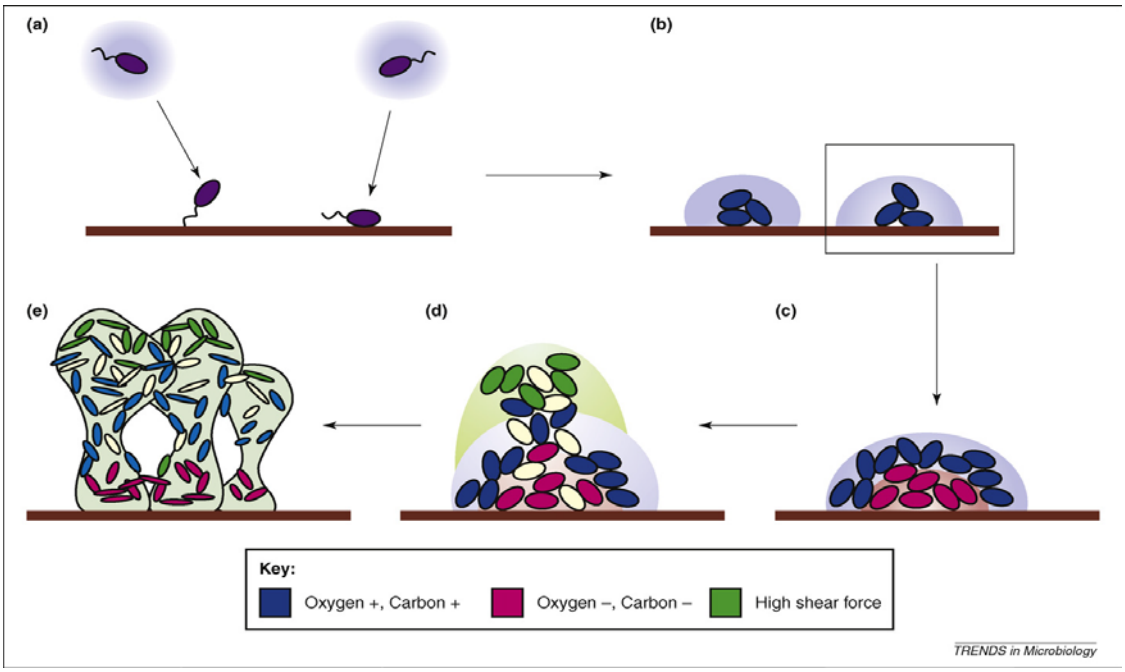
4.1. Heterogenost bez koordinacije

Fiziološka heterogenost i prostorna organizacija je fundamentalna karakteristika biofilmova. Takva heterogenost ne mora nužno biti produkt kooperativnog i koordiniranog ponašanja bakterijskih stanica unutar biofilma. Ona može biti rezultat prilagodbe ponašanja bakterija na trenutne okolišne uvjete i kompeticije za limitirane resurse. Mnogi organizmi tvore kompleksne agregate te su napravljeni modeli koji pokazuju da za takvu asocijaciju kooperacija nije nužna. Jedan primjer toga je skupina organizama koji se kreću u rojevima gdje svaka jedinka slijedi jednostavan skup uputa: odmakni se od jedinki koje su preblizu; poravnaj se s jedinkama koje su srednje daleko; ne odvajaj se od skupine. Ovaj model je pokazao da organizmi mogu biti u kompleksnoj asocijaciji bez koordinacije i komunikacije između jedinki.

Fiziološka heterogenost biofilmova lako može proizaći iz prilagodbe bakterija na lokalne uvjete. Gustoća stanica u biofilmu je jako visoka što usporava struju vode te time i difuziju. Smanjenje difuzije unutar biofilma stvara kompleksne kemijske gradijente zbog koji nastaju mnoge mikroniše. To uzrokuje fiziološku heterogenost bakterija zbog prilagodbe ponašanja na lokalne uvjete u biofilmu. Primjer toga su veliki aerobni biofilmovi gdje je potrošnja kisika moguća samo u gornjem dijelu biofilma dok u unutarnjim dijelovima dolazi do anoksije. Zbog toga se stanice u unutarnjim dijelovima moraju prebaciti na anaerobni metabolizam kako bi preživjele.

