

Łukasz Ławniczak<sup>1</sup>, Katarzyna Czaczyk<sup>2</sup>, Mikołaj Owsianiak<sup>1, 3</sup>,  
Łukasz Chrzanowski<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zakład Chemii Organicznej,  
pl. M. Skłodowskiej-Curie 2, 60-965 Poznań

<sup>2</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,  
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

<sup>3</sup> obecny adres: Section for Quantitative Sustainability Assessment, Department of Management Engineering,  
Technical University of Denmark, Produktionstorvet, Building 424, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark

Wpłynęło w listopadzie 2010 r.

1. Wstęp. 2. Rys historyczny – od pierwszej izolacji do chwili obecnej. 3. Czynniki wpływające na produkcję ramnolipidów. 4. Ramnolipidy a biodegradacja substratów węglowodorowych. 5. Ramnolipidy a mobilność komórek bakteryjnych. 6. Rola ramnolipidów w tworzeniu biofilmu. 7. Genetyczne dowody na różnorodność roli ramnolipidów. 8. Podsumowanie

### Role of rhamnolipids in the natural environment

*Abstract:* Rhamnolipids are glycolipidic surfactants of bacterial origin. In the past 20 years rhamnolipids were often associated with the mediation of uptake of hydrophobic substrates by bacterial cells. Recent research has provided evidence that rhamnolipids primarily play a role in surface-associated modes of bacterial mobility and are involved in biofilm development. This review gives an insight into the current state of knowledge on these roles of the rhamnolipid biosurfactants.

1. Introduction. 2. Historical view – from the first isolation until present. 3. Factors affecting rhamnolipid production. 4. Role of rhamnolipids in the biodegradation of hydrocarbons. 5. Role of rhamnolipids in bacterial mobility. 6. Role of rhamnolipids in biofilm development. 7. Genetic evidence for multiple roles of rhamnolipids. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** biofilm, biosurfaktant, ramnolipidy

**Key words:** biofilm, biosurfactant, rhamnolipids

„Wiedza jest nieodwracalna, nie może cofnąć się w mrok słodkiej ignorancji”  
– Stanisław Lem „Głos Pana”

## 1. Wstęp

Biosurfaktanty, czyli związki powierzchniowo-czynne pochodzenia mikrobiologicznego, to temat, który przyciągnął uwagę ogromnej liczby badaczy na całym świecie. Wśród szeregu prac naukowych poświęconych tej tematyce wyróżnić można te koncentrujące się na produkcji oraz izolacji nowych biosurfaktantów [92, 111], podejmujące opis budowy chemicznej danego związku wraz z rozbudowaną częścią analityczną [5, 91, 124] oraz te dotyczące analizy otrzymanych biosurfaktantów pod względem ich właściwości fizyko-chemicznych, szczególnie właściwości powierzchniowo-czynnych [84]. Innym analizowanym aspektem było porównanie klasycznych surfaktantów syntetycznych i biosurfaktantów [85, 86]. Okazało się, że surfaktanty pochodzenia biologicznego wykazują szereg zalet, takich jak: małe obciążenie środowiska naturalnego, wysoka biodegradowalność, stosunkowo

niskie koszty wytwarzania przy masowej produkcji, możliwość produkowania biosurfaktantów *in situ*, niskie wartości krytycznego stężenia micelnego (CMC) oraz wysoka skuteczność solubilizacji. Wiele prac dotyczyło możliwości praktycznego zastosowania biosurfaktantów w dziedzinach takich jak: farmacja, ochrona roślin, medycyna, przemysł kosmetyczny i spożywczy [32, 43, 88]. Szczególnie dużo uwagi poświęcono wykorzystaniu biosurfaktantów w technikach remediacyjnych, związanych z usuwaniem skażeń ropopochodnych ze środowiska naturalnego [45, 103]. W założeniu biosurfaktanty miały stanowić pomost łączący żyjące w środowisku hydrofilowym mikroorganizmy z nierozpuszczalnymi w wodzie, hydrofobowymi węglowodorami. Spodziewano się, że wydzielanie biosurfaktantów przez mikroorganizmy związane jest przede wszystkim z naturalnie wykształconym mechanizmem pozyskiwania substratów. Zwiększenie rozpuszczalności ropopochodnych zwiększać miało ich biodostępność, co w konsekwencji przyczyniłoby się do intensywniejszego przebiegu procesów biodegradacyjnych [95]. Alternatywnie modyfikacja właściwości powierzchniowych samych mikroorganizmów

\* Autor korespondencyjny: Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zakład Chemii Organicznej, pl. M. Skłodowskiej-Curie 2, 60-965 Poznań; tel.: +48-61-665-37-16; fax.: +48-61-665-36-49; lukasz.chrzanowski@put.poznan.pl

przez biosurfaktanty miała być odpowiedzialna za zwiększenie kontaktu komórek ze źródłem węgla [71, 148]. Obiecujących rezultatów oczekiwano zwłaszcza w odniesieniu do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), stanowiących niebezpieczne i trudne do usunięcia skażenie środowiska [89]. Faktycznie, część badaczy zaobserwowała w przeprowadzonych eksperymentach zwiększenie skuteczności usuwania zanieczyszczeń po dodaniu biosurfaktantów [149]. Jednakże równie często obserwowano brak wpływu lub negatywny efekt dodatku biosurfaktantów [42, 67]. Obecnie, po ponad dwudziestu latach badań, sposób postrzegania roli biosurfaktantów w funkcjonowaniu mikroorganizmów zmienia się diametralnie [15, 138]. Na przykładzie ramnolipidów, najlepiej poznanego biosurfaktantu, postaramy się zbliżyć do najbardziej aktualnej odpowiedzi na pytanie: po co mikroorganizmy produkują biosurfaktanty?

