

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Βιομεμβράνες – Άνθρωπος – Περιβάλλον

Οι μικροοργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον δεν διαβιούν αποκλειστικά ως ελεύθερα κύτταρα μέσα στην υγρή φάση, αλλά προσκολλημένοι σε κάποια έμβια ή μη επιφάνεια, αρκεί αυτή να είναι επαρκώς υγρή. Τα βακτήρια αυτά παράγουν ένα εξωκυτταρικό πολυμερές, που μαζί με άλλα συστατικά δημιουργούν πολύπλοκες και πολυσύνθετες δομές, τις βιομεμβράνες (biofilms). Η μορφή των βιομεμβρανών ποικίλλει ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της προσκολλημένης μορφής των βακτηρίων είναι η καλύτερη εκμετάλλευση των θρεπτικών στοιχείων του περιβάλλοντος και η αυξημένη προστασία που απολαμβάνουν. Εμφανίζουν, δηλαδή, ένα νέο φαινότυπο με κύρια χαρακτηριστικά το διαφοροποιημένο μεταβολισμό τους, την αυξημένη αντοχή σε αντιβιοτικά και απολυμαντικά, την αυξημένη ανταλλαγή γενετικού υλικού με όλες τις επακόλουθες συνέπειες και τη δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ τους μέσω ειδικών μορίων-σημάτων. Οι επιπτώσεις από την ανάπτυξη των βιομεμβρανών, τόσο στην υγεία του ανθρώπου όσο και σε διάφορες δραστηριότητές του, καθιστούν περισσότερο επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω μελέτης και διερεύνησης των παραγόντων και των συνθηκών που επηρεάζουν τη δημιουργία τους, με απώτερο στόχο τον έλεγχο και την αποτελεσματική αντιμετώπιση ή εκμετάλλευσή τους.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια στο φυσικό τους περιβάλλον δεν υπάρχουν αποκλειστικά ως ελεύθερα κύτταρα, αλλά προσκολλημένα σε κάποια έμβια ή μη επιφάνεια, αρκεί αυτή να είναι επαρκώς υγρή.

Περιβάλλονται από ένα εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό, που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια, δημιουργώντας πολύπλοκες δομές που ονομάζονται *βιομεμβράνες (biofilms)*.

Κάποιες πολύ γνωστές βιομεμβράνες είναι η οδοντική πλάκα, η γλιστερή επιφάνεια στις πέτρες των ποταμών, το υμένιο στο εσωτερικό των βάζων όπου διατηρούμε λουλούδια για πολλές ημέρες. Γενικά, βιομεμβράνες σχηματίζονται σε οποιαδήποτε επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το νερό ή και με άλλα υγρά.

Στην προσκολλημένη (*sessile*) τους μορφή τα βακτήρια εκφράζουν ένα διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα μη προσκολλημένα (*planctonic*). Έτσι, εμφανίζουν

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2007, 24(5):411-431
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2007, 24(5):411-431

Z. Μελαμπιανάκη,^{1,2}
Ε. Βεληνάκης,²
Α. Βατόπουλος²

¹Υπηρεσία Ελέγχου Ποιότητας Ύδατος,
ΕΥΔΑΠ, Αθήνα

²Τομέας Μικροβιολογίας, Εθνική Σχολή
Δημόσιας Υγείας, Αθήνα

Biofilms, man, environment

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανθρώπινο περιβάλλον
Βιομεμβράνες
Δίκτυο ύδρευσης
Legionella

Υποβλήθηκε 29.12.2005
Εγκρίθηκε 1.6.2006

νέες ιδιότητες, όπως διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη αντοχή στα απολυμαντικά και τα αντιβιοτικά, αυξημένο ρυθμό ανταλλαγής γενετικού υλικού, αυξημένη δυνατότητα εξουδετέρωσης της άμυνας του ξενιστή και επικοινωνία μεταξύ τους μέσω παραγωγής ειδικών μορίων-σημάτων.

Η συσχέτιση των βιομεμβρανών με χρόνιες λοιμώξεις και λοιμώξεις από τη χρήση βιοϊατρικών προσθετικών υλικών, οι επιπτώσεις τους στην ποιότητα του πόσιμου νερού και τα προβλήματα που μπορεί να προκαλέσουν στο δίκτυο, η αξιοποίησή τους στην επεξεργασία των αποβλήτων, αποτελούν πολύ σημαντικούς λόγους για τη μελέτη και την κατανόηση της ζωής των βακτηρίων μέσα στις βιομεμβράνες.

Θα πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι ο όρος βιομεμβράνη (biofilm) χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για να περιγράψει και τα υμένια που σχηματίζονται στο νευστόν, δηλαδή στην επιφάνεια επαφής υγρών και αέρα (air-water interface). Η σημασία των συγκεκριμένων δο-

μών έχει αρχίσει να μελετάται πρόσφατα και τα σχετικά στοιχεία με τη δομή και τις επιδράσεις τους είναι περιορισμένα.

Η ανασκόπηση αυτή αποτελεί μια προσπάθεια να γίνει γνωστό τι ακριβώς είναι οι βιομεμβράνες που αναπτύσσονται σε επιφάνειες που έρχονται σ' επαφή με νερό ή άλλα υγρά, πώς και πού δημιουργούνται, πώς επηρεάζουν τη ζωή μας, καθώς επίσης πώς και αν μπορούν να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που δημιουργούνται από την ανάπτυξή τους.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Στο μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της Μικροβιολογίας, οι μικροοργανισμοί θεωρούνταν πλαγκτονικοί, δηλαδή ελεύθερα αιωρούμενα κύτταρα, τα οποία περιγράφονταν με βάση τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους σε πλούσια θρεπτικά καλλιεργητικά υλικά.

Όμως:

Ο Leeuwenhoek, το 17ο αιώνα, παρατήρησε για πρώτη φορά με το πρωτόγονο μικροσκόπιό του την ύπαρξη μικροοργανισμών στην οδοντική πλάκα.

Το 1933, ο Hentiki παρατήρησε ότι τα βακτήρια δεν αιωρούνται στο νερό, αλλά τείνουν να προσκολλώνται σε επιφάνειες μέσα σε αυτό.

Το 1940, οι Heukelekian και Heller διαπίστωσαν αυξημένη βακτηριακή ανάπτυξη και δραστηριότητα σε θαλάσσιους μικροοργανισμούς, μετά από την είσοδο στο νερό κάποιας επιφάνειας, στην οποία θα μπορούσαν να προσκολληθούν.

Το 1943, ο Zobell παρατηρεί ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών πάνω σε επιφάνειες είναι εκπληκτικά μεγαλύτερος απ' ό,τι στο περιβάλλον θαλασσινό νερό.

Λεπτομερέστερη μελέτη των βιομεμβρανών έγινε αρκετά αργότερα με την ανακάλυψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, που επέτρεψε πολύ υψηλότερες μεγεθύνσεις απ' ό,τι το οπτικό.

Το 1969, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σκέδασης και διέλευσης, έγινε φανερή η συμμετοχή περισσότερων ειδών μικροοργανισμών στις βιομεμβράνες, σε μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων (Jones et al). Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι το υλικό που περιβάλλει τα κύτταρα στις δομές αυτές ήταν πολυσακχαρίτης.

Η μελέτη της εξωκυττάριας πολυμερούς ουσίας ή γλυκοκάλυκα από τον Characklis το 1973 έδειξε την αυξημένη αντοχή των προσκολλημένων βακτηρίων σε απολυμαντικά, όπως η χλωρίνη.

Το 1978, οι Costerton et al, στηριζόμενοι σε παρατηρήσεις που έκαναν στην οδοντική πλάκα και σε υδάτινα συστήματα, διατύπωσαν μια νέα θεωρία, που εξηγούσε τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε ζωντανές και μη επιφάνειες και τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τη θέση τους αυτή. Από το σημείο αυτό και μετά, η μελέτη των βιομεμβρανών προχώρησε παράλληλα στη βιομηχανία, στο φυσικό περιβάλλον και σε περιβάλλοντα σχετιζόμενα με τη δημόσια υγεία.

Την τελευταία δεκαετία, έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της δομής των βιομεμβρανών η αξιοποίηση της μικροσκοπίας συνεστίασης (scanning confocal laser microscopy) και η μελέτη των γονιδίων που ρυθμίζουν την προσκόλληση και το σχηματισμό της βιομεμβράνης.

3. ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Η διαπίστωση ότι οι βιομεμβράνες αποτελούν τις κοινώνιες των μικροοργανισμών και ότι τα βακτήρια, ζώντας σ' αυτές, αποκτούν ιδιαίτερης σημασίας χαρακτηριστικά, έδωσε μεγαλύτερη ώθηση στη μελέτη τους. Το είδος και η έκταση της δράσης των μικροοργανισμών στον άνθρωπο, μέσα από τις δομές αυτές, είναι εκπληκτική όσον αφορά αφενός στην υγεία του και αφετέρου τις διάφορες δραστηριότητές του.

Υπολογίζεται ότι το 65% των λοιμώξεων στον άνθρωπο οφείλονται σε βακτήρια που ασκούν τη λοιμογόνο δράση τους μέσω των βιομεμβρανών.¹

Οι κυριότερες λοιμώξεις είναι:

– Η *ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων*, η οποία οφείλεται κατά:

- 56% σε στρεπτόκοκκους (*S. viridans*, *Enterococci*, *S. pneumoniae*, *S. bovis*)
- 25% σε σταφυλόκοκκους, καθώς και σε Gram-αρνητικά βακτήρια και μύκητες.

Εξαιτίας της ανάπτυξης των βιομεμβρανών στο ενδοθήλιο των βαλβίδων προκαλούνται αλλοιώσεις σε αυτές. Επιπλέον, είναι δυνατόν τμήματα της βιομεμβράνης να αποσπαστούν και η λοίμωξη να διασπαρεί στον οργανισμό, με ενδεχόμενες σοβαρές επιπλοκές.²

– Η *μέση πυώδης ωτίτιδα* μια από τις πλέον κοινές παθήσεις της παιδικής ηλικίας, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό βιομεμβράνης πάνω στο βλεννογόνο του μέσου ωτός.

Συνήθως, οι βιομεμβράνες αυτές έχουν πολυμικροβιακό χαρακτήρα. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν συνήθως είναι οι ακόλουθοι:

- *S. pneumoniae*
- *H. influenzae*
- *M. catarrhalis*
- *S. aureus*
- *S. epidermidis*
- *P. aeruginosa*
- β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι
- Εντεροβακτηριακά.¹⁻³

– Η *χρονία βακτηριακή προστατίτιδα*, στην οποία το συχνότερο αίτιο είναι ο σχηματισμός βιομεμβράνης από:

- *E. coli*
- Άλλα εντεροβακτηριακά² (*Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*)
- *P. aeruginosa*
- *E. faecalis*^{1,2}

– Η *κυστική ίνωση* των πνευμόνων, νόσος με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα, στην οποία η ανάπτυξη βιομεμβρανών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Ο επικρατέστερος αποικιστής στις βιομεμβράνες αυτές είναι η *P. aeruginosa*.^{2,4,5}

– Η *περιοδοντίτιδα*.^{2,3}

– Οι *λοιμώξεις που σχετίζονται με βιοϊατρικά υλικά και εμφυτεύματα*, όπως:

- Προσθετικές βαλβίδες
- Ενδοφλέβιοι καθετήρες
- Ουροκαθετήρες
- Τεχνητές αρθρώσεις
- Φακοί επαφής.

Τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά βακτήρια, που αναπτύσσονται στις επιφάνειες των υλικών αυτών, ασκούν τη λοιμογόνο δράση τους μετά από την προσκόλλησή τους.² Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που συνδέονται με την ανάπτυξη βιομεμβρανών σε προσθετικές ιατρικές συσκευές.⁶

Η περαιτέρω ανάπτυξη του κεφαλαίου αυτού ξεφεύγει από τους σκοπούς του παρόντος άρθρου.

4. ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Στις διάφορες διαδικασίες παραγωγής, η ανάπτυξη βιομεμβρανών μπορεί είτε να δημιουργήσει πρόβλημα, είτε να αποτελέσει πλεονέκτημα που εκμεταλλεύεται ο άνθρωπος προς όφελός του. Για παράδειγμα, η ανάπτυξή τους στο δίκτυο του νερού επηρεάζει την ποιότητα και την ταχύτητα ροής του, ενώ στα ύφαλα των πλοίων αυξάνει την κατανάλωση των καυσίμων και επηρεάζει την τελική τους ταχύτητα. Στη βιομηχανία τροφίμων, η ανάπτυξη βιομεμβρανών στην επιφάνεια των μηχανημά-

Πίνακας 1. Μικροοργανισμοί που συνδέονται με ανάπτυξη βιομεμβρανών σε προσθετικές ιατρικές συσκευές.

Μικροοργανισμοί	Εστία απομόνωσης βιομεμβράνης
<i>Candida albicans</i>	Τεχνητό προσθετικό φωνής Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ενδομήτριο σπείραμα
Coagulase-negative staphylococci	Τεχνητή πρόθεση ισχίου Τεχνητό προσθετικό φωνής Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ενδομήτριο σπείραμα Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς Ουροκαθετήρας
<i>Enterococcus spp</i>	Τεχνητή πρόθεση ισχίου Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ενδομήτριο σπείραμα Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς Ουροκαθετήρας
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ουροκαθετήρας
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Τεχνητή πρόθεση ισχίου Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ουροκαθετήρας
<i>Staphylococcus aureus</i>	Τεχνητή πρόθεση ισχίου Καθετήρας κεντρικής φλέβας Ενδομήτριο σπείραμα Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς

των θεωρείται ότι προστατεύει τα παθογόνα, όπως η *Listeria monocytogenes*, από τα απολυμαντικά, ενώ σε άλλες βιομηχανίες είναι υπεύθυνη για σημαντικές οικονομικές απώλειες⁷ (πίν. 2).

Όμως, η βαθύτερη γνώση της δομής και της λειτουργίας των βιομεμβρανών βοήθησε τον άνθρωπο να αξιοποιήσει την ανάπτυξή τους. Η εξυγίανση του νερού με τη χρήση φίλτρων άμμου, η επεξεργασία των αποβλήτων με τη δημιουργία βιοαντιδραστήρων, η παραγωγή οξικού οξέος από αιθανόλη συνιστούν μερικά παραδείγματα τέτοιου είδους⁷ (πίν. 3).