Prostorna heterogenost je jako izražena kod biofilmova sastavljenih od više bakterijskih vrsta. Do stratifikacije dolazi jer bakterije s različitim metaboličkim aktivnostima zaokupljaju drugačije slojeve biofilma. Neki bi pomislili da se bakterije organiziraju unutar biofilma kako bi maksimizirale produktivnost svakog soja. Ipak kooperacija je moguća samo u restriktivnim uvjetima te je uzrok stratifikacije najčešće kompeticija koja gura pojedinu vrstu u odvojenu nišu (Nadell i sur. 2009).

Pretpostavka da biofilmovi mogu nastati bez koordinacije dovela je do razvoja tzv. individualističkog modela nastanka biofilmova baziranog na lokalnoj adaptaciji individualnih stanica. Ovaj model pretpostavlja da se bakterije u biofilmu ponašaju jednako zbog toga što se nalaze u istoj mikroniši, a ne zbog postojanja regulirane koordinacije grupne aktivnosti. Teoretsku simulaciju ovog procesa prikazuje slika 5 (Monds i O'Toole 2009).



Slika 5. Teoretska simulacija nastanka biofilma bazirana na individualističkom modelu. a) Dvije bakterijske stanice se pričvršćuju za površinu neovisno jedna o drugoj (plave stanice); b) Stanice imaju dovoljno kisika i ugljika te se neometano dijele; c) Stanice počinju rasti jedna na drugoj te se formira mikrokolonija. Stanice na dnu mikrokolonije nemaju pristup ugljiku i kisiku te dolazi do njihove adaptacije na lokalne uvjete (crvene stanice). Javlja se fenotipska heterogenost unutar mikrokolonije; d) Neke stanice počinju proizvoditi više izvanstaničnih polimernih tvari (bijele stanice) te promoviraju vertikalni rast biofilma. Stanice na vrhu dobivaju više ugljika i kisika zbog vertikalne topologije te biofilm sve brže raste u visinu. Zbog toga stanice na vrhu dolaze pod utjecaj sile smicanja i prilagođavaju se novom mikrookolišu povećavajući heterogenost biofilma (zelene stanice); e) Zreli biofilm (Monds i O'Toole 2009).

4.2. Kooperacija i kompeticija

Višestanični organizmi zahtijevaju visoku razinu kooperacije između stanica kako bi funkcionirali (Niklas i Newman 2013). Bakterije u biofilmovima također pokazuju kooperativno ponašanje iako to ne mora uvijek biti slučaj. U prethodnom poglavlju je opisan quorum sensing sustav koji bakterije koriste kako bi komunicirale. Izlučivanje signalnih molekula predstavlja kooperativno ponašanje jer bakterija daje informacije koje se koriste za dobrobit cijele skupine. Otkriveno je da su mnoge signalne molekule zapravo otpadni produkti što znači da takvo ponašanje nije kooperativno. Jedan primjer je autoinducer 2 koji je zapravo otpadni produkt nastao razgradnjom S-adenozilhomocisteina. Izlučivanje izvanstaničnih polimernih tvari se također smatra kooperativnim činom, ali je otkriveno da

ponekad posreduje kompeticiju. Mutanti bakterije *Vibrio cholerae* koji konstitutivno stvaraju EPS brzo nadvladaju bakterije koje proizvode malo EPS-a. Također je pokazano da izlučivanje EPS-a gura bakterije kćeri prema površini biofilma koja je bogata kisikom istovremeno gušeći sve stanice koje ne proizvode EPS. Programirana stanična smrt je možda isto proces koji uzrokuje konflikt gdje se stanice bakterije kao što je *B. subtilis* natječu kako bi postale spore (Nadell i sur. 2008).