## 2. Rys historyczny – od pierwszej izolacji do chwili obecnej

Ramnolipidy są glikolipidami, w skład których wchodzi cukier ramnoza i kwas  $\beta$ -hydroksydekanowy. Produkowane są głównie przez bakterie Gram-ujemne z rodzaju *Pseudomonas*, występujące powszechnie w środowisku wodnym i glebowym. W 1946 roku pojawia się pierwsze doniesienie literaturowe o ramnolipidach produkowanych przez bakterie *Pseudomonas pyocyanea* [9], jednocześnie opisane zostaje pierwsze ich praktyczne zastosowanie. Pełniejszy opis budowy wyizolowanych ramnolipidów pojawia się nieco później w pracy Jarvisa i Johnsona [72]. W następnych latach zwrócono uwagę na wysoce efektywną produkcję ramnolipidów przez bakterie z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* [57]. Zainteresowanie tą tematyką rozwija się w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych. Scharakteryzowano strukturę chemiczną pierwszych ramnolipidów, identyfikując je jako typ R2, charakteryzujący się dwiema cząsteczkami ramnozy [39]. Prowadzono także intensywne badania nad optymalnymi warunkami do produkcji i wydzielania tych biosurfaktantów przez różne szczepy [119]. W 1971 r. wyizolowany zostaje zupełnie nowy ramnolipid – zbudowany z jednej cząsteczki ramnozy (typ R1). W ciągu kolejnych lat pojawia się coraz więcej homologów, nieznacznie różniących się strukturą. Opisano również pochodne obu wymienionych wcześniej glikolipidów, które posiadały dodatkową resztę kwasu  $\alpha$ -dekanowego, nazwane jako ramnolipidy typu A i B [146]. W późniejszych eksperymentach udało się wyizolować metylowe pochodne ramnolipidów R1 i R2 [63], oraz warianty pozbawione jednej cząsteczki kwasu  $\beta$ -hydroksydekanowego, opisane jako typy R3 i R4

[131]. Gwałtowny rozwój technik analitycznych na przestrzeni ostatniej dekady zaowocował odkryciem wielu zupełnie nowych struktur, których liczba wynosi obecnie ponad 60 [1].

## 3. Czynniki wpływające na produkcję ramnolipidów

W latach 80 i 90 ubiegłego wieku poszukiwano skutecznych metod produkcji dużych ilości biosurfaktantów. Opisano wtedy szereg czynników mających istotny wpływ na efektywność wytwarzania ramnolipidów. Zauważono, że są one najwydajniej produkowane przy ograniczeniu źródeł azotu [32, 53, 97]. W fazie stacjonarnej, kiedy azot jest wyczerpywany, dochodzi do akumulacji ramnolipidów w medium hodowlanym [90]. Inne badania donoszą, że do nadprodukcji ramnolipidów dochodzi również w przypadku ograniczonej dostępności makroelementów np. fosforu [98] lub mikroelementów.

Z wcześniejszych badań wynikało, że rodzaj substratu jest również ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność produkcji i rodzaj otrzymany ramnolipidów. Późniejsze badania nie potwierdziły różnicy w strukturze biosurfaktantu otrzymanego podczas hodowli na hydrofilowych i hydrofobowych substratach [111]. Wielu naukowców otrzymało ramnolipidy podczas hodowli na hydrofobowych substratach (oleje i tłuszcze) [24, 91]. Wielu innych uzyskało podobne rezultaty stosując hydrofilowe źródła węgla np. cukry [52] lub glicerol, co dało o wiele lepsze rezultaty niż hodowla na hydrofobowych substratach [5]. Doniesiono także, że możliwa jest efektywna synteza z innych, hydrofilowych źródeł węgla takich jak etanol [92]. Obecnie znanych jest wiele prac opisujących efektywne metody produkcji ramnolipidów z różnych, często odpadowych substratów przy użyciu innowacyjnych rozwiązań technologicznych [88, 115].

## 4. Ramnolipidy a biodegradacja substratów węglowodorowych

Produkcja biosurfaktantów przez mikroorganizmy podczas wzrostu na hydrofobowych źródłach węgla zwróciła szczególną uwagę badaczy, gdyż dostrzeżono w tym aspekt interesujący z punktu widzenia technik bioremediacyjnych. Biodostępność zanieczyszczeń w środowisku naturalnym jest jednym z kluczowych czynników ograniczających postęp procesów biodegradacyjnych [139]. Zatem w przypadku szczepów zdolnych do biodegradacji związków ropopochodnych zdolność do produkcji biosurfaktantów jest prawdopodobnie integralną cechą tych mikroorganizmów. Wydzielanie ramnolipidów prowadzić miało do solu-

bilizacji hydrofobowych związków, co jednoznacznie skojarzono ze stymulowaniem procesów biodegradacyjnych [64]. Stąd też brak genów odpowiedzialnych za syntezę ramnolipidów niektórzy badacze powiązali bezpośrednio z niezdolnością do wzrostu na hydrofobowych źródłach węgla, takich jak np. n-alkany [78, 106]. Podczas wielu testów biodegradacyjnych starano się zwiększyć biodostępność substratu poprzez dodawanie biosurfaktantów. Wykazano, że dodatek ramnolipidów w ilości 300 mg/l stymulował biodegradację oktadekanu [147]. Ci sami badacze [148] przeprowadzili badania, w których dodatek ramnolipidów w małych ilościach stymulował biodegradację heksadekanu dla części szczepów, jednak u innych spowodował inhibicję procesów degradacyjnych oktadekanu. Zaobserwowano wtedy również, że dodatek ramnolipidów przyczyniał się do znacznego wzrostu efektywności procesów degradacyjnych dla szczepów niezdolnych do produkcji własnego biosurfaktantu. Wiele prac wskazywało zarówno na pozytywne jak i negatywne skutki dodatku biosurfaktantów na degradację hydrofobowych substratów przez szczepy środowiskowe [108]. W związku z licznymi sprzecznościami w doniesieniach literaturowych badacze zaczęli wnikliwie przyglądać się nie tylko interakcjom pomiędzy ramnolipidami i zanieczyszczeniami, gdyż równie istotnym zaczął się wydawać wpływ biosurfaktantów na mikroorganizmy.