Στη γεωργία-κτηνοτροφία, οι ασθένειες που οφείλονται στην ανάπτυξη βιομεμβρανών είναι λιγότερο κατανοητές απ' ό,τι στους ανθρώπους. Η ασθένεια Pearce στα σταφύλια και τα εσπεριδοειδή οφείλεται στην ανάπτυξη βιομεμβράνης από το *Xylella fastidiosa* στον ξυλώδη ιστό του φυτού, με συνέπεια να εμποδίζεται η μεταφορά νερού και θρεπτικών ουσιών. Ανάλογη είναι η δράση του *Clavibacter michiganensis* στις πατάτες, όπου προκαλεί

Πίνακας 2. Παραδείγματα βιομηχανικών προβλημάτων λόγω σχηματισμού βιομεμβρανών.

Βιομηχανία	Πρόβλημα
Μεταφορά υγρών (γενικά)	Απόφραξη σωλήνων Μείωση της ταχύτητας ροής λόγω μείωσης της εσωτερικής διατομής των σωλήνων
Δίκτυο διανομής νερού	Μείωση ταχύτητας ροής Υψηλή μη αναμενόμενη μικροβιολογική φόρτιση
Παρασκευή χαρτιού	Χαμηλή ποιότητα
Παρασκευή αλεύρου και επεξεργασία ζάχαρης	Εμπλοκή στη διαδικασία
Ύφια πλοίων	Αύξηση κατανάλωσης καυσίμων λόγω μεγαλύτερης αντίστασης Χαμηλότερη τελική ταχύτητα
Μεταλλικές κατασκευές	Επιτάχυνση διάβρωσης
Λειτουργίες θέρμανσης, ψύξης	Μειωμένη αποτελεσματικότητα λόγω μειωμένης κινητικότητας των κλιματιστικών υγρών
Παραγωγή τροφίμων	Επιβίωση μικροοργανισμών, πιθανόν και παθογόνων
Εκτυώσεις	Απόφραξη σωλήνων παροχής μελάνης Αλλοίωση ποιότητας μελάνης

Πίνακας 3. Διαδικασίες αξιοποίησης της ανάπτυξης βιομεμβρανών.

Διαδικασία	Παράδειγμα αξιοποίησης
Εξυγίανση νερού	Αργό φιλτράρισμα με άμμο
Εξυγίανση αποβλήτων	Βιολογικά φίλτρα (percolating filters)
Εξυγίανση αγροτικών αποβλήτων	Βιολογικά φίλτρα (flocor tower)
Εξυγίανση βιομηχανικών αποβλήτων	Βιοαντιδραστήρες
Απομάκρυνση μόλυνσης βαρέων μετάλλων (και ουρανίου)	Αποκομιδή αποβλήτων υδραργύρου
Ανάκτηση μετάλλων από χαμηλής ποιότητας μέταλλευμα (microbial leaching)	Έκλυση μετάλλου λόγω μικροβιακής δράσης
Παραγωγή οξικού οξέος από αιθανόλη	Παραδοσιακή διαδικασία

την ασθένεια Ring Rot, με καταστροφικές συνέπειες για ολόκληρη την καλλιέργεια.

Στην κτηνοτροφία, η μόλυνση των μαζικών αδένων των βοοειδών από το *S. mastitis* και η επακόλουθη ανάπτυξη βιομεμβράνης οδηγεί σε χρόνιες λοιμώξεις, ενώ είναι επίσης γνωστό ότι οι βιομεμβράνες εμπλέκονται στη χρονία πνευμονία των χοίρων και των βοοειδών, καθώς και στην ασπεργίλλωση των πουλερικών.

5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Τα κύρια συστατικά που συνιστούν μια βιομεμβράνη είναι:⁸

- Τα μικροβιακά κύτταρα
- Το στρώμα του εξωκυττάρου πολυμερούς (γλυκοκάλυκας)
- Η επιφάνεια προσκόλλησης.

Το 15% του όγκου της βιομεμβράνης αποτελείται από τα κύτταρα των βακτηρίων και το 85% από το γλυκοκά-

λυκα.² Επειδή ο γλυκοκάλυκας συγκρατεί μεγάλη ποσότητα νερού, η επιφάνεια που καλύπτεται από βιομεμβράνη είναι ζελατινώδης και γλιστερή.

α. Μικροβιακά κύτταρα

Απαραίτητο συστατικό της βιομεμβράνης είναι βέβαια οι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες), οι οποίοι σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να προσκολληθούν πάνω σε επιφάνειες και να δομήσουν βιομεμβράνες.^{9,10}

Όμως, ορισμένα είδη (*S. epidermidis*, *L. pneumophila*, *P. mirabilis*, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *B. cepacia*, *Enterococcus* spp, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. parapsilosis*, *V. cholerae*) παρουσιάζουν εντονότερη τάση δημιουργίας βιομεμβρανών.⁸

Παρότι κάποια από τα είδη αυτά περιλαμβάνονται στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπου (π.χ. *S. epidermidis* και *E. coli*, που αποικίζουν φυσιολογικά το δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα, αντίστοιχα), σε κατάλληλες συνθήκες σχηματίζουν βιομεμβράνες και

αποτελούν αίτια λοιμώξεων (π.χ. κατά τη χρήση ενδοφλέβιων καθετήρων, ουροκαθετήρων κ.λπ.). Η *P. aeruginosa*, μικροοργανισμός του φυσικού περιβάλλοντος, αλλά και ευκαιριακό παθογόνο για ανοσοκατασταλμένους, παρουσιάζει υψηλή τάση δημιουργίας βιομεμβράνης και αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση.³

β. Εξωκυττάριο πολυμερές ή γλυκοκάλυκας

Το στρώμα του γλυκοκάλυκα αποτελείται από:

- Πολυσακχαρίτες που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια³ (π.χ. κολανικό η *E. coli*, αλγινικό η *P. aeruginosa*, γλυκοζαμινογλυκάνη ο *S. epidermidis*)
- Εξωγενείς ουσίες, που ποικίλλουν ανάλογα με το περιβάλλον όπου αναπτύσσεται η βιομεμβράνη¹ (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, μέταλλα, σωματίδια αργίλου, σωματίδια διάβρωσης κ.λπ.)
- Προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων και νερό σε υψηλό ποσοστό, 95-97%.^{2,3}

Έτσι, οι ιδιότητες του εξωκυτταρικού πολυμερούς ποικίλλουν ανάλογα τη σύνθεση, το στάδιο ωρίμανσης της βιομεμβράνης και το περιβάλλον.

γ. Επιφάνεια προσκόλλησης

Η επιφάνεια προσκόλλησης μπορεί να είναι έμβια, όπως κάποιος ιστός, ή κάποιο αδρανές υλικό, π.χ. καθετήρες, εμφυτεύματα, φακοί επαφής, δίκτυο νερού.^{1,2}

Η μελέτη με τη βοήθεια της μικροσκοπίας συνεστίασης έδειξε ότι η βασική δομική μονάδα της βιομεμβράνης είναι οι μικροαποικίες μικροβίων, δομές σαν μανιτάρι ή σαν πυραμίδα (εικ. 1). Ανάμεσά τους δημιουργούνται κανάλια, μέσα στα οποία ρέει το υγρό μεταφέροντας θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο ή ακόμα και αντιμικροβιακές ουσίες,^{2,3} λειτουργώντας έτσι ως ένας αρχέγονος ιστός.

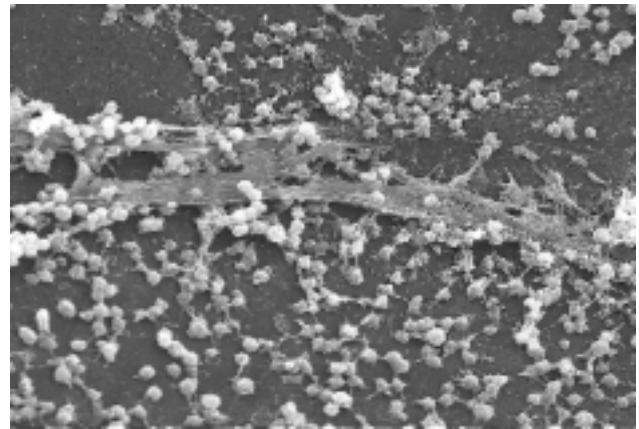


Εικόνα 1. Μικροαποικίες σε σχήμα μανιταριού ή πυραμίδας αποτελούν τη βασική δομική μονάδα της βιομεμβράνης, όπως φάνηκε σε μικροσκόπιο συνεστίασης. Πηγή: www.edstrom.com.

Η δομή της βιομεμβράνης είναι σχετικά απλή όταν αναπτύσσεται στα βιοϊατρικά προσθετικά υλικά (εικ. 2), ενώ γίνεται ιδιαίτερα πολύπλοκη στο περιβάλλον, όπως π.χ. σε ένα δίκτυο νερού⁶ (εικ. 3).

Κατά την ωρίμανση της μεμβράνης παρατηρείται συνεχής αλλαγή της δομής της. Έτσι, συσσωρεύονται μη μικροβιακά συστατικά από το περιβάλλον (σωματίδια διάβρωσης, αργίλου) ή από τον ξενιστή (ερυθρά αιμοσφαίρια, πρωτεΐνες) και όσο η δομή πυκνώνει δημιουργείται ιδανικό περιβάλλον για ανάπτυξη κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας και ανταλλαγής γονιδίων.

Το μέγεθος των βιομεμβρανών κυμαίνεται από μερικά μm πάχος στα πτωχά σε θρεπτικά περιβάλλοντα, έως



Εικόνα 2. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, βιομεμβράνης σταφυλοκόκκου στην εσωτερική επιφάνεια προσθετικής ιατρικής συσκευής. Πηγή: Donlan RM, Carr J. *Emerging Infectious Diseases*.⁶



Εικόνα 3. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, μιας φυσικής βιομεμβράνης πάνω σε μεταλλική επιφάνεια, σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, σε βιομηχανικό σύστημα νερού. Πηγή: Donlan RM. *Emerging Infectious Diseases*.⁶

και σε μακροσκοπικές διαστάσεις στα πλούσια περιβάλλοντα, όπως στα απόβλητα ή σε λίμνες. Στις εικόνες 4–7 παρουσιάζονται διάφορες μορφές βιομεμβρανών στον τομέα της Ιατρικής, της βιομηχανίας και της κτηνοτροφίας.

6. ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

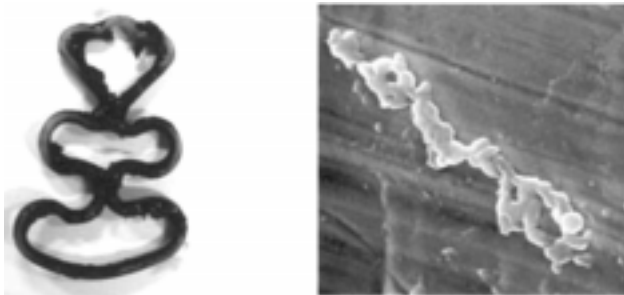
Κατά τη διαδικασία σχηματισμού της βιομεμβράνης είναι διακριτά τα ακόλουθα πέντε στάδια, όπως κυρίως μελετήθηκαν και περιγράφηκαν σε αυτοματοποιημένα συστήματα χορήγησης νερού σε πειραματόζωα.¹³

Στάδιο 1: Σχηματισμός ρυθμιστικού υμενίου-στρώματος (conditioning film-layer)

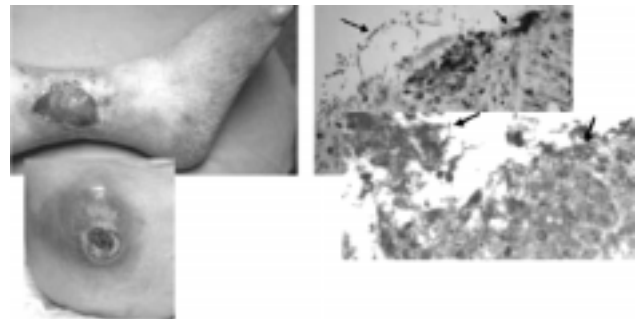
Τη στιγμή που ένας καθαρός σωλήνας γεμίζει με νερό, αρχίζει ο σχηματισμός της βιομεμβράνης. Τα πρώ-

τα συστατικά που συνδέονται με την επιφάνεια δεν είναι τα βακτήρια, αλλά ίχνη οργανικών ουσιών, τα οποία δημιουργούν ένα στρώμα στην επιφάνεια του σωλήνα.¹⁴ Το στρώμα αυτό αναφέρεται ως “conditioning film” ή “conditioning layer” και εξουδετερώνει το υπερβολικό φορτίο και την ελεύθερη ενέργεια της επιφάνειας, τα οποία μπορούν να εμποδίσουν ένα βακτηριακό κύτταρο να την προσεγγίσει αρκετά, ώστε να αρχίσει η διαδικασία προσκόλλησης. Επιπλέον, τα οργανικά αυτά μόρια αποτελούν και πηγή θρεπτικών στοιχείων για τους μικροοργανισμούς.

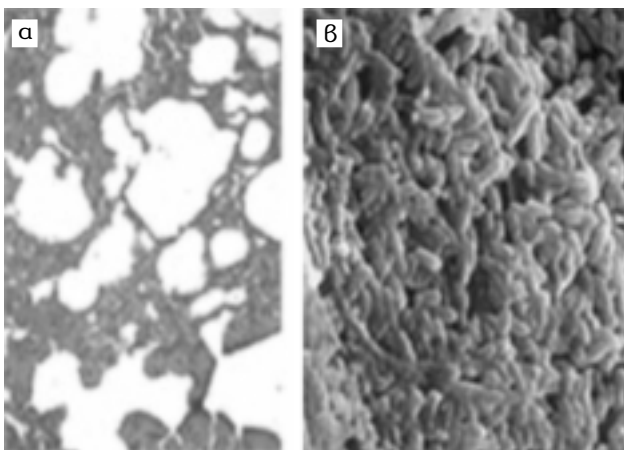
Η φύση του ρυθμιστικού υμενίου μπορεί να είναι τελείως διαφορετική σε επιφάνειες του ανθρώπου ξενιστή. Το ρυθμιστικό υμένιο που σχηματίζεται στην επιφάνεια των δοντιών βρέθηκε ότι αποτελείται από λευκωματίνη, λυσοζύμη, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφοπρωτεΐνες και λιπίδια.¹⁵



Εικόνα 4. Ενδομήτριο σπείραμα, όπου έχει αναπτυχθεί βιομεμβράνη βακτηρίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα χρόνιες λοιμώξεις και φλεγμονές. Πηγή: www.mbec.ca.