5. Zaključak

Bakterijski biofilmovi su postali središte mikrobioloških istraživanja u proteklih desetak godina. Otkrićem njihove rasprostranjenosti i uloge u okolišu, počelo se postavljati pitanje jesu li oni samo zajednice bakterijskih stanica ili su sličniji pravim višestaničnim organizmima. Mnogi procesi koji se odvijaju tokom razvoja biofilmova zaista nalikuju procesima kod višestaničnih organizama. Kompleksni sustav komunikacije, diferencijacija stanica, podjela rada između različitih staničnih tipova su samo neke od zajedničkih karakteristika biofilmova i višestaničnih organizama. Svi ovi procesi su strogo regulirani i koordinirani kako bi došlo do pravilnog razvoja biofilmova. Može se reći da bakterijski biofimovi predstavljaju primitivan oblik višestaničnog organizma i zbog toga mogu poslužiti kao dobra podloga za istraživanje mehanizama koji dovode do višestaničnosti. Bitno je za naglasiti da su daljnja istraživanja definitivno potrebna. Zadnje poglavlje daje alternativnu hipotezu o ustrojstvu biofilmova. Pokazano je da koordinacija nije uvijek potrebna kako bi se stvorile kompleksne zajednice organizama. Zbog toga je potrebno usmjeriti istraživanja prema otkrivanju gena koji su zaslužni za pojedine procese te dosadašnja otkrića o životnom ciklusu bakterija staviti u evolucijski i ekološki kontekst. S obzirom da biofilmovi imaju bitnu ulogu u rezistenciji bakterija na antibiotike i predstavljaju veliku prijetnju u području medicine, ovakva istraživanja su od iznimne važnosti. Jedan od primjera je istraživanje kompeticije i kooperacije. Ako su bakterije u kooperativnom odnosu unošenjem probiotika promoviramo kompeticiju koja će omesti razvoj biofilma. Ako su pak bakterije u kompeticiji antibiotici će dati bolji rezultat smanjujući bioraznolikost zajednice (Nadell i sur. 2008). Zato je jako važno primijeniti i sociobiologiju kad govorimo o mikrobiološkim istraživanjima. Iako postoje još mnogi neistraženi elementi životnog ciklusa bakterija višestaničnost u obliku biofilmova postaje općeprihvaćena karakteristika velikog broja bakterijskih vrsta, a sami biofilmovi se više ne smatraju pukim zajednicama individualnih organizama već pravim višestaničnim organizmima.

6. Literatura

Aguilar, C., Eichwald, C., Eberl, L. (2015). Multicellularity in Bacteria: From Division of Labor to Biofilm Formation. In: Ruiz-Trillo, I., Nedelcu, A. (eds). Evolutionary Tranistions to Multicellular Life. Advances in Marine Genomics, 2, 79-95.

Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2015). Die for the communitiy: an overview of programmed cell death in bacteria. Cell Death and Disease, 6, e1609.

Asally, M., Kittisopikul, M., Rue, P., Du, Y., Hu, Z., Cagatay, T., Robinson, A. B., Lu, H., Garcia-Olajvo, J., Suel, G. M. (2012). Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, 18891-18896.

Bayles, K. W. (2014). Bacterial Programmed Cell Death: Making Sense of a Paradox. Nature Reviews Microbiology, 12, 63-69.

Bayles, K. W. (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. Nature Reviews Microbiology, 5, 721-726.

Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Søgaard-Andersen, L., van Wezel, G. P. (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. Nature Reviews Microbiology, 12, 115-124.

Flemming, H. C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8, 623-633.

Hooshangi, S., Bentley, W. E. (2008). From unicellular properties to multicellular behaviour: bacteria quorum sensing circuitry and applications. Current Opinion in Biotechnology, 19, 550-555.

Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and microbial infections. APMIS, 125, 272-275.

Irie, Y., Parsek, M. R. (2008). Quorum Sensing and Microbial Biofilms. In: Romeo, T. (eds) Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Imunnology, 322, 67-84.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. (2013). Bacterial Biofilms: Development, Dispersal and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 3, a010306.

Lemon, K. P., Earl, A. M., Vlamakis, H. C., Aguilar, C., Kolter, R. (2008). Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis.* In: Romeo, T., (eds). Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, 1-16.

Lopez, D., Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews, 34, 134-149.

Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2, a000398.

Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009). Paracrine signaling in a bacterium. Genes & Development, 23, 1631-1638.

Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R, (2008). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews, 33, 152-163.

Monds, R. D., O'Toole, G. A. (2009). The developmental dodel of microbial biofilms: ten years of paradigm up for review. Trends in Microbiology, 17, 73-87.

Nadell, C. D., Xavier, J. B., Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiology Review, 33, 206-224.

Niklas, K. J., Newman S. A. (2013). The origins of multicellular organisms. Evolution & Development, 15, 41-52.

Nikolaev, Yu. A., Plakunov, V. K. (2007). Biofilm – "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms. Microbiology, 76, 125-138.

Shapiro, J. A. (1988). Bacteria as Multicellular Organisms. Scientific American, 258, 82-89.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annual Review of Microbiology, 56, 187-209.

van Gestel, J., Kolter, R., Vlamakis, H. (2015a). Division of Labor in Biofilms: the Ecology of Cell Differentiation. Microbiology Spectrum, 3, 1-24.

van Gestel, J., Kolter, R., Vlamakis, H. (2015b). From Cell Differentiation to Cell Collectives: *Bacillus subtilis* Uses Division of Labor to Migrate. PLOS Biology, 13, e1002141.

Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, City of Microbes. Journal of Bacteriology, 182, 2675-2679.

Webb, J. S., Givskov, M., Kjelleberg S. (2003). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. Current Opinion in Microbiology, 6, 578-585.

7. Sažetak

Prije skoro 30 godina bakterije su prvi puta prepoznate kao višestanični organizmi (Shapiro 1988). One imaju sposobnost organizacije u kompleksne zajednice koje zovemo biofilmovi. Stvaranje biofilmova je reguliran proces u kojem dolazi do agregacije stanica i njihovog povezivanja uz pomoć izvanstaničnog matriksa koji same izlučuju. Kako bi nastao zreli biofilm dolazi do promjena u ekspresiji gena te bakterije razvijaju nove karakteristike koje čine biofilmove sličnim višestaničnim organizmimima. Uloga biofilmova u medicini i industriji je prilično velika te je razumijevanje procesa koji dovode do stvaranja biofilmova od iznimne važnosti. U ovom radu je dan kratak opis stadija uključenih u razvoj biofilmova te je povučena analogija između osnovnih karakteristika biofilmova i višestaničnih organizama. Također je predstavljena alternativna hipoteza koja prikazuje biofilmove kao zajednice individualnih stanica.

8. Summary

Almost 30 years ago, for the first time, bacteria were recognized as multicellular organisms (Shapiro 1988). They have the ability to organize themselves into complex communities named biofilms. Biofilm formation is a regulated process in which cells aggregate and connect via self secreted extracellular matrix. In order for a mature biofilm to form, a shift in bacterial gene expression occurs and bacteria consequently develop new features that make biofilms and multicellular organismis much alike. The role of biofilms in medicine and industry is quite big so the understanding of the processes that lead to biofilm formation is of the utmost importance. This article gives a short description of steps involved in biofilm formation and draws analogies between fundamental characteristics of bacterial biofilms and multicellular organsims. It also gives an alternative hypothesis in which biofilms are seen as communities of individual cells.