Zauważono wyraźny wpływ dodawanego biosurfaktantu na zmiany w hydrofobowości komórek bakteryjnych badanych szczepów [147, 148]. Zaprzestano doszukiwania się prostych zależności pomiędzy degradującymi mikroorganizmami, ramnolipidami i hydrofobowymi substratami a zaczęto traktować je jako zależności wielopłaszczyznowe. Kolejne lata to okres badań nad wpływem ramnolipidów na właściwości powierzchniowe poszczególnych szczepów bakteryjnych powiązane z efektywnością procesów biodegradacyjnych. W poszukiwaniu odpowiedzi na kolejne pytania prowadzono liczne próby analizy skomplikowanych zależności pomiędzy biosurfaktantami, mikroorganizmami i ksenobiotykami, aby znaleźć optymalne warunki do prowadzenia procesów biodegradacyjnych [100].

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów i analizy kinetyki procesów biodegradacyjnych określono różne mechanizmy poboru substratów przez mikroorganizmy: bezpośredni kontakt komórki z hydrofobowym źródłem węgla lub pobór węglowodorów, które przeszły do fazy wodnej pod wpływem surfaktantów [14, 66, 125].

Zdolność do produkcji biosurfaktantów i zmiany napięcia powierzchniowego powiązano z mechanizmem ułatwionego transportu hydrofobowych substratów do roztworu wodnego. Solubilizacja związków z fazy olejowej i transportowanie ich do wnętrza roztworu wod-

nego prowadziłyby do znacznej redukcji czynnika dyfuzyjnego jako parametru ograniczającego przebieg procesów biodegradacyjnych [89].

Z kolei właściwości powierzchniowe szczepów, w szczególności zmiany hydrofobowości powiązano z mechanizmem bezpośredniego poboru substratu z fazy olejowej [22]. Zmiany te, będące np. wynikiem adsorpcji ramnolipidów czy innych surfaktantów na powierzchni komórki, stanowiły alternatywną metodę pokonania czynników limitujących wynikających z transportu [20, 21].

Zwiększenie biodegradacji mogło zatem wynikać ze zwiększonej solubilizacji hydrofobowego źródła węgla lub też z powodu modyfikacji zewnętrznych struktur komórkowych, co z kolei mogło przyczyniać się do łatwiejszego kontaktu między węglowodorowym substratem a komórkami [66, 77, 147]. Przeprowadzone badania nie doprowadziły jednak do uzyskania jednoznacznych rezultatów.

Późniejsze prace sugerują, że obserwowany wzrost efektywności procesów biodegradacyjnych mógł być efektem jednoczesnego występowania obydwu zjawisk. Wiele eksperymentów potwierdza, że zarówno mechanizm bezpośredniego poboru substratu z fazy olejowej, jak i wspomagana biosurfaktantami solubilizacja hydrofobowych substratów w roztworze wodnym występują podczas biodegradacji WWA [12, 33]. Przeprowadzono eksperymenty, w których ponad sześćdziesiąt szczepów bakteryjnych wyizolowanych z gleby o różnym stopniu zanieczyszczenia ropopochodnymi zostało przebadanych pod względem preferowanego mechanizmu poboru substratów [13]. Uzyskano wyniki sugerujące, że żaden z mechanizmów nie dominuje jednoznacznie nad drugim. Dla połowy badanych szczepów stwierdzono występowanie wyłącznie bezpośredniego poboru substratu z fazy olejowej, podczas gdy pozostała połowa wykazywała mechanizm opierający się o transport ułatwiony występowaniem biosurfaktantu. Co ciekawe, autorzy zaobserwowali dla części badanych szczepów brak powiązania pomiędzy hydrofobowością komórek bakteryjnych, efektywnością produkcji biosurfaktantów, a rodzajem źródła węgla. Bardzo zbliżone rezultaty uzyskano po hodowli na hydrofobowym heksadekanie i hydrofilowym glicerolu. Wynioskowano, że warunki środowiskowe panujące w miejscu wzrostu mikroorganizmów kształtują określone mechanizmy poboru substratu. Rozwinięcie powierzchni ciekłej fazy węglowodorowej w danym środowisku będzie najprawdopodobniej owocowało pojawieniem się szczepów o bezpośrednim sposobie poboru substratu z fazy olejowej. Wykazano, że transfer masy jest największy gdy mikroorganizmy rosną w bezpośrednim otoczeniu kropli węglowodorów [75]. Natomiast dla środowiska bogatego w wodę, gdzie dominować będą szczepy o hydrofilowych właściwościach

powierzchniowych, przeważać będzie mechanizm oparty o biosurfaktanty, przy czym w takich układach proces emulgowania zanieczyszczeń dominuje nad procesem solubilizacji. Pewną ciekawostką są bakterie pobierające olej w postaci mikrokropli [127]. Autorzy zwracają uwagę na fakt, że biosurfaktanty produkowane są zarówno przez hydrofilowe, jak i hydrofobowe szczepy, niezależnie od rodzaju źródła węgla, co może sugerować, że ich rola wykracza dalece poza początkowo przyjęte ramy. Pojawia się też wiele doniesień literaturowych sugerujących, że często biodegradacja przebiega bez udziału biosurfaktantów. Przykładowo, w 2004 r. zaobserwowano, że produkcja biosurfaktantów jest zupełnie nie związana z efektywnością procesu biodegradacji hydrofobowych substratów takich jak WWA [74]. Stąd też próby znalezienia korelacji pomiędzy hydrofobowością, a efektywnością procesów biodegradacyjnych powiodły się jedynie w nielicznych badaniach [17, 104, 105]. Na tym etapie pojawiły się badania środowiskowe o zupełnie innym wymiarze. Zauważono, że chociaż pojedyncze szczepy stanowią bardzo wygodny materiał do modelowych badań, to próby przeniesienia prawidłowości zaobserwowanych w warunkach laboratoryjnych do układów rzeczywistych kończyły się w większości przypadków niepowodzeniem, zwłaszcza dla środowiska glebowego [114].