Εικόνα 6. Η φυσιολογική διαδικασία επούλωσης των πληγών καθυστερεί από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται βιομεμβράνες. Οι νεκρωμένες περιοχές των πληγών και η παρουσία μεταυσιωμένων πρωτεϊνών και εφελκίδας αποτελούν ιδανικά σημεία πολλαπλασιασμού των μικροβίων και σχηματισμού βιομεμβράνης. Πηγή: www.mbec.ca.



Εικόνα 5. Ασθενείς με κυστική ίνωση αναπτύσσουν χρόνια πνευμονία (α), που οφείλεται στην *P. aeruginosa*. Η ανάπτυξη βιομεμβράνης (β) περιορίζει τη δράση των αντιβιοτικών και την αποτελεσματική αντιμετώπιση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Πηγή: www.mbec.ca

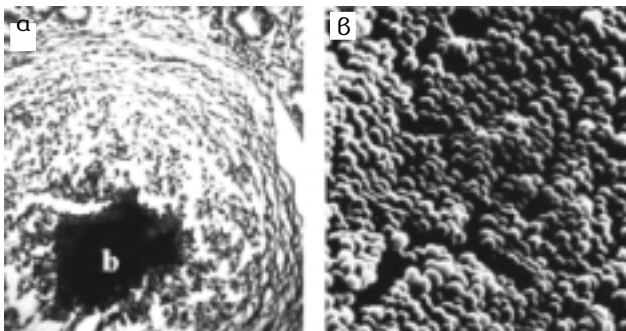


Εικόνα 7. Εγκάρσια διατομή ανοξείδωτου σωλήνα, καλυμμένη σχεδόν εξ ολοκλήρου από την αυξημένου πάχους βιομεμβράνη. Πηγή: MSU Center for Biofilm Engineering.

Στάδιο 2: Προσκόλληση των πρωταρχικών κυττάρων

Καθώς το νερό κυλά στο σωλήνα, τα βακτηριακά κύτταρα που κινούνται ελεύθερα (πλαγκτονικά) αρχίζουν να πλησιάζουν την επιφάνεια και εισέρχονται στο βασικό υδροδυναμικό στρώμα, όπου η ταχύτητα του υγρού είναι μηδέν. Η προσέγγιση γίνεται είτε τυχαία με τη ροή του υγρού, είτε υπό την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων στα κινητά βακτήρια.³ Το ερέθισμα εδώ αποτελεί η διαβάθμιση συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών, που έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση των βακτηρίων προς τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (χημειοταξία).

Όταν η απόσταση από την επιφάνεια γίνει <1 nm, αναπτύσσονται μεταξύ αυτής και του βακτηρίου ποικίλες ελκτικές και απωστικές δυνάμεις, όπως υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές, υδροδυναμικές, θερμικές, δυνάμεις Van der Waals κ.ά.¹² Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι συνήθως απωστικές, γιατί τα περισσότερα βακτήρια όπως και τα αδρανή υλικά είναι αρνητικά φορτισμένα. Τα βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν κίνηση Brown, προσκρούουν στην επιφάνεια, προσκολλώνται για περιορισμένο χρόνο και στη συνέχεια αποκολλώνται. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται ως *αντιστρεπτή προσκόλληση*. Κάποια από τα προσωρινά προσκολλημένα κύτταρα αρχίζουν προετοιμασία για μακρόχρονη παραμονή, σχηματίζοντας δομές που θα τους επιτρέψουν τη μόνιμη προσκόλληση στην επιφάνεια. Η προσκόλληση θα εξαρτηθεί και από τη φάση ανάπτυξης του κυττάρου, καθώς η έκκριση του εξωκυτταρικού πολυμερούς στην πλειονότητα των περιπτώσεων γίνεται στο τέλος της εκθετικής φάσης ή κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης.⁷ Το παραπάνω ενισχύεται και από τα ευρήματα ερευνητών, που διαπίστωσαν ότι επιφάνεια βυθισμένη σε θαλασσινό νερό



Εικόνα 8. (α) Ανάπτυξη βιομεμβράνης από *Staphylococcus mastitis* στους μαζικούς αδένες των βοοειδών προκαλεί χρόνιες λοιμώξεις, επηρεάζοντας την παραγωγή γάλακτος. Διακρίνονται βακτήρια (b) στον αυλό του αδένα. (β) Βιομεμβράνη *St. mastitis*.

αποικίζεται πρώτα από μικροβιακά κύτταρα μικρού μεγέθους. Το μικρό μέγεθος κυττάρου συνδέεται με συνθήκες στέρσης. Τι σημαίνει αυτό; Στη φύση, οι συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων ή η παρουσία άλλων παραγόντων πίεσης είναι η συνήθης κατάσταση και όχι η εξαίρεση. Έτσι, στις συνθήκες αυτές, οι μικροοργανισμοί κινητοποιούν μοριακούς μηχανισμούς που έχουν ως συνέπεια την ενεργοποίηση γονιδίων, η έκφραση των οποίων οδηγεί σε μείωση του μεγέθους του κυττάρου. Στην κατάσταση αυτή, οι ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου είναι πάρα πολύ μικρές και οι μικροοργανισμοί είναι μεν βιώσιμοι, αλλά μη καλλιεργήσιμοι (viable but not culturable). Επιπλέον, παρουσιάζουν αυξημένη τάση σύνδεσης με τις επιφάνειες, γεγονός που οδηγεί στην προαγωγή της δημιουργίας βιομεμβρανών. Όταν εκλείπει ο παράγοντας πίεσης, οι μικροοργανισμοί αναζωογονούνται και γίνονται πάλι ικανοί να πολλαπλασιαστούν και να καλλιεργηθούν.

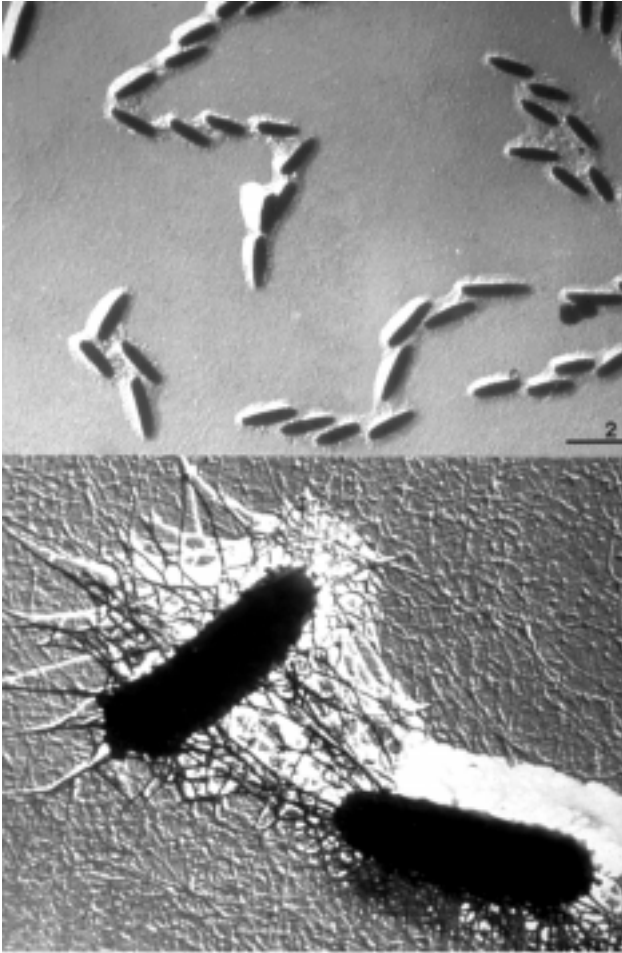
Η προσκόλληση ολοκληρώνεται και καθίσταται μη αντιστρεπτή, με κάποιες διαφορές στην ακολουθία των γεγονότων ανάλογα με την επιφάνεια προσκόλλησης. Η σημαντικότερη διαφορά είναι ότι κατά το σχηματισμό βιομεμβράνης σε χημικά αδρανή επιφάνεια, όπως συμβαίνει στο περιβάλλον, η προσκόλληση είναι μη ειδική, ενώ σε ζωντανούς ιστούς είναι ειδική και γίνεται με τη βοήθεια των λεκτινών και των προσκολληπινών.⁷ Η σύνδεση σταθεροποιείται με την παραγωγή πολυσακχαριτών, που αλληλεπιδρούν με μόρια της επιφάνειας και ειδικά σημεία (ligands) του κυτταρικού τοιχώματος.¹²

Στάδιο 3: Σχηματισμός της εξωκυτταρικής πολυμερούς ουσίας

Τα βακτήρια, μετά από την προσκόλληση, αρχίζουν να εκκρίνουν ένα κολλώδες πολυμερές, που συγκρατεί τη βιομεμβράνη και τη στερεώνει στην επιφάνεια (εικ. 9).

Επιπλέον, το πλέγμα αυτό του πολυμερούς παρέχει προστασία στα βακτήρια από τα βιοκτόνα, αλλά και συγκρατεί θρεπτικά στοιχεία από το περιβάλλον υγρό. Σύμφωνα με τον Mittelman (1985), το εξωκυτταρικό πολυμερές εκτείνεται έξω από το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα όπως ο ιστός της αράχνης.

Καθώς η συγκέντρωση των θρεπτικών αυξάνεται, τα πρωταρχικά-μητρικά κύτταρα αρχίζουν να αναπαράγονται. Τα θυγατρικά κύτταρα παράγουν το δικό τους εξωκυτταρικό πολυμερές, αυξάνοντας έτσι το συνολικό όγκο του γλυκοκάλυκα. Σύντομα ολοκληρώνεται ο σχηματισμός μιας επιτυχημένης αποικίας βακτηρίων.¹⁶



Εικόνα 9. Βακτήρια προσκολλημένα σε επιφάνεια με τη βοήθεια του εξωκυτταρικού πολυμερούς που παράγουν τα ίδια. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Πηγή: MSU Center for Biofilm Engineering.

Στάδιο 4: Δευτερογενείς αποικιστές

Όπως γίνεται η παγίδευση θρεπτικών συστατικών από το γλυκοκάλυκα, κατ' ανάλογο τρόπο παγιδεύονται με φυσική συγκράτηση και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και άλλοι τύποι βακτηριακών κυττάρων. Αυτοί οι δευτερογενείς αποικιστές μεταβολίζουν κάποια από τα απόβλητα των πρωτογενών αποικιστών, ενώ τα δικά τους απόβλητα θα χρησιμοποιηθούν από άλλα βακτήρια, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον Borenstein, η εμφάνισή τους στη νεοσχηματιζόμενη βιομεμβράνη είναι ζήτημα ημερών.¹⁷

Στάδιο 5: Ωριμη βιομεμβράνη

Η ώριμη βιομεμβράνη λειτουργεί όπως ένας ζωντανός ιστός. Είναι μια πολύπλοκη κοινότητα, φτιαγμένη από διαφορετικά είδη, όπου το καθένα είναι προσαρμοσμένο στο μικροπεριβάλλον του, συνεργάζονται όμως

προκειμένου να μεταβολίσουν τα διάφορα θρεπτικά συστατικά. Τα διαφορετικά ένζυμα που διαθέτει κάθε είδος συμβάλλουν στην αποικοδόμηση στοιχείων, όπου το καθένα μόνο του δεν θα μπορούσε να κάνει. Ένα δίκτυο καναλιών-σπράγγων διευκολύνει τη μεταφορά νερού, θρεπτικών ουσιών, ενζύμων, αποβλήτων και οξυγόνου σε όλη την έκταση της βιομεμβράνης. Αυτό γίνεται δυνατό λόγω της διαβάθμισης συγκέντρωσης χημικών ουσιών και ιόντων ανάμεσα στις μικροζώνες,¹⁸ η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη και τη συνύπαρξη ετερογενών πληθυσμών μικροοργανισμών. Ο μικροβιακός πληθυσμός οργανώνεται οριζόντια ή κατακόρυφα ανάλογα με την κατεύθυνση της διαβάθμισης, δίνοντας τη δυνατότητα σε μικροοργανισμούς με εντελώς διαφορετικές τροφικές και φυσιολογικές απαιτήσεις να ζουν πολύ κοντά.⁷ Για παράδειγμα, η διαβάθμιση συγκέντρωσης οξυγόνου επιτρέπει την ανάπτυξη αερόβιων, μικροαερόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους.

Για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη μιας ώριμης βιομεμβράνης απαιτούνται από λίγες ώρες έως μερικές εβδομάδες, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες.¹⁹ Για παράδειγμα, η *P. aeruginosa*, που είναι ένας κοινός πρώτος αποικιστής επιφανειών, χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στις μελέτες βιομεμβρανών. Σε σχετικά πειράματα διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρά της προσκολλήθηκαν σε επιφάνεια από ανοξείδωτο ατσάλι, αλλά και σε ανοξείδωτο ατσάλι που είχε υποστεί ειδική επεξεργασία μεγαλύτερης λείανσης της επιφάνειας (electropolished), μέσα σε 30 sec από την έκθεση της επιφάνειας στο υγρό μέσο.²⁰

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα των μικροοργανισμών που σχηματίζουν τη βιομεμβράνη μπορούν να διασπαρούν με διάφορους μηχανισμούς, αποικίζοντας έτσι νέα τμήματα της επιφάνειας.

6.1. Παράγοντες προσκόλλησης των βακτηρίων και δομής της βιομεμβράνης

Η προσκόλληση των βακτηρίων σε κάποια επιφάνεια, όπως και η δομή της βιομεμβράνης που θα αναπτυχθεί, εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία.

Έτσι, η προσκόλληση επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά:

- Της επιφάνειας προσκόλλησης
- Του υγρού μέσου
- Της κυτταρικής επιφάνειας⁶

ενώ η δομή της βιομεμβράνης καθορίζεται από:

- Τα είδη των μικροοργανισμών που συμβιώνουν σ' αυτήν
- Τα χαρακτηριστικά του υγρού μέσου.^{6,13}

Συνοπτικά, μπορεί να λεχθεί ότι η προσκόλληση επιτελείται ευκολότερα σε επιφάνειες τραχείες, υδρόφοβες και καλυμμένες με το οργανικής φύσης στρώμα από το περιβάλλον. Επίσης, διευκολύνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής του υγρού μέσου, η θερμοκρασία του και η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων σε αυτό, ενώ σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η παρουσία ινιδίων, μαστιγίου, πολυσακχαριτών και ορισμένων πρωτεϊνών.

Όσον αφορά στη δομή της βιομεμβράνης, υψηλές ταχύτητες του υγρού οδηγούν σε λεπτότερες και περισσότερο συμπαγείς δομές, ενώ οι χαμηλές ταχύτητες, η αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών και η παρουσία ετερογενών πληθυσμών μικροοργανισμών, σε παχύτερες βιομεμβράνες.

7. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροοργανισμοί στην προσκολλημένη μορφή τους παρουσιάζουν κάποιες ιδιότητες-πλεονεκτήματα, που αφορούν στην έκφραση των γονιδίων τους, τη δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων και την επικοινωνία που αναπτύσσουν μεταξύ τους.

7.1. Αλλαγή φαινοτύπου-ρύθμιση γονιδίων

Μετά από την επιτυχημένη προσκόλληση, αρχίζει να διαφαίνεται κάποια αλλαγή στο φαινότυπο του μικροβίου, που οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων και στην απενεργοποίηση κάποιων άλλων, ώστε να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της βιομεμβράνης. Παρατηρείται δηλαδή αλλαγή ορισμένων μεταβολικών δραστηριοτήτων του μικροοργανισμού, όπως π.χ. ο ρυθμός ανάπτυξης, η αναπνοή, η πρόσληψη O₂, η μεταφορά ηλεκτρονίων, η σύνθεση του εξωκυττάριου πολυμερούς και η παραγωγή θερμότητας.³

Για παράδειγμα, στην *E. coli*, μετά από την προσκόλληση, παρατηρήθηκε τροποποίηση της μεταγραφής του 38% των γονιδίων.²¹ Στην *Paeruginosa*, το γονίδιο *algC*, ένα από τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή του αλγινικού, του κύριου συστατικού του εξωκυττάριου πολυσακχαρίτη της, γίνεται πέντε φορές ενεργότερο αμέσως μετά από την προσκόλληση, για να απενεργοποιηθεί μόλις τα κύτταρα εγκολληθούν στο αλγινικό, ενώ το γονίδιο που ευθύνεται για τη βιοσύνθεση των βλεφαρίδων απενεργοποιείται.³

Για να σχηματιστεί, επομένως, βιομεμβράνη δεν αρκεί απλή συνάθροιση κυττάρων, όπως συμβαίνει σε καλλιέργειες βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά υλικά, αλλά θα πρέπει οι μικροοργανισμοί να εκφράσουν το φαινότυπο που αντιστοιχεί στην προσκολλημένη μορφή τους.²

7.2. Οριζόντια μεταφορά γονιδίων

Η βιομεμβράνη αποτελεί ιδανική θέση ανταλλαγής πλασμιδιακού DNA για τα προσκολλημένα μικροβιακά κύτταρα, όπου η σύζευξη πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι ανάμεσα στα πλαγκτονικά κύτταρα.²²⁻²⁴

Βακτήρια που διαθέτουν κάποια συζευκτικά πλασμίδια φαίνεται να αναπτύσσουν ευκολότερα βιομεμβράνες από ανάλογα στελέχη που δεν τα έχουν.²⁵ Γονίδια των πλασμιδίων αυτών εκφράζουν παράγοντες, που ωθούν τα πλαγκτονικά βακτήρια να σχηματίσουν ή να ενσωματωθούν σε βιομεμβράνες. Στην προαναφερθείσα μελέτη με την *E. coli* δείχθηκε ότι το F συζευκτικό ινίδιο, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *tra*, το οποίο βρίσκεται στο F πλασμίδιο, δρα ως παράγοντας προσκόλλησης σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-επιφάνειας και κυττάρου-κυττάρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας τρισδιάστατης βιομεμβράνης. Επίσης, στελέχη που διέθεταν πλασμίδιο το μετέφεραν σε άλλα που δεν το είχαν, τα οποία στη συνέχεια μπορούσαν να σχηματίσουν βιομεμβράνες. Χωρίς τα πλασμίδια, οι ίδιοι αυτοί οργανισμοί δημιουργούσαν μόνο μικροαποικίες, χωρίς κάποια παραπέρα εξέλιξη. Ο πιθανός λόγος για την προαγωγή της σύζευξης είναι ότι το περιβάλλον της βιομεμβράνης παρέχει συνοχή και στενή επαφή κυττάρου με κύτταρο.

Φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς που τους οδηγούν να δημιουργούν ή να ανευρίσκουν τις συνθήκες εκείνες, οι οποίες ευνοούν τη διασπορά των γονιδίων που αφορούν σε χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, όπως είναι η αυξημένη μολυσματικότητα ή η αύξηση της αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Τέτοια γονίδια μπορεί να βρίσκονται στα πλασμίδια, οπότε μέσα από τη δομή της βιομεμβράνης παρέχεται ο μηχανισμός και οι συνθήκες που θα βοηθήσουν στην επιλογή, την προαγωγή και τη διασπορά των ουσιωδών αυτών χαρακτηριστικών.

7.3. Κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία

Όπως έχει αναφερθεί, η δημιουργία βιομεμβράνης δεν αποτελεί απλή συνάθροιση κυττάρων σε μια στερεή

επιφάνεια. Η συγκέντρωση μικροοργανισμών του ίδιου είδους ή και διαφορετικών ειδών οδηγεί σε σχηματισμό βιομεμβράνης μέσα από μηχανισμούς χημικών σημάτων. Τα σήματα αυτά συγκεντρώνονται τοπικά, έξω από το κύτταρο και όταν η συγκέντρωσή τους φθάσει ένα οριακό σημείο, τότε γίνεται «αντιληπτό» από τα κύτταρα ότι ο πληθυσμός έχει φθάσει σε μια ελάχιστη πυκνότητα –a quorum– και αρχίζει η διαδικασία τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων. Αυτός ο μηχανισμός της χημικής επικοινωνίας που αφορά στην πυκνότητα του πληθυσμού χαρακτηρίζεται ως κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum-sensing).²⁶

Στις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών, Gram-θετικών και Gram-αρνητικών, το σύστημα κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας περιλαμβάνει την παραγωγή και ανίχνευση μορίων-σημάτων που καλούνται αυτοεπαγωγείς.²⁷ Τα ειδικά αυτά μόρια είναι χαμηλού μοριακού βάρους και διαχέονται έξω από το κύτταρο.³ Όταν αυξηθεί η πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων, αυξάνεται η συγκέντρωση του αυτοεπαγωγέα τόσο εξωτερικά όσο και μέσα στο κύτταρο.²⁸ Όταν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση υπερβεί ένα οριακό σημείο, ο αυτοεπαγωγέας συνδέεται με συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα στο γονιδίωμα του κυττάρου και σχηματίζει το σύμπλεγμα αυτοεπαγωγέα-μεταγραφικού παράγοντα. Αυτό το σύμπλεγμα συνδέεται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση ακόμα και 1000 φορές της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή λοιμογόνων παραγόντων, τη βακτηριακή σύζευξη κ.λπ.²⁹ Στα Gram-θετικά βακτήρια οι αυτοεπαγωγείς είναι μικρά πεπτιδία που ονομάζονται φερομόνες,³⁰ ενώ στα Gram-αρνητικά είναι μόρια λακτόνης.³¹

Όπως ο ίδιος ο Bassler περιγράφει, τα χημικά αυτά σήματα λειτουργούν ως ένα είδος χημικής Esperanto για τα μικρόβια. Η ποσότητα των σημάτων ανάμεσα στα είδη και μεταξύ του ίδιου είδους, βοηθά τα βακτήρια να αντιληφθούν το σχετικό πλήθος τόσο των ομοειδών, όσο και των διαφορετικών κυττάρων.³²

Ο νέος φαινότυπος που εμφανίζουν τα βακτήρια με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας τα καθιστά συνήθως περισσότερο λοιμογόνα στην περίπτωση παθογόνων στελεχών, όταν ο πληθυσμός τους φθάσει σε υψηλή πυκνότητα. Επιπλέον, αποκτούν κάποια πλεονεκτήματα, που συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω.⁸

- Χρησιμοποιούν τα θρεπτικά στοιχεία του περιβάλλοντος κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο, εκκρίνοντας σε μεγάλα ποσά τα ανάλογα ένζυμα.
- Προστατεύονται καλύτερα από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, εκκρίνοντας τις τοξικές τους ουσίες σε μεγαλύτερες ποσότητες. Αντίθετα, όταν η

έκκριση των λοιμογόνων παραγόντων γίνεται σε μικρές ποσότητες, τότε η άμυνα του ξενιστή κινητοποιείται και μπορεί να τους αντιμετωπίσει.

- Ρυθμίζουν διαδικασίες ανταλλαγής γενετικού υλικού, όπως η σύζευξη.
- Επιτυγχάνουν σωστότερη δόμηση της βιομεμβράνης. Έχει βρεθεί σε μεταλλαγμένα στελέχη *P. aeruginosa* ότι η απουσία κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ λεπτής και ελλιπώς δομημένης βιομεμβράνης.
- Πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια παράγουν ενδοτοξίνες κατά το σχηματισμό της βιομεμβράνης.

Ένας τρόπος αντιμετώπισης του ανεπιθύμητου σχηματισμού βιομεμβρανών θα ήταν να αδρανοποιηθούν, να σιγάσουν τα σήματα που στέλνουν τα βακτήρια μεταξύ τους, ώστε αυτά να παραμείνουν πλαγκτονικά. Το μακροφύκος *Delisea pulchra*, στην Αυστραλία, εκλύει μια χημική ουσία που ονομάζεται φουρανόνη, η οποία εμποδίζει τα χημικά σήματα να λειτουργήσουν. Τα βακτήρια δεν αντιλαμβάνονται έτσι την παρουσία άλλων βακτηρίων και δεν ενεργοποιείται η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης.³³

Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η φουρανόνη στην αντιμετώπιση παθήσεων του ανθρώπου; Ερευνητές πειραματίστηκαν με τη γενετική νόσο κυστική ίνωση. Παιδιά που πάσχουν από κυστική ίνωση πεθαίνουν συχνά από λοίμωξη των πνευμόνων που οφείλεται στην *P. aeruginosa*. Τα βακτήρια αυτά δημιουργούν μια παχιά βιομεμβράνη, που καλύπτει τους πνεύμονες και τα προστατεύει από τα αντιβιοτικά. Όταν οι ερευνητές χορήγησαν σε ποντίκια που έπασχαν από κυστική ίνωση φουρανόνη, η νόσος θεραπεύτηκε. Αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι τα σήματα επικοινωνίας δεν λειτουργούσαν πλέον, τα βακτήρια αποσπάστηκαν από τις βιομεμβράνες και έγιναν πλαγκτονικά, με συνέπεια την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους από τα αντιβιοτικά.

Αν η προσέγγιση αυτή λειτουργήσει στον άνθρωπο, είναι πιθανόν να ανοίξει νέες προοπτικές στον έλεγχο των παθήσεών του και παράλληλα να δώσει λύσεις και σε τεχνικά προβλήματα, όπως η ανάπτυξη βιομεμβρανών σε σωλήνες, στα ύφαλα των πλοίων και αλλού.

8. ΑΙΤΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η προσκόλληση των μικροοργανισμών στις επιφάνειες και η επακόλουθη ανάπτυξή τους σε δομή βιομεμβράνης μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός επιβίωσης. Οι κύριες αιτίες για τη συμπεριφορά αυτή είναι η εύρεση τροφής και η προστασία από τα βιοκτόνα.¹³

8.1. Εύρεση τροφής

Το θέμα της εύρεσης τροφής γίνεται περισσότερο κατανοητό αν αναφερθούμε σε πτωχά σε θρεπτικά στοιχεία περιβάλλοντα, όπως είναι το πόσιμο νερό και τα υψηλής καθαρότητας συστήματα νερού. Η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών σ' αυτά μπορεί να είναι τόσο μικρή ώστε να μην μπορεί να μετρηθεί, επιτρέπει όμως την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μικροοργανισμών. Τα βακτήρια έχουν τρόπο να ανευρίσκουν τις επιφάνειες και να εκμεταλλεύονται ακόμα και τις ελάχιστες πηγές θρεπτικών στοιχείων. Συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

- Συγκέντρωση των οργανικών στοιχείων στην επιφάνεια
- Συμπύκνωση των θρεπτικών ουσιών του περιβάλλοντος υγρού από το εξωκυτταρικό πολυμερές
- Αξιοποίηση των αποβλήτων των βακτηρίων από τους δευτερογενείς αποικιστές
- Η σύνθεση διαφορετικών ενζύμων από τα διάφορα είδη αυξάνει τη δυνατότητα διάσπασης ουσιών, που ενδεχόμενα το κάθε βακτήριο από μόνο του δεν θα μπορούσε να κάνει.

8.2. Προστασία

Οι βιομεμβράνες αποτελούν για τα βακτήρια ένα προστατευτικό τείχος από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) και η θερμότητα, ταυτόχρονα δε μειώνουν την επίδραση από αλλαγές φυσικών παραμέτρων, όπως το pH και οι ανασταλτικές ουσίες.⁷ Η δέσμευση μεγάλων ποσοτήτων νερού ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο αφυδάτωσης των μικροοργανισμών. Αυτό έχει μεγάλη σημασία για τους μικροοργανισμούς του υδάτινου περιβάλλοντος, που περιοδικά αποξηραίνονται, και γι' αυτούς που ζουν στο έδαφος και υφίστανται εποχιακή αφυδάτωση. Οι βιομεμβράνες τούς προστατεύουν

επίσης από βακτηριοφάγους, από λυτικά και παρασιτικά βακτήρια, καθώς και από ευκαρυωτικούς θηρευτές.⁷ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη αντοχή των μικροοργανισμών αυτών στα αντιβιοτικά και τα απολυμαντικά.