Należy podkreślić, że żaden mikroorganizm nie jest samotną wyspą, a procesy degradacyjne przebiegające w środowisku naturalnym przebiegają z udziałem wyspecjalizowanych zespołów mikroorganizmów, zwanych konsorcjami, lub przynajmniej przez kultury mieszane. Obecnie niewiele jest prac opisujących wpływ ramnolipidów lub szczepów zdolnych do ich produkcji na konsorcja środowiskowe. Jednakże wykazano, że dodatek mikroorganizmów zdolnych do produkcji ramnolipidów praktycznie nie wpływa na biodegradację związków ropopochodnych przeprowadzoną w środowisku glebowym [71]. Przyczyną były najprawdopodobniej trudności w przystosowaniu się drobnoustrojów do nowego środowiska.

Badania nad wpływem ramnolipidów na efektywność biodegradacji oleju napędowego przez 218 konsorcjów środowiskowych wykazały, że dodatek biosurfaktantu w równym stopniu zwiększał, zmniejszał lub pozostawał bez wpływu na przebieg procesów degradacyjnych [109]. Zaobserwowano również całkowity brak korelacji pomiędzy hydrofobowością komórek w konsorcjach, a ubytkiem oleju napędowego. Podobne obserwacje poczyniono w innych badaniach [18, 19]. Prowadzi to do wniosku, że w większości przypadków dodatek ramnolipidów nie jest istotnym czynnikiem z punktu widzenia efektywności procesów biodegradacyjnych.

Powrócono zatem do alternatywnych koncepcji z poprzednich lat [99]. Stwierdzono, że biosurfaktanty

te mogą uczestniczyć w wielu innych procesach [23], a wspomaganie mechanizmu pobierania substratu jest prawdopodobnie tylko jednym z obserwowanych zjawisk oraz innych mechanizmów adaptacyjnych [38]. Kolejne lata badań to etap analizy funkcji ramnolipidów z perspektywy kolonizowania otoczenia, tworzenia i rozpadu biofilmów bakteryjnych oraz specyficznej aktywności wobec innych organizmów.

## 5. Ramnolipidy a mobilność komórek bakteryjnych

W przypadku wyczerpywania składników pokarmowych w środowisku możliwe są dwa scenariusze: mikroorganizmy wykształcają nowe mechanizmy pozyskiwania substratów dotąd dla nich niedostępnych lub opuszczają środowisko w poszukiwaniu lepszych warunków. Początkowo uważano, że ramnolipidy są wykorzystywane głównie do zwiększenia biodostępności potencjalnych źródeł węgla [5], jednak wydzielenie wielkocząsteczkowych produktów wyłącznie w celu pobrania niskocząsteczkowych substratów wydaje się nieuzasadnione z punktu widzenia bilansu energetycznego komórki. Średnia masa cząsteczkowa ramnolipidów wynosi 650 g/mol, a przykładowo masa cząsteczkowa heksadekanu to 226 g/mol. Mało prawdopodobnym jest by raz wydzielone cząsteczki ramnolipidów ponownie powróciły do komórki wraz z heksadekanem. Mogą się one przyczyniać do wymywania potencjalnego substratu z najbliższego otoczenia komórek, lub też, zgodnie z założeniami drugiego scenariusza, do przemieszczenia samych mikroorganizmów. W świetle najnowszych odkryć to właśnie mobilność komórek ma najwyższy priorytet [134, 138].

Na przykładzie *P. aeruginosa* wielu badaczy wykazało, że komórki bakteryjne są zdolne do trzech różnych rodzajów ruchu: pływania za sprawą rzęsek, ruchu drgającego (twitching) opartego na pili typu IV oraz wzrostu rozpełzliwego (swarming) [35, 79].

*P. aeruginosa* posiada pojedynczą, polarną wicę, która pozwala komórkom pływać w środowisku wodnym. Wicę wraz z układem chemoreceptorów i systemem przekazywania bodźców jest wykorzystywana przez bakterie w procesach reagowania na sygnały z otoczenia [132].

W przypadku poruszania się po powierzchni możliwe jest ruch typu drgającego przy pomocy pili typu IV [29, 141]. Uważa się, że u podstaw tego zjawiska leży tendencja do rozciągania i kurczenia się pili, co wprawia komórki w ruch. Synteza i formowanie pili wymaga wielu genów, a warunki środowiskowe potrzebne do ich uaktywnienia nie zostały do końca poznane [65]. Są one istotnym elementem budowy komórki, biorącym udział w infekcyjnych atakach drobnoustrojów i przy czepianiu się do powierzchni abiotycznych [55, 101].

Zdecydowanie najbardziej skomplikowanym wydaje się jednak ruch typu rozpełzliwego. Jest to forma zorganizowanego przemieszczania po powierzchni, powiązana z wydłużaniem komórek, obecnością odpowiedniej liczby rzęsek oraz kontaktem międzykomórkowym [46]. Zjawisko to, charakterystyczne dla układów wielokomórkowych, obejmuje procesy łączenia się w grupy i odłączania się komórek np. podczas kolonizowania nowego środowiska. Według niektórych badaczy działania tego typu występują także podczas tworzenia biofilmów bakteryjnych oraz infekcji spowodowanych przez drobnoustroje patogenne [123]. Komórki zdolne do tego typu ruchów są zwykle wydłużone i posiadają więcej rzęsek. Zaproponowano, że wykazujące ruch typu rozpełzliwego komórki *P. aeruginosa* wymagały również udziału pili typu IV oraz obecności ramnolipidów [79]. Autorzy stwierdzili również, że inicjowanie ruchu typu rozpełzliwego jest związane z dostępnością azotu w środowisku. Pierwiastek ten nie tylko wpływa na produkcję ramnolipidów, lecz może być również istotnym czynnikiem podczas syntezy pili [50, 70]. W środowisku bogatym w azot ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę pili została ograniczona, co z kolei wiązałoby się z hamowaniem ruchu typu rozpełzliwego. System przekazywania bodźców między komórkami odgrywałby ważną rolę w wykrywaniu czynników ograniczających i propagowaniu odpowiednich reakcji – np. indukowaniu produkcji ramnolipidów pozwalających mikroorganizmom na migrację do nowych, bogatych w składniki odżywcze nisz.

Niezbitych dowodów na związek pomiędzy ruchem typu rozpełzliwego a obecnością ramnolipidów dostarczyły prace C a i a z z a i wsp. [15] oraz przełomowe odkrycia zaprezentowane przez T r e m b l a y i wsp. [134]. Pierwszy z zespołów zasugerował, że ramnolipidy są odpowiedzialne za inhibicję ruchu komórkowego, podczas gdy związki prekursorowe do ich syntezy – kwasy 3-hydroksyalkanoilo-3-hydroksyalkanowe (HAA), pełnią rolę związków zwilżających. Eksperymenty przeprowadzone przez Tremblay i wsp. [134] będące rozwinięciem tego tematu, prowadziły do zupełnie odmiennych wniosków, wynikających głównie z czystości stosowanych preparatów. Po izolacji i dokładnym oczyszczeniu badano wpływ każdego z poszczególnych składników, podczas gdy pierwszy z zespołów stosował ekstrakt będący mieszaniną wszystkich związków. Pozwoliło to na otrzymanie bardzo ciekawych wyników, opierających się o zjawisko chemotaksji związanej z dwoma konkurencyjnymi efektami wywoływanymi przez diramnolipid i HAA. Według autorów diramnolipid jest postrzegany jako atraktant przez komórki wykazujące ruch typu rozpełzliwego, podczas gdy HAA występują w roli silnego sygnału odpychającego. Związki te są również zwią-

zane z formowaniem rzęsek komórkowych – diramnolipidy służą jako substancje promujące powstawanie rzęsek, natomiast HAA jest inhibitorem tego procesu. Ułatwianie transportu poprzez obniżenie napięcia powierzchniowego jest według autorów zadaniem monoramnolipidów, które nie wykazują wpływu na ruch typu rozpełzliwego. Opierając się na przeprowadzonych eksperymentach z zakresu kinetyki dyfuzji autorzy opracowali model działania systemu promowania/hamowania ruchu komórkowego. Według tej koncepcji diramnolipidy rozprzestrzeniają się szybciej, przyciągając do siebie komórki. Autorzy zauważyli jednocześnie, że HAA są dla komórek o wiele silniejszym sygnałem, stąd ich obecność, nawet w niewielkich stężeniach, mogła spowodować, że ekstrakt ramnolipidów użyty w eksperymentach wykonanych przez C a i a z z a i wsp. [15] wykazywał właściwości zatrzymujące ruch typu rozpełzliwego. Kolejnym bardzo istotnym odkryciem był fakt, że system oparty na diramnolipidach/HAA nie działa zupełnie na komórki pływające, co prowadzi do wniosku, że tryb poruszania się jest związany nie tylko z morfologią komórki, lecz również z różnymi mechanizmami regulacji na poziomie ekspresji genów.

## 6. Rola ramnolipidów w tworzeniu biofilmu

Wiele mikroorganizmów jest zdolnych do egzystowania w dwóch diametralnie różnych trybach: planktonowym oraz w postaci wielokomórkowych społeczności, przyczepiających się do różnych powierzchni w formie biofilmu. Wzrost w biofilmie niesie ze sobą wiele potencjalnych korzyści. Z przeprowadzonych badań wynika, że komórki w biofilmie wykazywały się wyższą odpornością na antybiotyki [25, 128] oraz zwiększoną produkcją substancji ochronnych [47]. Wielu badaczy sugeruje, że biofilm sprzyja także kooperacji metabolicznej między komórkami [122] oraz intensyfikuje procesy komunikacji międzykomórkowej i horyzontalnej wymiany genów [58, 112] co prowadzi do zwiększenia genetycznej różnorodności i w konsekwencji zwiększa szanse mikroorganizmów na przetrwanie.

Fakt, że mikroorganizmy preferują życie w biofilmach osadzonych na granicy faz zamiast zmagania się ze środowiskiem w pojedynkę jest znany już od lat [93]. W środowisku naturalnym żaden ze znanych człowiekowi drobnoustrojów nie wykazuje zdolności do planktonowej formy życia, a nawet jeśli, to jest to jedynie etap pośredni pomiędzy odrywaniem się komórek od warstwy dojrzałego biofilmu, a zasiedlaniem nowych nisz ekologicznych [25]. Jednak stosunkowo niedawno zaczęto odkrywać skomplikowane zależności i mechanizmy regulujące tworzenie się oraz