8.2.1. Αντοχή στα αντιβιοτικά-άμυνα του ξενιστή. Η αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τη δημιουργία βιομεμβρανών είναι εξαιρετικά δύσκολη με τη χρήση αντιβιοτικών. *In vitro* μελέτες δεικνύουν ότι, για βακτήρια που αναπτύσσονται με την προσκολλημένη μορφή τους, η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ ή MIC=minimum inhibitory concentration) διαφόρων αντιβιοτικών είναι εκατοντάδες ή και χιλιάδες φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη που χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική³⁴⁻³⁶ (πίν. 4). Οι μηχανισμοί του φαινομένου της αυξημένης αντοχής μπορεί να ερμηνευτούν με τις παρακάτω διαδικασίες:⁸

- Καθυστερημένη ή αδύνατη διείσδυση του αντιβιοτικού μέσα από το στρώμα του εξωκυτταρικού πολυμερούς, είτε με το σχηματισμό συμπλεγμάτων και την επακόλουθη αδρανοποίησή τους, είτε με την παραγωγή ενζύμων που τα υδρολύουν.
- Ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των βακτηρίων, κυρίως στα κατώτερα στρώματα της βιομεμβράνης, δεν επιτρέπει σε αντιβιοτικά όπως τα β-λακταμικά να δράσουν στο κυτταρικό τοίχωμα.
- Διαμόρφωση μικροπεριβάλλοντος στο εσωτερικό της βιομεμβράνης (π.χ. μείωση του pH και της pO₂) δεν επιτρέπει σε πολλά αντιβιοτικά, όπως οι αμινογλυκοσίδες, να ασκήσουν αντιβακτηριακή δράση.
- Αλλαγή στη σύσταση των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος, κατά τη μετάπτωσή τους στην προσκολλημένη μορφή, με αποτέλεσμα κάποιοι από τους στόχους των αντιβιοτικών να μην υπάρχουν πλέον.¹³

Το σύνολο των ιδιοτήτων που αποκτούν τα βακτήρια στην προσκολλημένη τους μορφή δεν αφήνουν ανεπι-

Πίνακας 4. Συγκέντρωση αντιβιοτικών ουσιών για την αντιμετώπιση βακτηρίων βιομεμβρανών και πλαγκτονικών μορφών.

Μικροοργανισμός	Αντιβιοτικό	MIC ή MBC ελεύθερης μορφής (µg/mL)	Αποτελεσματική συγκέντρωση έναντι φαινοτύπου βιομεμβράνης (µg/mL)
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Vancomycin	2 (MBC)	20
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Imipenem	1 (MIC)	>1024
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicillin	2 (MBC)	512
<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidime	8 (MBC)	800
<i>S. sanguis</i> 804	Doxycycline	0,063 (MIC)	3,15

ρέαστη την άμυνα του ξενιστή. Έτσι, οι αμυντικοί του μηχανισμού, όπως η φαγοκυττάρωση και η έκλυση ανοσοσφαιρινών, αποδεικνύονται όχι μόνο ανεπαρκείς για την αντιμετώπιση της λοίμωξης, αλλά και επιβλαβείς για τον ασθενή, αφού δεν μπορούν να προσεγγίσουν τα βακτηριακά κύτταρα στο εσωτερικό των μικροαποικιών.³ Επιπλέον, ακόμα κι αν επιτευχθεί σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, η οψωνική δράση των αντισωμάτων δεν μπορεί να ασκηθεί, ενώ το συμπλήρωμα αδρανοποιείται από τον εξωκυτταρικό πολυσακχαρίτη. Τα μακροφάγα που συγκεντρώνονται, αδυνατούν να φαγοκυτταρώσουν τα βακτήρια που προστατεύονται στο εσωτερικό της βιομεμβράνης³⁷ και, ταυτόχρονα, εκλύοντας τα ένζυμά τους, κινητοποιούν βακτήρια που βρίσκονται στην επιφάνεια της βιομεμβράνης, με αποτέλεσμα τη διασπορά της λοίμωξης.³ Φλεγμονώδεις ουσίες που εκλύονται ταυτόχρονα, προκαλούν βλάβες στους γύρω ιστούς.³⁸

8.2.2. Προστασία από απολυμαντικά. Από τη στιγμή που τα βακτηριακά κύτταρα θα προσκολληθούν σε μια επιφάνεια με τη βοήθεια του εξωκυτταρικού πολυμερούς, ένα απλό ξέπλυμα της επιφάνειας ή ξέπλυμα και με βιοκτόνο ουσία, π.χ. σε ένα σύστημα νερού, δεν είναι αρκετό για να τα απομακρύνει. Ερευνητές παρατήρησαν ότι μετά από ξέπλυμα συστήματος διανομής νερού με κάποιο βιοκτόνο τα πλαγκτονικά κύτταρα της ψευδομονάδας θανατώθηκαν, όχι όμως και αυτά που βρίσκονταν στις βιομεμβράνες.³⁹

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε βιομεμβράνες εμφανίζουν εκπληκτική αντοχή. Σύμφωνα με τον LeChevallier, είναι 150–3000 φορές περισσότερο ανθεκτικά στο ελεύθερο χλώριο και 2–100 φορές πιο ανθεκτικά στις μονοχλωραμίνες απ' ό,τι τα πλαγκτονικά κύτταρα.⁴⁰

Στην πραγματικότητα, τα βακτήρια των βιομεμβρανών δεν είναι περισσότερο ανθεκτικά, αλλά περιβάλλονται από μια προστατευτική ασπίδα που δημιουργεί ο γλυκοκάλυκας. Το απολυμαντικό, μέχρι να φθάσει στα κύτταρα, θα πρέπει να αντιδράσει με το δίκτυο του πολυσακχαρίτη, αναλώνοντας έτσι την οξειδωτική του δράση πριν φθάσει σ' αυτά. Επιπλέον, η πρόσληψη απολυμαντικού από τα προσκολλημένα κύτταρα περιορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης του απολυμαντικού στο βασικό υδροδυναμικό στρώμα και τη βιομεμβράνη. Έτσι, απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση και μεγαλύτερος χρόνος επαφής για το απολυμαντικό, για να φθάσει στα προσκολλημένα κύτταρα, σε σχέση με τα πλαγκτονικά.

Όσον αφορά στην εμφάνιση αντοχής, τα βακτήρια δεν παρουσιάζουν την ίδια αντοχή στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση νοσημάτων ανθρώπων, ζώων και φυτών, σε σχέση με τα βιοκτόνα που

χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Η διαφορά μεταξύ τους οφείλεται στον αριθμό των στόχων πάνω ή μέσα στο κύτταρο. Έτσι, ενώ τα αντιβιοτικά έχουν μικρό αριθμό στόχων, όλα τα οξειδωτικά βιοκτόνα έχουν μεγάλο αριθμό δυνητικών σημείων-στόχων. Το χλώριο, για παράδειγμα, θεωρείται ότι έχει >100 πιθανά σημεία-στόχους πάνω ή μέσα στο μικροοργανισμό. Είναι ουσιαστικά αδύνατο για τους μικροοργανισμούς να αναπτύξουν γενική ανοχή σε τέτοιες ουσίες,¹⁹ επιτυγχάνουν όμως να προστατεύονται, εκκρίνοντας γύρω τους μεγάλες ποσότητες πολυμερούς. Έχει παρατηρηθεί ότι, μετά από επεξεργασία με κάποιο βιοκτόνο, τα κύτταρα παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερούς για να προστατεύσουν τον εαυτό τους.¹⁷

9. ΠΡΩΤΟΖΩΑ, ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ ΝΕΡΟΥ

Το δίκτυο διανομής του πόσιμου νερού αποικίζεται από σαπροφυτικούς ετερότροφους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, ζύμες, που αναπτύσσονται αποικοδομώντας την ενυπάρχουσα οργανική ύλη,⁴¹ από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως η *L. pneumophila*, τα άτυπα μυκοβακτηρίδια και πιθανά το *H. pylori*,⁶ καθώς και από μικροοργανισμούς κοπρανώδους προέλευσης, όπως π.χ. η *E. coli*. Όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί, αλλά και μεγαλύτεροι, όπως τα πρωτόζωα ή οι νηματώδεις, μπορεί να βρουν τις επιθυμητές συνθήκες στο περιβάλλον του νερού και να πολλαπλασιαστούν. Σχηματίζουν, επίσης, βιομεμβράνες με πολύπλοκες δομές, όπου το ποσοστό συμμετοχής του κάθε μικροοργανισμού ποικίλλει. Γενικά, εκτιμάται ότι η βακτηριακή βιομάζα ανέρχεται στα 10⁸ βακτηριακά κύτταρα ανά λίτρο ρέοντος νερού και στα 10⁶ βακτηριακά κύτταρα ανά cm² στις βιομεμβράνες.⁴¹

Οι προαναφερθέντες παθογόνοι μικροοργανισμοί, παρότι μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες και σε ήδη σχηματισμένες βιομεμβράνες, στην πλειοψηφία τους δεν έχουν την ικανότητα εκτεταμένης ανάπτυξης μέσα στη βιομεμβράνη. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε επειδή έχουν ιδιαίτερες τροφικές απαιτήσεις, είτε λόγω της αδυναμίας τους να ανταγωνιστούν τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς.⁶

Ένας από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που αποτελεί μέρος του φυσικού υδάτινου συστήματος είναι η *L. pneumophila*, ένα βακτήριο που μπορεί να επιβιώσει σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για να μπορέσει να αναπτυχθεί μέσα στη δομή της βιομεμβράνης φαίνεται ότι απαιτείται η παρουσία ελεύθερων πρωτο-

ζώων.⁴² Αυτό γίνεται κατανοητό αν ληφθεί υπόψη ότι η *Legionella* επιβιώνει στο νερό και σε υγρά περιβάλλοντα, ως ενδοκυτταρικό παράσιτο των ελεύθερων πρωτόζωων, και επίσης ότι δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί εξωκυτταρικά μέσα στον όγκο του νερού.⁴³ Σε μελέτη που έγινε σε μοντελοποιημένο σύστημα πόσιμου νερού, φάνηκε ότι μπορεί να υπάρξει *Legionella* και επί απουσίας των πρωτόζωων, επιβεβαιώθηκε όμως και πάλι ότι δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί.⁴² Διάφορα ελεύθερα πρωτόζωα, όπως η *Naegleria* και η *Acanthamoeba*, χρησιμοποιούν τη *L. pneumophila* ως μοναδική πηγή τροφής.⁴⁴ Κατά τη διαδικασία της απορρόφησης της *Legionella* από τα πρωτόζωα, είναι πιθανόν είτε να γίνει πέψη του βακτηρίου και να εξασφαλιστεί η θρέψη τους, είτε να θανατώσει η *Legionella* το πρωτόζωο, είτε να καταφέρει να επιβιώσει, όπως συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, να πολλαπλασιαστεί μέσα στο κενотόπιό του και να διατηρηθεί εκεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα.⁴⁵

Η ανάπτυξη της *Legionella* μέσα στα πρωτόζωα και στις βιομεμβράνες παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της νόσου των λεγεωναρίων, καθώς αυξάνει την ικανότητα επιβίωσής της και την αντοχή της στην υψηλή θερμοκρασία, στην οξύτητα και στα απολυμαντικά.⁴⁶ *Legionella* σε κύστη της *Acanthamoeba polyphaga* επιβίωσε μετά από έκθεση σε 50 mg/L ελεύθερου χλωρίου!⁴⁷ Επίσης, κατάφερε να επιβιώσει μετά από θερμική απολύμανση σε σωληνώσεις νερού και να αναπτυχθεί ξανά μετά από μερικούς μήνες, μέσα σε αμοιβάδες.⁴⁸

Έχει βρεθεί ότι η *L. pneumophila*, σε δίκτυο νερού με πλαστικούς σωλήνες, επικρατεί των άλλων μικροοργανισμών στις βιομεμβράνες, ξεπερνώντας το 50% της ολικής χλωρίδας της βιομεμβράνης και σε θερμοκρασία 40 °C. Φαίνεται δηλαδή να ευνοείται η ανάπτυξη στις πλαστικές επιφάνειες, ενώ σε χάλκινους σωλήνες παρατηρήθηκε καταστολή της βιοσυσσώρευσης και μειωμένος αριθμός βακτηρίων *L. pneumophila*.⁴⁹ Ο περιορισμός στη συγκέντρωση σιδήρου οδηγεί σε μεγάλη μείωση της μολυσματικότητας της *Legionella*.⁵⁰ Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία και με τα ευρήματα διαφόρων άλλων μελετών, που έχουν διαπιστώσει αρνητική συσχέτιση του αριθμού των απομονούμενων λεγεωνελλών από συστήματα κυκλοφορίας νερού και της παρουσίας ιόντων χαλκού και θετική συσχέτιση με την παρουσία ιόντων σιδήρου στο νερό που κυκλοφορεί σε αυτά.⁵¹ Η παρουσία λοιπόν μεταλλικών εξαρτημάτων και προϊόντων διάβρωσης στα υδραυλικά συστήματα, αλλά και σε άλλα συστήματα νερού (πύργοι ψύξης, συστήματα κλιματισμού), αποτελεί πηγές σιδήρου και άλλων μετάλλων, που ευνοούν την επιβίωση και την ανάπτυξη της *Legionella* spp.⁵²

Παρατηρήθηκε ότι, σε περίπτωση έλλειψης σιδήρου, τα πλειομορφικά κύτταρα της *Legionella* spp μετατρέπονται σε λεπτά ραβδία.⁵⁰ Είναι γνωστό ότι η *Legionella* spp μεταπίπτει στη βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (VBNC) σε περίπτωση έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Όμως, απλή προσθήκη θρεπτικών στοιχείων δεν επιφέρει αναζωογόνηση των βακτηρίων. Αντίθετα, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη συγκεκριμένων αμοιβάδων, που αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές της στο υδάτινο περιβάλλον, επιτρέπει την αναζωογόνησή της.⁵³ Τα προαναφερθέντα συμφωνούν και με το γεγονός ότι κύτταρα της *Legionella* spp με τη μορφή λεπτών ραβδίων που απομονώθηκαν από πόσιμο νερό παρατηρήθηκε να πολλαπλασιάζονται μέσα σε κύτταρα του πρωτόζωου *Acanthamoeba*, γεγονός που υποδεικνυε ότι πιθανόν υπήρχε προηγουμένως μέσα στο νερό έλλειψη σιδήρου⁵⁴ ή κάποιος άλλος στρεσογόνος παράγοντας, η παρουσία όμως του πρωτόζωου βοήθησε την επανανάπτυξη του βακτηρίου.

Μια άλλη συνέπεια από την ανάπτυξη της *Legionella* spp μέσα στα πρωτόζωα είναι η αύξηση της μολυσματικότητας. Παρατηρήθηκε ότι *L. pneumophila* που είχε μολύνει πρωτόζωα *H. vermiformis* εμφάνιζε αυξημένη μολυσματικότητα σε σχέση με ισοδύναμο αριθμό ελεύθερων κυττάρων *L. pneumophila*.⁵⁵ Έχει μάλιστα προταθεί, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί, ότι το μολυσματικό σωματίδιο στη λεγεωνέλλωση είναι όχι τα βακτήρια από μόνα τους, αλλά τα βακτήρια μέσα στα πρωτόζωα.⁵⁶

Όπως αναφέρθηκε, η παρουσία λεγεωνέλλας συνδέεται με την παρουσία των πρωτόζωων, μικροοργανισμών που εκτιμήθηκε ότι ο αριθμός τους ανέρχεται στα 10⁵ κύτταρα ανά λίτρο στο νερό και στα 10³ κύτταρα ανά cm² στις βιομεμβράνες. Τα πρωτόζωα που ανιχνεύθηκαν στις βιομεμβράνες ανήκαν σε δύο κατηγορίες, τις thecamoebae (48%) και τα βλεφαριδοφόρα (52%).⁴¹ Οι οργανισμοί αυτοί φαίνεται ότι μπορούν να πολλαπλασιάζονται κατά τη διαδικασία επεξεργασίας του νερού, στα φίλτρα ενεργού άνθρακα και στο δίκτυο. Η δυνατότητα πρόκλησης νόσου από κάποια πρωτόζωα, π.χ. εγκεφαλίτιδας από τις αμοιβάδες, καθώς και ο ρόλος τους στη διατήρηση του πληθυσμού της *Legionella* spp, αποδίδουν ιδιαίτερη σημασία στην παρουσία τους, αλλά συνιστούν και λόγο προβληματισμού, στο βαθμό που η ανεύρεση ιδίως μεγάλων αριθμών λεγεωνελλών στο νερό ενός συστήματος κυκλοφορίας νερού θα παραπέμπει σε αυξημένους αριθμούς παθογόνων ειδών πρωτόζωων, π.χ. *Acanthamoeba* κ.λπ. Τέτοια συστήματα κυκλοφορίας νερού είναι, για παράδειγμα, οι κολυμβητικές δεξαμενές, όπου περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία περιστατικά κολυμβητών που νόσησαν από τέτοιου είδους

πρωτόζωα. Από την άλλη πλευρά, επίσης, υπάρχουν ευρήματα από έρευνες στο εξωτερικό που απομόνωσαν λεγεωνέλλες σε κολυμβητικές δεξαμενές.^{57,58} Στον Ελληνικό χώρο, βέβαια, αποτελέσματα από πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι δεν βρέθηκαν βακτήρια λεγεωνέλλας τόσο σε αυτό καθαυτό το νερό των κολυμβητικών δεξαμενών όπου πραγματοποιήθηκε η έρευνα, όσο και στα συστήματα κυκλοφορίας ζεστού και κρύου νερού των εγκαταστάσεων των κολυμβητηρίων.⁵⁹

Λόγω της διατροφικής τους δραστηριότητας, τα πρωτόζωα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βακτηριακής βιομάζας που παράγεται σε ένα δίκτυο πόσιμου νερού, αλλά και στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αυτόχθονων και αλλόχθονων βακτηριακών πληθυσμών του υδάτινου οικοσυστήματος.⁴¹

Στοιχεία για το επίσης παθογόνο *Cryptosporidium* και τη σύνδεσή του με τις βιομεμβράνες έδωσε μια μελέτη που αφορούσε σε επιδημία κρυσποσποριδίασης στην Αγγλία. Διαπιστώθηκε ότι μετά από την έκρηξη της επιδημίας και την αλλαγή της πηγής υδροδότησης και ενώ δεν διαπιστώθηκε νέα πηγή μόλυνσης, ανιχνεύονταν κύστεις σε χαμηλότερα επίπεδα για 20 ημέρες ακόμα, μετά από την αλλαγή της πηγής. Θεωρήθηκε, δηλαδή, ότι απελευθερώνονταν σταδιακά κύστεις που είχαν παγιδευτεί στις βιομεμβράνες οι οποίες υπήρχαν στις επιφάνειες των σωλήνων.⁶⁰

10. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ

Η απομάκρυνση ή και η καταστροφή των βιομεμβρανών μπορεί να γίνει είτε με χημική, είτε με φυσική επεξεργασία ή με συνδυασμό και των δύο μεθόδων.¹³

10.1. Χημική επεξεργασία

Προκειμένου να προσδιοριστεί η απολυμαντική ικανότητα κάποιου βιοκτόνου, έχουν γίνει διάφορες δοκιμές με εργαστηριακά στελέχη και βέβαια στην πλαγκτονική και όχι στην προσκολλημένη μορφή τους. Υπολογίζεται έτσι η σταθερά CT για το συγκεκριμένο απολυμαντικό, που είναι το αποτέλεσμα του γινομένου της συγκέντρωσης (C) του απολυμαντικού επί το χρόνο (T) που απαιτείται να δράσει, προκειμένου να θανατώσει τα στελέχη αυτά. Ο πίνακας 5 δίνει τις συγκεντρώσεις και το χρόνο επαφής για διάφορες κατηγορίες βιοκτόνων.¹⁹

Όμως, στην περίπτωση των βιομεμβρανών δεν μπορεί να προσδιοριστεί αυτή η σταθερά. Γιατί συμβαίνει αυτό και τι συνέπειες έχει στα συστήματα νερού;

Συγκέντρωση 0,5–2,0 ppm υπολειμματικού χλωρίου στο νερό συνήθως είναι αρκετή για να θανατώσει τα πλαγκτονικά βακτήρια, όχι όμως και αυτά που βρίσκονται στις βιομεμβράνες. Σε αποκολλημένα κομμάτια βιομεμβράνης μπορεί να διατηρηθούν βιώσιμα βακτήρια στο εσωτερικό της μάζας τους, τα οποία αναπτύσσονται στις καλλιέργειες. Αυτός μπορεί να είναι ένας λόγος που εξηγεί γιατί ανιχνεύουμε βακτήρια, ενώ το νερό έχει χλώριο!¹³

Ιδιαίτερα προβλήματα δημιουργεί η *P. aeruginosa*, η οποία παράγει μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικού πολυμερούς και συνεπώς είναι περισσότερο ανθεκτική στο χλώριο. Σε μονάδα εκτροφής ζώων προσδιόρισαν ότι απαιτούνται περίπου 3 ppm χλωρίου σε νερό αντίστροφης ώσμωσης, για να πετύχουν χαμηλές μετρήσεις ψευδομόναδας.¹³

Τα χημικά βιοκτόνα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα οξειδωτικά και τα μη οξειδωτικά. Παρακάτω αναφέρονται διάφορα οξειδωτικά βιοκτόνα με τη σειρά αποτελεσματικότητάς τους, σύμφωνα με τον Mittelman, από το ισχυρότερο προς το ασθενέστερο (αφορά σε δόση του 1 mg/L):

Όζον > διοξείδιο του χλωρίου > χλώριο > ιώδιο
> υπεροξείδιο του υδρογόνου

Σύμφωνα με τον παραπάνω ερευνητή, το χλώριο είναι πιθανόν το πλέον φθινό και το περισσότερο αποτελεσματικό απ' όλα τα οξειδωτικά και μη οξειδωτικά βιοκτόνα. Η υψηλή δραστηριότητά του έχει ως αποτέλεσμα να θανατώνονται όχι μόνο τα πλαγκτονικά, αλλά και τα προσκολλημένα βακτήρια. Επίσης, αντιδρά και με τον πολυσακχαρίτη, καταστρέφοντας τον ιστό που έχει σχηματίσει, ακόμα δε και τα σημεία σύνδεσής του με την επιφάνεια. Καταστρέφοντας το εξωκυτταρικό πολυμερές,

Πίνακας 5. Τυπικές δόσεις βιοκτόνων [1 mg/L=1 ppm] (Mittelman 1986).

Βιοκτόνα	Δόση (mg/L)	Χρόνος επαφής (ώρες)
Χλώριο	50-100	1-2
Όζον	10-50	<1
Διοξείδιο του χλωρίου	50-100	1-2
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	10% (v/v)	2-3
Ιώδιο	100-200	1-2
Τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου	300-1000	2-3
Φορμαλδεΰδη	1-2% (v/v)	2-3
Ανιονικά και μη ιονικά απορρυπαντικά	300-500	3-4

το χλώριο διασπά την ακεραιότητα της δομής της βιομεμβράνης.

Στα μη οξειδωτικά βιοκτόνα περιλαμβάνονται οι τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, η φορμαλδεΐδη και τα ανιονικά και μη ιονικά απορρυπαντικά. Οι τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, εκτός της βιοκτόνου δράσης τους, είναι και αποτελεσματικά απορρυπαντικά, γι' αυτό και αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην αδρανοποίηση και την απομάκρυνση των βιομεμβρανών από επιφάνειες.

10.2. Φυσική επεξεργασία

Η φυσική επεξεργασία περιλαμβάνει τη χρήση ζεστού νερού και τη μηχανική αφαίρεση με τρίψιμο.

10.2.1. Θέρμανση. Στα συστήματα νερού για φαρμακευτική χρήση (ενέσιμα), προκειμένου να θανατώσουν τα βακτήρια, χρησιμοποιούν κυκλώματα επανακυκλοφορίας ζεστού νερού (>80 °C). Σύμφωνα με τον Mittelman, όταν αυτό συμβαίνει συνεχώς, θανατώνονται τα πλαγκτονικά βακτήρια και μειώνεται η ανάπτυξη της βιομεμβράνης. Όμως, έχουν βρεθεί βιομεμβράνες και σε νερό θερμοκρασίας 80 °C. Περιοδική απολύμανση με ζεστό νερό μπορεί να καταστρέψει τα βακτήρια στις βιομεμβράνες, αλλά αυτό απαιτεί θερμοκρασία 95 °C για περισσότερο από 100 min,⁶¹ γεγονός πρακτικά μη εφαρμόσιμο σε ένα σύστημα κατανάλωσης πόσιμου νερού.

10.2.2. Μηχανική απομάκρυνση. Καλά αναπτυγμένες βιομεμβράνες δεν μπορούν να απομακρυνθούν από τα τοιχώματα αποθηκευτικών δεξαμενών νερού μόνο με χρήση χημικών ουσιών.¹⁹ Απαιτείται και μηχανική απομάκρυνση (τρίψιμο) ή εφαρμογή ψεκάσμου με υψηλή πίεση ή συνδυασμός αυτών. Προκειμένου να αποφεύγεται ο συχνός καθαρισμός, πρέπει να διατηρείται το απαραίτητο επίπεδο χλωρίου στο αποθηκευμένο νερό, ώστε να μην αναπτύσσονται πολύ οι βιομεμβράνες.

Όσον αφορά στα συστήματα διανομής νερού, όμως, ο μηχανικός καθαρισμός είναι πρακτικά μη εφικτός, γι' αυτό διατηρείται και στην περίπτωση αυτή το απαραίτητο επίπεδο χλωρίου.

10.3. Επανανάπτυξη της βιομεμβράνης

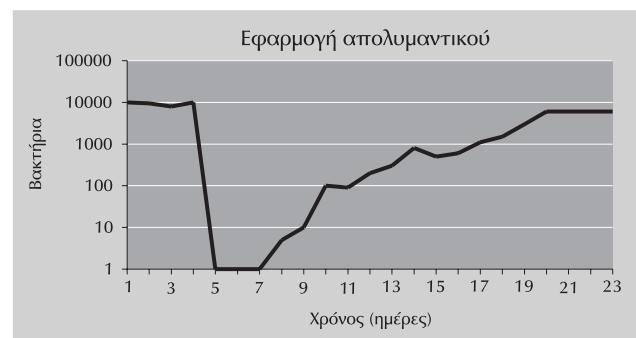
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα βακτήρια που ζουν στις βιομεμβράνες είναι πολύ δυσκολότερο να θανατωθούν ή να απομακρυνθούν από τις επιφάνειες, απ' ό,τι τα πλαγκτονικά βακτήρια. Πολλοί ερευνητές παρατήρησαν ότι οι βιομεμβράνες αρχίζουν να επανασχηματίζονται αμέσως μετά από την εφαρμογή χλωρίωσης. Στην εικόνα 10 φαίνεται ο τυπικός επανασχηματισμός της βιο-

μεμβράνης μετά από την απολύμανση. Οι μετρήσεις των βακτηρίων φθάνουν στο μηδέν με την ολοκλήρωση της απολύμανσης, αλλά ακολουθεί μια σταδιακή αύξησή τους έως σχεδόν το επίπεδο πριν από την απολύμανση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, η ανάπτυξη αρχίζει δύο ημέρες μετά από την απολύμανση και φθάνει στο αρχικό επίπεδο (κατάσταση ισορροπίας) μετά από 20 ημέρες.

Σύμφωνα με τον Characklis, η επαναδημιουργία της βιομεμβράνης οφείλεται σε έναν ή σε όλους τους παρακάτω λόγους:⁶²

- Μετά από την απολύμανση, η απομένουσα βιομεμβράνη περιέχει βιώσιμα βακτήρια, τα οποία, χωρίς να περάσουν τη λανθάνουσα φάση, συνεχίζουν γρηγορότερα την ανάπτυξή τους αμέσως μετά από το πλήγμα της χλωρίωσης απ' ό,τι κατά την αρχική προσκόλλησή τους στην επιφάνεια του σωλήνα.
- Η βιομεμβράνη που απομένει στην επιφάνεια μετά από την απολύμανση, την καθιστά περισσότερο τραχιά από την καθαρή επιφάνεια. Αυτό βοηθά στη μεγαλύτερη αρχική συσσώρευση μικροοργανισμών και άλλων στοιχείων από το νερό.
- Το χλώριο απομακρύνει κυρίως το εξωκυτταρικό πολυμερές και όχι τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία και φέρνει σε επαφή με τα θρεπτικά στοιχεία του περιβάλλοντος μετά από την ολοκλήρωση της απολύμανσης.
- Οι οργανισμοί που επιβιώνουν μετά από την απολύμανση παράγουν περισσότερο εξωκυτταρικό πολυμερές, ως αντίδραση προστασίας στο ερέθισμα που δέχθηκαν από το χλώριο.
- Παρατηρείται επιλογή των περισσότερο ανθεκτικών οργανισμών στα απολυμαντικά.

Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι όσοι παράγουν μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικού πολυμερούς, όπως η ψευδομονάδα.