funkcjonowanie tych wielokomórkowych tworów [101, 112]. Na podstawie przeprowadzonych badań i wnikliwych obserwacji stworzono generalną koncepcję opisującą poszczególne etapy formowania biofilmów bakteryjnych [120]. Pewne warunki środowiskowe przyczyniają się do przyczepienia się komórek do powierzchni ciał stałych lub cieczy, co prowadzi do wytworzenia monowarstwy pokrywającej dany obszar [27]. Z biegiem czasu monowarstwa rozrasta się w dojrzały biofilm w wyniku podziałów komórkowych i agregacji. Początkowo tworzą się mikrokolonie, które następnie przechodzą w makrokolonie, bezpiecznie porastające sieć stworzoną z wydzielanych pozakomórkowo egzopolisacharydów i innych polimerów. Choć pierwsze stadium tworzenia biofilmów i kluczowe dla tego etapu czynniki zostały już opisane [26, 41, 48], to szczegóły formowania się grzybkowatych struktur i tuneli transportowych w dojrzałym biofilmie nadal pozostają zagadką z punktu widzenia mechaniki molekularnej. Czy pojawienie się tych struktur w dojrzałym biofilmie jest uwarunkowane pewnymi czynnikami, czy też może jest to jedynie dzieło przypadku? Zdania naukowców na ten temat są podzielone. Część badaczy sugeruje, że pojawienie się tych struktur w dojrzałym biofilmie jest konsekwencją odpowiednich warunków, co można przewidzieć w oparciu o modele matematyczne. Natomiast inni badacze postulują, że wykształcenie i utrzymanie takiego układu jest kluczowe z punktu widzenia regulacji przepływu składników pokarmowych, tlenu i produktów odpadowych [102]. Do podobnych wniosków prowadziły eksperymenty nad strukturami biofilmów powstałych przy udziale mutantów niezdolnych do produkcji pewnych egzopolisacharydów [28] oraz badania nad ekspresją genów odpowiedzialnych z biosyntezę alginianów [59]. Opisano również wspólne wysiłki społeczności mikroorganizmów komunikujących się na drodze *quorum-sensing* [112]. Zwrócono również uwagę na to, że wśród mutantów niezdolnych do komunikacji międzykomórkowej nie zaobserwowano występowania biofilmów o skomplikowanych strukturach. Wykształcenie dojrzałego biofilmu nie jest zatem zjawiskiem losowym, lecz celowym działaniem zależnym od czynników środowiskowych i uwarunkowań genetycznych szczepów wchodzących w jego skład.

Dowodów podtrzymujących powyższą tezę dostarczyły badania nad komórkami *P. aeruginosa*, których zdolność do skutecznego kolonizowania implantów i żywej tkanki często prowadzi do poważnych i niebezpiecznych zakażeń. W układach charakteryzujących się ciągłą cyrkulacją substancji odżywczych szczep *P. aeruginosa* tworzy biofilmy o zdefiniowanej strukturze. Komórki bakteryjne zostają zawieszane w matrycy stworzonej z pozakomórkowych wydzielin, a następnie formują kolonie tworzące filenty i wypustki do

otaczającego środowiska (tzw. grzybki), przeplatane kanałami transportowymi [30, 102].

Pojawiają się również pierwsze wzmianki literaturowe podkreślające istnienie związku pomiędzy ramnolipidami, a biofilmem bakteryjnym. Wyniki badań przeprowadzonych przez Davey i wsp. [31] sugerują, że ramnolipidy są odpowiedzialne za utrzymywanie funkcjonalności kanałów transportowych i wpływają na strukturę biofilmu. Stwierdzono także, że ramnolipidy są stosowane do wykluczenia innych szczepów ze struktury biofilmu [40]. Taka strategia pozwala społeczności bakteryjnej zachować wyłączność na daną niszę ekologiczną.

Jednak mimo wielu niewątpliwych zalet funkcjonowania drobnoustrojów w biofilmie istnieją również pewne ograniczenia i niedogodności. Sam proces tworzenia matrycy jest dla komórek istotnym obciążeniem energetycznym, a problemy w dystrybucji składników odżywczych przez kanały transportowe w obszarze biofilmu mogą potencjalnie przyczynić się do limitowania wzrostu i zmniejszenia efektywności procesów biosyntezy [56]. Prawdopodobnie najgorszym scenariuszem dla komórek tworzących biofilm jest wyczerpanie składników pokarmowych. Pojawienie się tego typu czynników ograniczających byłoby istotnym problemem dla mikroorganizmów unieruchomionych w matrycy z biopolimerów [120, 142].

Dla komórek o ograniczonej mobilności niezbędny jest mechanizm umożliwiający ucieczkę i powrót do planktonowego trybu życia. Proces ten, znany w literaturze pod terminem „odłączenia się”, był przedmiotem wielu badań podczas ostatniej dekady. W odróżnieniu od wymywania, gdzie dochodzi do fizycznego usunięcia komórek z danego układu na skutek działania dużych sił hydrodynamicznych, jest to proces świadomej separacji wywołany reakcją na niesprzyjające czynniki środowiskowe [68, 129, 133]. Możliwość swobodnego przechodzenia z jednego trybu w drugi pozwala mikroorganizmom na efektywne dostosowanie się do zmian środowiskowych. Zjawisko „odłączenia się” jest również kluczowym czynnikiem z punktu widzenia inwazji bakteryjnych w medycynie, gdzie separacja prowadzi do powstania mobilnych komórek lub ich aglomeratów, które kolonizują kolejne tkanki i narządy co w konsekwencji powoduje rozprzestrzenianie się infekcji. Opisano wiele klinicznych przypadków zainicjowanych przez komórki odłączające się od dojrzałych biofilmów [8, 44, 113].

Wielu badaczy uważa, że proces „odłączenia się” jest dość skomplikowany, ponieważ nawet w obrębie jednego szczepu zaobserwowano kilka różnych mechanizmów. Z obserwacji biofilmów szczepu *P. aeruginosa* wynika, że możliwe jest odłączenie pojedynczych komórek, aglomeratów bakteryjnych, jak i całych kolonii [130]. Bardzo interesującym zjawiskiem jest

pojawienie się wewnętrznych ubytków w dojrzałym biofilmie bakteryjnym, które następnie prowadzą do rozerwania biofilmu i uwolnienia mobilnych bakterii. Proces ten nazwano „central hollowing” [68, 120]. Każdy z mechanizmów odbywa się wieloetapowo. Badacze spekulują, że w trakcie rozpadu biofilmu dochodzi m.in. do degradacji biopolimerowej matrycy, aktywacji aparatów ruchowych i fizjologicznych zmian w obrębie komórek, mających przygotować je do warunków panujących poza biofilmem. Zarówno mechanizm, jak i czas odłączenia się od biofilmu jest najprawdopodobniej ściśle regulowany. Przy sprzyjających warunkach z większości naturalnie występujących biofilmów wydziela się stała, niewielka liczba komórek. Sporadycznie dochodzi do separacji większych aglomeratów po stosunkowo długich okresach wzrostu. Tego typu wydarzenia wykazują dużą różnorodność pod względem czasu, obszaru biofilmu, z którego zostały wydzielone i mechanizmu separacji. Część badaczy analizowała zmiany w obrębie biofilmu powstałe podczas nagłych i gwałtownych zmian środowiskowych, co pozwoliło na określenie wielu czynników inicjujących rozpad biofilmu [68, 133, 140].