Εικόνα 10. Εκ νέου σχηματισμός της βιομεμβράνης μετά από απολύμανση. Οι μετρήσεις των βακτηρίων πραγματοποιούνταν ανά ημέρα.

11. ΒΙΟΔΙΑΒΡΩΣΗ

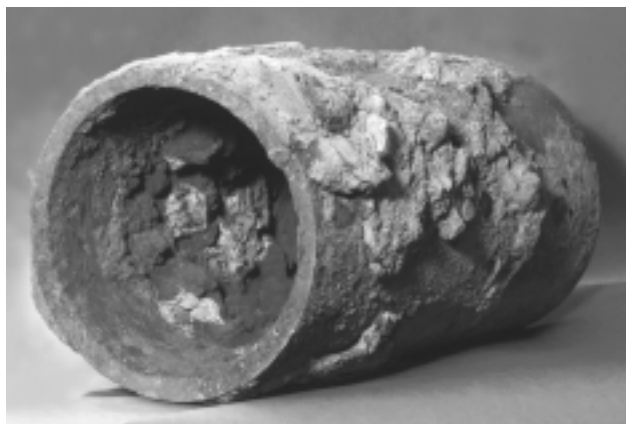
Η φυσική παρουσία μικροοργανισμών σε μεταλλικές επιφάνειες, καθώς και οι μεταβολικές τους δραστηριότητες, δημιουργούν τη μικροβιολογικά προκαλούμενη διάβρωση ή βιοδιάβρωση (microbiologically-influenced corrosion, MIC). Η παρουσία των μικροοργανισμών τροποποιεί την απόθεση και τις ταχύτητες διάλυσης των ανόργανων υλικών και με το μηχανισμό αυτόν επηρεάζει τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες των μετάλλων και των κραμάτων.^{6,3} Το αποτέλεσμα της βιοδιάβρωσης μπορεί να είναι δημιουργία διάβρωσης, βελονισμός, ρωγμώδης διάβρωση, επιλεκτική αποδέσμευση μετάλλου από κράματα, ρωγμώδης διάβρωση λόγω ανάπτυξης τάσης, διάβρωση κάτω από αποθέσεις.^{1,3} Στην εικόνα 11 εμφανίζεται το αποτέλεσμα της βιοδιάβρωσης σε σωλήνα.

11.1. Μηχανισμοί βιοδιάβρωσης

Βιοδιάβρωση μπορεί να προκληθεί σε επιφάνειες στις ακόλουθες περιπτώσεις:^{1,3}

11.1.1. Επιφάνειες με έλλειψη ή διαφορετική συγκέντρωση οξυγόνου. Η προστασία των ανοξειδωτών μετάλλων από τη διάβρωση στηρίζεται στην επικάλυψη της επιφάνειάς τους από ένα σταθερό στρώμα οξειδίου. Καταστροφή του στρώματος αυτού, ακόμα και από μικροοργανισμούς, οδηγεί σε διάβρωση.

Όπως έχει αναφερθεί, οι αποικίες που αναπτύσσονται στις δομές των βιομεμβρανών δεν αποτελούνται από ενιαίο μικροβιακό πληθυσμό, συνεπώς ούτε όμοιες είναι ούτε έχουν τις ίδιες μεταβολικές λειτουργίες. Έτσι, στα ανώτερα στρώματα των βιομεμβρανών επικρατούν αερόβιες συνθήκες, ενώ κάτω από το στρώμα αυτό η συγκέντρωση του οξυγόνου μειώνεται και καταλήγει σε



Εικόνα 11. Διαβρωμένος σωλήνας από δίκτυο διανομής νερού. Πηγή: MSU Center for Biofilm Engineering.

αναερόβιες συνθήκες κοντά στην επιφάνεια του μετάλλου. Η ύπαρξη διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου σε δύο διαφορετικές περιοχές (σε επιφάνεια μετάλλου κάτω από την αποικία και σε μη αποικισμένη περιοχή) προκαλεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού και συνεπώς διαβρωτικά ρεύματα. Η περιοχή όπου επικρατούν οι αναερόβιες συνθήκες γίνεται άνοδος και η μη αποικισμένη περιοχή όπου υπάρχει οξυγόνο γίνεται κάθοδος.^{1,7}

11.1.2. Θειοαναγωγικά βακτήρια. Στα κατώτερα στρώματα των βιομεμβρανών δημιουργούνται συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, κατάλληλες για την ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως τα θειοαναγωγικά βακτήρια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν την πλέον συχνή αιτία βιοδιάβρωσης, ανάγοντας τα θειικά σε υδρόθειο, το οποίο αντιδρά με τα μέταλλα και παράγει θειούχα άλατα μετάλλων ως προϊόντα διάβρωσης. Σύνηθες σημείο ανάπτυξης των θειοαναγωγικών βακτηρίων είναι τα θερματικά σημεία του δικτύου, όπου το νερό είναι στάσιμο. Χαρακτηριστικά διάβρωσης αυτής της κατηγορίας είναι η οσμή υδρόθειου (χαλασμένο αυγό), το μαύρισμα του νερού και οι μαύρες αποθέσεις (θειώδη άλατα του μετάλλου).^{1,7,64}

Η δραστηριότητα των θειοαναγωγικών βακτηρίων θα μπορούσε να μειωθεί με ελάττωση των βασικών θρεπτικών τους στοιχείων όπως ο φωσφόρος, το άζωτο, το θείο, γεγονός που θα μπορούσε να συμβεί σε συστήματα καθαρού νερού (αντίστροφης ώσμωσης ή αποιονισμένο). Επίσης, σημαντική είναι η συμβολή οποιασδήποτε πρακτικής μειώνει το πάχος των βιομεμβρανών (ξέπλυμα, απολύμανση, περιορισμός των θερματικών σημείων και ρωγμών) και κατά συνέπεια και τις αναερόβιες συνθήκες.⁶⁴

11.1.3. Παραπροϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων. Τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού ορισμένων βακτηρίων αποτελούν μια άλλη αιτία διάβρωσης. Σ' αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί:

- **Βακτήρια που παράγουν οξέα**

Τα βακτήρια μπορούν να παράγουν διαβρωτικούς μεταβολίτες, όπως τα οργανικά και τα ανόργανα οξέα. Για παράδειγμα, ο *Thiobacillus thiooxidans* παράγει θειικό οξύ και το *Clostridium acetivum* οξικό οξύ. Τα οξέα που παράγουν τα βακτήρια επιταχύνουν τη διάβρωση, διαλύοντας το προστατευτικό οξείδιο της μεταλλικής επιφάνειας και επιταχύνοντας την ταχύτητα καθοδικής αντίδρασης.^{1,7}

- **Βακτήρια που παράγουν υδρογόνο**

Πολλοί μικροοργανισμοί παράγουν αέριο υδρογόνο ως προϊόν της ζύμωσης των υδρογονανθράκων. Το

υδρογόνο διαχέεται στο μέταλλο, δημιουργώντας εύθραυστα υδρίδια του μετάλλου.

- *Σιδηροβακτήρια*

Τα βακτήρια που οξειδώνουν το σίδηρο, όπως η *Gallionella*, ο *Sphaerotilus*, ο *Leptothrix* και ο *Crenothrix*, είναι αερόβια νηματοειδή βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν το διαλυτό δισθενή σίδηρο στην αδιάλυτη τρισθενή μορφή του. Ο δισθενής σίδηρος μπορεί να προέρχεται είτε από το εισερχόμενο νερό, είτε από την επιφάνεια του μετάλλου. Ο τρισθενής σίδηρος που παράγουν τα βακτήρια έλκει τα ιόντα του χλωρίου και παράγει αποθέσεις τρισθενούς χλωριούχου σιδήρου. Τα σιδηροβακτήρια που αναπτύσσονται σε ανοξείδωτο χάλυβα (austenitic stainless steel) δημιουργούν αποθέσεις που έχουν τυπικά καφέ ή κόκκινο καφέ χρώμα.

12. ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΥΓΡΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, με τον όρο βιομεμβράνες (biofilms) αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και υμένια που σχηματίζονται στην επιφάνεια νερού ή άλλων υγρών, στο σημείο επαφής υγρού και αέρα (air-water interface). Αναφέρονται επίσης με τον όρο επιφανειακή βιομεμβράνη (surface biofilm)⁶⁵ ή pellicle.⁶⁶ Παρότι στην αναζήτηση δεδομένων από τη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιήθηκαν οι μεγαλύτερες μηχανές αναζήτησης, εντούτοις τα στοιχεία που συλλέχθηκαν είναι πολύ περιορισμένα.

12.1. Περιγραφικά στοιχεία

Στο σημείο επαφής νερού και αέρα (air-water interface) παρατηρείται μια δυναμική ανταλλαγή αερίων, νερού, οργανικών και ανόργανων συστατικών. Οι ιδιότητες των μορίων στο χώρο αυτό διαφέρουν από εκείνες των ίδιων μορίων, όταν βρίσκονται μέσα στον όγκο του νερού. Οι ιδιότητες αυτές χαρακτηρίζονται ως επιφανειακή τάση των υδάτινων συστημάτων και βοηθούν στη δημιουργία των επιφανειακών βιομεμβρανών. Ο ενδιάμεσος αυτός χώρος χαρακτηρίζεται από μεγάλη διακύμανση, κάθε στιγμή, των μεταβλητών που τον επηρεάζουν, όπως η ακτινοβολία, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση αερίων και αλάτων και η μηχανική ανατάραξη. Επίσης, λόγω της βαρύτητας παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση σωματιδίων στην επιφάνεια του νερού, βαρύτερων από τον αέρα, ελαφρύτερων όμως από το νερό. Τα διάφορα συστατικά που συσσωρεύονται στην επιφάνεια του νερού σχηματίζουν μικροστρώματα, το πάχος των οποίων υπολογίζεται από ερευνητές σε 30–300 μm. Ανάλυση μικροστροφμάτων από την επιφάνεια της θάλασσας έδειξε ση-

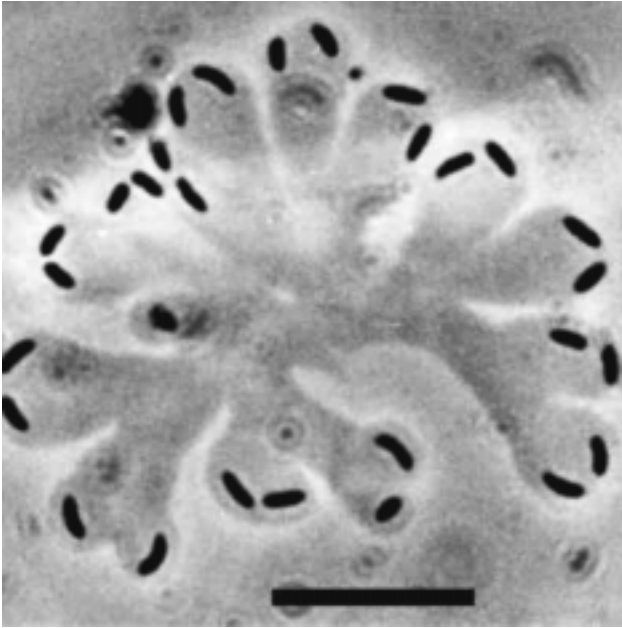
μαντική συγκέντρωση μετάλλων και πολυχλωριωμένων συστατικών, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, λιπιδίων, λιπαρών οξέων και άλλων οργανικών συστατικών.⁶⁷

Αυτή η πλούσια και ενεργός ζώνη (air-water interface) αποτελεί το περιβάλλον που φιλοξενεί διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και πρωτόζωα, με τις εκκρίσεις των οποίων δημιουργούνται οι βιομεμβράνες, όπου σταδιακά ενσωματώνονται και άλλα υλικά.⁶⁵ Πολύπλοκες δομές βιομεμβρανών σχηματίζονται και σε επιφάνειες υγρών, στις οποίες αποσυντίθεται οργανική ύλη.⁶⁶ Ένα από τα πλέον εντυπωσιακά υμένια (pellicle) σχηματίζεται κατά την τοποθέτηση ενός κρεμμυδιού στο νερό, όπου δεν αναπτύσσονται ρίζες ή μίσχοι, αλλά το κρεμμύδι αρχίζει να αποσυντίθεται δημιουργώντας ένα πλούσιο, χωρίς έντονη οσμή υμένιο στην επιφάνεια του νερού. Το υμένιο αυτό περιλαμβάνει πολυάριθμους Gram-αρνητικούς και Gram-θετικούς βακίλους, από τους οποίους οι τελευταίοι περιέχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων που σχηματίζουν ενδοσπόρια. Παρότι οι βιομεμβράνες στην επιφάνεια του νερού διαλύονται σχετικά εύκολα από την κίνηση του νερού, εντούτοις παραμένουν μετά από τη διάσπαση μικροί πυρήνες βιομεμβράνης, από τους οποίους μπορεί να σχηματιστεί και πάλι η μικροβιακή κοινότητα μόλις επέλθει ηρεμία.

Σημαντική στις κοινότητες αυτές είναι η παρουσία των πρωτοζώων, που παρουσιάζουν τον ίδιο τρόπο προσκόλλησης και κίνησης όπως και στις στερεές επιφάνειες και τρέφονται με τα βακτήρια που ζουν στο περιβάλλον αυτό.⁶⁵

Το πλέον γνωστό βακτήριο από τους επιπλέοντες μικροοργανισμούς είναι η *Nevskia ramosa*, που σχηματίζει επίπεδες δομές ως ροζέτες, οι οποίες διακλαδίζονται όταν τα κύτταρα διαιρούνται⁶⁸ (εικ. 12). Οι μίσχοι στις ροζέτες αυτές δομούνται από πολυσακχαρίτες. Η βιομεμβράνη της *Nevskia* είναι υδρόφοβη και αρκετά παχιά, ώστε να μπορεί να συγκρατήσει σταγόνα νερού πάνω της (εικ. 13).

Σημαντικός είναι ο ρόλος των επιφανειακών βιομεμβρανών στην εξασθένιση του φωτός που διέρχεται μέσα απ' αυτό, αλλά και στην επικάλυψη των σωματιδίων που φθάνουν στην επιφάνεια του νερού, με οργανική ύλη, επηρεάζοντας έτσι και τη ζωή μέσα στο νερό. Επίσης, αποτελεί πηγή τροφής για τα ασπόνδυλα,⁶⁵ είτε άμεσα όπως στην περίπτωση της προνύμφης του ανωφελούς κώνωπα, είτε έμμεσα με διάφορους μηχανισμούς, κατά τους οποίους μεταφέρεται ύλη μέσα στη μάζα του νερού και στο βένθος και στην προκειμένη περίπτωση έχουμε ένα παράδειγμα σαφούς συμμετοχής της βιομεμβράνης αυτής στην πρόκληση της ελνοοσίας.



Εικόνα 12. Μικροσκοπία της *Nevskia ramosa* στην επιφάνεια του νερού. Μπάρα=10 μm. Πηγή: www.microbiological-garden.net



Εικόνα 13. Σταγόνα νερού πάνω σε βιομεμβράνη της *Nevskia*. Πηγή: www.microbiological-garden.net

Συνοπτικά, οι επιφανειακές βιομεμβράνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδάτινων συστημάτων, όμως είναι ακόμα λιγοστά τα στοιχεία για τον ακριβή προσδιορισμό της δομής και της σημασίας τους, ιδίως στα πλαίσια της συμμετοχής στην πρόκληση νόσων και της επίπτωσής τους στη δημόσια υγεία.

13. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διαπίστωση ότι όλο και περισσότερες λοιμώξεις οφείλονται σε μικροοργανισμούς που δρουν μέσω σχηματισμού βιομεμβρανών, καθιστά επιτακτική την ανάγκη

κη διερεύνησης της ζωής των μικροβίων στις δομές αυτές. Η χρήση αντιβιοτικών, συνήθως, δεν είναι αρκετή για την αντιμετώπισή τους, ενώ στην περίπτωση χρόνιων λοιμώξεων από βιοϊατρικά πρόσθετα η μόνη λύση πολλές φορές είναι η απομάκρυνση του εμφυτεύματος.

Όσον αφορά στο δίκτυο διανομής του πόσιμου νερού, είναι σημαντική η γνώση της έκτασης ανάπτυξης βιομεμβρανών σ' αυτό, των στελέχων που το αποικίζουν και της επίπτωσής τους στην ποιότητα του νερού και κατ' επέκταση στην υγεία του υδρευόμενου πληθυσμού.

Στο πεδίο της μικροβιολογίας γίνεται αποδεκτός κάθε μέρα και περισσότερο ο φαινότυπος της βιομεμβράνης. Οι ερευνητές στον τομέα της κλινικής και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, στα τρόφιμα και στα νερά, έχουν αρχίσει να μελετούν τις μικροβιολογικές διαδικασίες από την πλευρά του σχηματισμού βιομεμβράνης. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ειδική έκφραση των γονιδίων της προσκολλημένης μορφής των βακτηρίων, στο επίπεδο της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και στον προσδιορισμό, τελικά, των ουσιών που θα εμποδίζουν ή θα δυσχεραίνουν τη δημιουργία βιομεμβράνης.

Επίσης, ερωτήματα που περιμένουν απάντηση αφορούν στο ρόλο της βιομεμβράνης ως αποθήκη παθογόνων, σε χρόνιες παθήσεις και στη μικροβιακή αντοχή.

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης των προβλημάτων που δημιουργούνται από την ανάπτυξη βιομεμβρανών είναι η πρόληψη και ο έλεγχος σχηματισμού τους. Οι ερευνητές μελετούν τις χημικές ουσίες (παράγοντες sigma), οι οποίες δίνουν το σήμα στα βακτήρια για αλλαγή του βιοχημικού τους φαινοτύπου σε αυτόν της προσκολλημένης μορφής (Costerton 1995). Σύμφωνα με τον Cogliari (1996), στόχος είναι να βρεθεί ένας «αντίστροφος παράγοντας sigma», ο οποίος θα άλλαζε τα προσκολλημένα βακτήρια σε πλαγκτονικές μορφές, οδηγώντας έτσι στη μη δημιουργία καταρχήν και στη διάλυση ενδεχόμενα της υπό δημιουργία βιομεμβράνης. Η σκέψη που γεννήθηκε στους ερευνητές αυτούς πριν από περίπου 10 χρόνια, άρχισε να πραγματώνεται και να διαφαίνονται οι πρώτες ελπίδες ότι, πράγματι, μπορεί η αντιμετώπιση των μη επιθυμητών βιομεμβρανών να γίνει με αυτόν τον τρόπο. Οι ενδείξεις αυτές, όπως αναφέρθηκε, προέκυψαν με την ανακάλυψη της φουρανόνης ως αναστολέα της δράσης των «χημικών σημάτων». Ωστόσο, παραμένει ακόμα ο έλεγχος της υπόθεσης αυτής στην περίπτωση του ανθρώπου, αλλά και όπου αλλού δημιουργούνται προβλήματα από το σχηματισμό βιομεμβρανών και το γεγονός αυτό προφανώς απαιτεί συνέχιση της έρευνας και της μελέτης του εν λόγω φαινομένου.

ABSTRACT

Biofilms, man, environment

Z.MELABIANAKI,^{1,2} E.VELONAKIS,² A.VATOPOULOS²

¹Department of Water Quality Control, Water Supply and Sewrage Company of Athens, ²Department of Microbiology National School of Public Health, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2007, 24(5):411–431

Microorganisms do not only exist as free-floating cells, but are commonly attached to either an inert or a living surface (sessile bacteria). They produce an extracellular polymere and, with other components create complex structures, called biofilms. Biofilms, although common, are not a well-known entity. They grow wherever sufficient moisture is present: in the kitchen, on the interior surface of water pipes, on contact lenses. The gel-like film on the inside of a flower vase, the slippery slime on river stones, and the plaque on teeth are all biofilms. The appearance of biofilms depends on the species of microorganisms and their growing environment. The sessile bacteria have advantages compared to the planktonics regarding utilization of nutrients and protection from biocides. When bacteria are attached to a surface, a new phenotype appears, with the following main properties: different metabolism, increased resistance to antibiotics and disinfectants, increased exchange of genetic material, communication via special molecules-signals. The consequences of the development of biofilms for health and other processes of life are of such importance that further study is necessary in order to exploit or control them.

Key words: Biofilms, Human environment, *Legionella* spp, Water supply system

Βιβλιογραφία

1. POTERA C. Forging a link between biofilm and disease. *Science* 1999, 283:1837–1839
2. DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilm: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:167–193
3. WILSON M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 2001, 84:235–254
4. EIF C, PETERS G, HEILMAN C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002, 2:677–685
5. O'GARA JP, HUMPHREYS H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Importance and implications. *J Med Microbiol* 2001, 50:582–587
6. DONLAN RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:881–890
7. VARNAM HA, EVANS GM. *The nature of microbial communities*. ASM Press, Washington, DC, 2000:8–17
8. ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΣΕ, ΚΟΛΟΝΙΤΣΙΟΥ Φ, ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΓΟ, ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΕΔ. Μικροβιακές βιομεμβράνες; Biofilms. *Δελτ Ελλ Μικροβ Ετ* 2003, 48:328–339
9. CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL, BEACHEY EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982, 37:318–326
10. KUMAMOTO CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002, 5:608–611
11. SUTHERLAND IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2001, 9:222–227
12. DUNNE WM Jr. Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:155–166
13. ANONYMOUS. An introduction to biofilms. Edstrom Industries. <http://www.edstrom.com> (5.4.2004)
14. MITTELMAN MW. Biological fouling of purified-water systems. Part 1: Bacterial growth and replication. *Microcontamination* 1985, 3:51–55, 70
15. MARSH PD. Dental plaque. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW (eds) *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995:282–300
16. MAYETTE DC. *The existence and significance of biofilm in water*. Water Review, Water Quality Research Council, Lisle Il, 1992:1–3
17. BORENSTEIN SB. *Microbiologically influenced corrosion*. Handbook, Industrial Press Inc, New York, 1994
18. COGHLAN A. Slime city. *New Scientist* 1996, 15:32–36
19. MITTELMAN MW. Biological fouling of purified-water systems. Part 3: Treatment. *Microcontamination* 1986, 4:30–40, 70
20. VAN HAECKE E, REMON JP, MOORS M, RAES F, DERUDDER D, VAN PEDEGHEM A. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56:788–795
21. PRIGENT-COMPARET C, VIDAL O, DOREL C, LEJEUNE P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999, 181:5993–6002
22. EHLERS LJ, BOUWER EJ. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci Technol* 1999, 7:163–171

23. HAUSNER M, WUERTZ S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:3710–3713
24. ROBERTS AP, PRATTEN J, WILSON M, MULLANY P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 177:636
25. GHIGO JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001, 412:442–445
26. SCHACHTER B. Slimy business—the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology* 2003, 21:361–365
27. BASSLER BL. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum-sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999, 2:582–587
28. SHIRTLIFF ME, MADER JT, CAMPER AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* 2002, 9:859–871
29. VAN DELDEN C, IGLEWSKI BH. Cell-to-cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998, 4:551–560
30. VUONG C, OTTO M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002:481–489
31. KLELLEBERG S, MOLIN S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* 2002, 5:254–258
32. CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, VAN DORSSELAER A, PELCZER I, BASSLER BL ET AL. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002, 415:545–549
33. ANONYMOUS. Biofilm and quorum sensing: The gang's all here. <http://www.erc.montana.edu> (Oct. 2004)
34. COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49:711–745
35. MAH TC, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001, 9:34–39
36. STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, 358:135–138
37. KHARAZMI A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Lett* 1991, 30:201–205
38. COSTERTON JW, STEWART PS, GREEN-BERG EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284:1318–1322
39. ANDERSON RL, HOLLAND BW, CARR JK, BOND WW, FAVERO MS. Effect of disinfectants on *Pseudomonas* colonized on the interior surface of PVC pipes. *AJPH* 1990, 80:17–21
40. LECHEVALLIER MW, CAWTHON CD, LEE RG. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54:2492–2499
41. SIBILLE I, SIME-NGANDO T, MATHIEU L, BLOCK JC. Protozoan bacterivory and *E. coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64:197–202
42. MURGA R, FORSTER TS, BROWN E, PRUCKLER JM, FIELDS BS, DONLAN RM. The role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 2001, 147:3121–3126
43. KWAIT ABU Y, GAO LY, STONE BJ, VENKATARAMAN C, HARB OS. Invasion of protozoa by *L. pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64:3127–3133
44. TYNDALL RL, DOMINGUE EL. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 1982, 44:954–959
45. KWAIT ABU YA. Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 1998, 30:689–695
46. KWAIT ABU Y, GAO LY, HARB OS, STONE BJ. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol* 1997, 24:629–642
47. KILINGTON S, PRICE J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 1990, 68:519–525
48. STEINERT M, OCKERT G, LUCK C, HACKER J. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralblatt Bacteriologie* 1998, 288:331–342
49. ROGERS J, DOWSETT AB, DENNIS PJ, LEE JV, KEEVIL CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60:1585–1592
50. JAMES BW, MAUCLINE WS, FITZGEORGE RB, DENNIS PJ, KEEVIL CW. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1995, 63:4224–4230
51. BORELLA P, MONTAGNA MT, ROMANO-SPICA V, STAMPI S, STANCANELLI G, TRIASSI M ET AL. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 2004, 10:457–464
52. STATES SJ, CONLEY LF, CERASO M, STEPHENSON TE, WOLFORD RS, WADOWSKY RM ET AL. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Appl Environ Microbiol* 1985, 50:1149–1154
53. OLIVER JD. The viable but non culturable state and cellular resuscitation. 8th International Symposium on Microbial Ecology, 1999
54. MICHEL R, MULLER KD, AMANN R, SCHMID EN. *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp isolated from drinking water. *Parasitol Res* 1998, 84:84–88
55. BRIELAND JK, FANTONE JC, REMICK DG, LeGENDRE M, McCLAIN M, ENGLEBERG NC. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* 1997, 65:5330–5333
56. ANONYMOUS. The association of protozoa and *Legionella*. Biotech Laboratories Pty Ltd, Australia, 2002, www.biotechlab.com
57. ALIM A, HAKGUDENER Y, POYRAZ O. *Legionella pneumophila* in thermal pools of hot springs in the central Anatolian district. *Mikrobiyol Bul* 2002, 36:237–246
58. LEONI E, LEGNANI PP, SABATTINI BUCCI MA, RIGHI F. Prevalence of *Legionella* spp in swimming pool environment. *Wat Res* 2001, 35:3749–3753

59. ΠΑΝΟΥΡΓΙΑΣ Ε, ΒΕΛΟΝΑΚΗΣ Ε, ΒΑΤΟΠΟΥΛΟΣ Α. Ανίχνευση *Legionella* spp σε κολυμβητικές δεξαμενές και εγκαταστάσεις κολυμβητηρίων νομού Αττικής και εκτίμηση της υγειονομικής τους κατάστασης. 31ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2005
60. HOWE AD, FRESTER S, MORTON S, MARSHALL R, OSBORN KS, WRIGHT P ET AL. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerg Infect Dis* 2002, www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no6/01-0271.htm
61. CHARACKLIS WG, MARSHALL KC. *Biofilms*. John Wiley & Sons Inc, New York, 1990
62. COLLENTRO WC. Microbial control in purified water systems-case histories. *Ultrapure Water* 1995, 12:30–38
63. ANONYMOUS. Building houses of slime. The center for bio-film engineering. <http://www.erc.montana.edu> (16.11.2004)
64. GEESEY GG, LEWANDOWSKI Z, FLEMMING HC. *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publ, Ann Arbor, 1994
65. WOTTON RS, PRESTON TM, RICHARDS H. Surface biofilm: A neglected substratum. NABS annual meeting in Lentic Ecology, 2002
66. ANONYMOUS. Pellicle formation in a hay infusion. [http://www.personal.psu.edu/faculty/jsej15/biofilms/pellicle.html\(16/2/2005\)](http://www.personal.psu.edu/faculty/jsej15/biofilms/pellicle.html(16/2/2005))
67. HENK MC. Method for collecting air-water interface microbes suitable for subsequent microscopy and molecular analysis in both research and teaching laboratories. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:2486–2493
68. ANONYMOUS. Bacteria on the water surface. <http://www.icbm.de/pmbio/mikrobiologischer-garten/eng/ennevoi.htm> (28.2.2005)
69. COGHLAN A. Slime city. *New Scientist* 1996, 15:32–36

Corresponding author:

E. Velonakis, Department of Microbiology, National School of Public Health, 196 Alexandras Ave., GR-115 21 Athens, Greece
e-mail: mvelonak@nsph.gr

.....