Wyizolowano szczep *P. aeruginosa*, który wykazywał tendencje do spontanicznego odczepiania się komórek od biofilmu [10, 11]. Dzięki temu badania można było skoncentrować wyłącznie na mechanizmie procesu separacji. Autorzy stwierdzili, że obecność ramnolipidów jest czynnikiem jednoznacznie powiązaniem z „odłączeniem się” komórek. Wyniki eksperymentów potwierdzili nie tylko dla badanego izolatu, ale również dla biofilmów tworzonych przez dzikie szczepy. Obecność biosurfaktantów była wymagana, by utrzymać zdolność do wzmożonej spontanicznej separacji komórek i przyczyniała się do nasilenia zmian w stronę fenotypu planktonowego. Ważnych dowodów w tej sprawie dostarczyły badania nad mechanizmem wymienionego wcześniej procesu „central hollowing”.

W wyniku licznych obserwacji zaproponowano, że sygnały odpowiedzialne za zjawisko „central hollowing” są najsilniejsze we wnętrzu struktury biofilmu, czego rezultatem jest aktywacja mechanizmów separacyjnych [3]. Wytypowano również dwa zasadnicze czynniki wpływające na inicjację tego procesu: akumulację substancji służących jako sygnał do separacji (np. substancji odpadowych z biosyntezy) oraz deficyt substancji odżywczych [68]. Oba czynniki wpływają na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę ramnolipidów. Zasugerowano, że może istnieć inny mechanizm inicjowania „central hollowing” [11]. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że komórki tworzące biofilm mogą wykazywać różną wrażliwość na czynniki separacyjne, w zależności od położenia. Próby z zewnątrznie dodanymi ramnolipidami i dodecylsulfonianem sodu potwierdziły, że

centrum biofilmu jest o wiele bardziej podatne na procesy „odczepiania” niż obszary peryferyjne. Różnice te mogą wynikać z warunków głodowych, z budowy matrycy biopolimerowej, składu lokalnych związków adhezyjnych, czy też innych różnic fenotypowych w obrębie samych komórek. Istnienie populacji o zróżnicowanych właściwościach w obrębie jednego biofilmu mogłoby również tłumaczyć istnienie kanałów transportowych. Ramnolipidy wydzielane przez bakterie peryferyjne powodowałyby separację komórek z centrum, co z kolei pozwalałoby na regulowanie podaży związków w obrębie całego biofilmu. Autorzy zaznaczają jednak, że zarówno mechanizm inicjowania poprzez czynniki środowiskowe, jak i mechanizm różnorodnej podatności mogą współistnieć.

Kolejne prace jednoznacznie potwierdzają wpływ ramnolipidów na rozpad biofilmów bakteryjnych, jednak pojawiają się również bardzo ciekawe pozycje wskazujące na rolę tych biosurfaktantów także podczas wczesnych faz tworzenia wielokomórkowych struktur i ich późniejszego dojrzewania [69, 121]. Wykazano, że ramnolipidy są obecne już podczas wczesnych stadiów formowania się biofilmu, kiedy tworzą się mikrokolonie [87, 110]. Są one ponadto odpowiedzialne za opisane wcześniej zmiany w strukturze dojrzałego biofilmu, czyli za pojawienie się filamentów o kształcie grzybków.

Podsumowując: ramnolipidy są odpowiedzialne nie tylko za stymulację skoordynowanego ruchu wielokomórkowego, ale odgrywają również istotną rolę podczas kontrolowania egzystencji aglomeratów bakteryjnych w biofilmie. Podczas stacjonarnego trybu życia stanowią środek ochronny przed innymi mikroorganizmami i leukocytami, a na etapie egzystencji planktonowej wspomagają inwazje chorobotwórcze. Po analizie zaprezentowanych podczas badania „central hollowing” wyników oraz bliższej obserwacji przebiegu procesu „odłączania się” komórek nietrudno doszukać się analogii pomiędzy jednym a drugim procesem. W cytowanej wcześniej pracy Tremblay i wsp. [134] pojawia się sugestia, że ruch typu rozpełzliwego, wymagający zorganizowanej i wielokomórkowej struktury, wykazuje bardzo duże pokrewieństwo do procesów przebiegających podczas formowania i dorastania biofilmów bakteryjnych. Wskazano również, że powstawanie filarów na powierzchni dojrzałego biofilmu jest bezpośrednią konsekwencją migracji komórek bakteryjnych [110]. Jednak nie można było jednoznacznie stwierdzić jaki typ ruchu komórkowego jest odpowiedzialny za to zjawisko, gdyż ramnolipidy mogą wpływać zarówno na ruch drgający, jak i ruch typu rozpełzliwego. Autorzy potwierdzili natomiast, że w związku z szerokim wachlarzem potencjalnych możliwości musi istnieć system kontrolujący aktualną rolę ramnolipidów opierający się o ekspresję i aktywację

odpowiednich genów w danej chwili. Dokładna analiza poziomów regulacji genów odpowiedzialnych za biosyntezę ramnolipidów pozwoliła odkryć skomplikowaną sieć zależności pomiędzy opisanymi wcześniej zjawiskami oraz wieloma innymi czynnikami.

## 7. Genetyczne dowody na różnorodność roli ramnolipidów

Dla szczepu *P. aeruginosa* produkcja ramnolipidów przebiega przy udziale trzech genów – *rhIA*, *rhIB* i *rhIC* [126] oraz jest kontrolowana przez mechanizm oparty na *quorum-sensing* [20, 120]. Odkryto, że pierwsze dwa geny odpowiedzialne za syntezę są zorganizowane w operonie *rhLAB* indukowanym przez RhlR. *RhIA* odpowiedzialny jest za syntezę składników prekursorowych – HAA [36]. Gen *rhIB* związany jest z ramnozylotransferazą, która katalizuje reakcje tworzenia monoramnolipidów podczas przeniesienia deoksytymidyno difosforanu L-ramnozy na cząsteczkę HAA [106]. Ostatni gen, *rhIC*, jest w operonie znajdującym się w pobliżu genu (PA1131). Badacze spekulują, że koduje on białko nieznanego pochodzenia i jest również indukowany przez RhlR [119]. *RhIC* jest odpowiedzialny za katalizowanie reakcji dołączenia kolejnej cząsteczki ramnozy, co prowadzi do uzyskania diramnolipidu. Dla innych szczepów zdolnych do produkcji ramnolipidów stwierdzono podobny system z homologicznymi genami [37].

Regulacja procesu biosyntezy ramnolipidów jest procesem skomplikowanym i wielopoziomym. Ekspresja *rhLAB* jest zależna od czynnika sigma  $\sigma^S$  oraz regulatorów opartych na *quorum-sensing*, czyli RhlR i LasR (transkrypcyjne białka regulatorowe). Aktywacja RhlR wymaga obecności N-acylo laktonów homoserynowych (acylo-HSL) [107]. Związki sygnalizacyjne, takie jak acylo-HSL mogą być akumulowane we wnętrzu struktury biofilmu. Obserwowana przez wielu badaczy nadprodukcja ramnolipidów w warunkach ograniczonego dostępu do składników odżywczych dowodzi, że aktywacja ekspresji genów *rhLAB* jest związana z przekazywaniem sygnałów głodowych. U *P. aeruginosa* odkryto również nowy system kontroli na poziomie posttranskrypcyjnym oparty o działanie białka wiążącego RNA, znanego jako RsmA [60]. RsmA wykazuje pozytywną kontrolę nad tendencją komórek do ruchu typu rozpełzliwego i aktywacją czynników chorobotwórczych, jednocześnie posiada zdolność zaburzania procesów formowania biofilmu. Poprzez kontrolowanie poziomu N-acylo-HSL dochodzi do inaktywacji systemów opartych o *quorum-sensing* i ograniczenia produkcji polisacharydów. Kontrolowanie aktywności RsmA odbywa się przy udziale dwóch regulatorowych RNA: RsmY oraz RsmZ.

Dokładne badania nad systemem regulacji pozwoliły na odkrycie dwóch związanych z nim kinaz sensorycznych – RetS (regulator egzopolisacharydów i sekrecji typu-III) i LadS (regulator utraty adhezji). Podczas eksperymentów związanych z inaktywacją RetS u komórek *P. aeruginosa* zaobserwowano, że mutanty wykazywały zwiększoną tendencję do formowania biofilmów, natomiast zdolność do ruchu typu rozpełzliwego zupełnie zanikła [51, 137].

Do bardzo ciekawych wniosków prowadzi również wiele innych eksperymentów przeprowadzonych z mutantami pozbawionymi genów odpowiedzialnych za syntezę ramnolipidów. Inaktywacja *rhIA* spowodowała zahamowanie ruchu komórek bakteryjnych poprzez ruch typu rozpełzliwego i wyraźną redukcję ruchu typu drgającego, jednak nie wpłynęła na ogólną zdolność do poruszania się [79, 110]. Niezdolne do syntezy ramnolipidów komórki *P. aeruginosa* są bardziej podatne na fagocytozę i wykazują mniejszą wirulencję [136]. Wykazano, że inaktywacja tego samego genu wiąże się ze znaczącymi zmianami w strukturze biofilmu [31]. Dla mutantów nie stwierdzono obecności grzybkowatych filamentów, charakterystycznych dla dojrzałych biofilmów. Inni autorzy sugerują, że zakłócenie ekspresji genu *rhLAB* wiąże się również z zakłóceniem procesów „odłączenia się” komórek [11]. Inaktywacja genów odpowiedzialnych za syntezę ramnolipidów powoduje zatrzymanie procesów separacyjnych, jednak ani dodatek zewnętrznych ramnolipidów, ani ponowna reaktywacja genów nie pozwoliła na całkowite wznowienie mechanizmów uwalniania komórek z biofilmu. Opuszczanie biofilmu jest ściśle powiązane z nadprodukcją ramnolipidów, syntezą enzymów degradujących biopolimerową matrycę oraz wzmoczoną aktywnością migracyjną, co w konsekwencji prowadzi do przywrócenia fenotypowych cech komórki planktonowej. Wyniki te mogą sugerować istnienie globalnego czynnika, który koordynowałby działania komórek bakteryjnych podczas wyboru pomiędzy mobilnym a stacjonarnym trybem życia poprzez regulację biosyntezy ramnolipidów.

Stwierdzono, że wymieniony wcześniej system RsmA jest jednym z takich czynników [138]. Wpływa na tryb życia komórek poprzez stymulowanie ruchu typu rozpełzliwego i aktywowanie czynników infekcyjnych oraz hamowanie procesów tworzenia biofilmu. Kolejnym ważnym regulatorem jest c-di-GMP – międzykomórkowa cząsteczka sygnalizacyjna. Jest ona syntezowana przy udziale cyklaz diguanidynowych (białek z domeny GGDEF) i degradowana przy udziale specyficznych fosfodiesteraz (głównie białka z domeny EAL). W zależności od sygnałów pozakomórkowych wpływających na stężenie c-di-GMP następują zmiany w zachowaniu społeczności komórek. Zwiększonej biosyntezie c-di-GMP towarzyszy zwiększenie stabilności

wielokomórkowych aglomeratów, oraz obniżenie ruchliwości i zahamowanie procesów charakterystycznych dla stanów chorobotwórczych. Komórki *P. aeruginosa* posiadają łącznie aż 38 białek z obu domen, które mogą spełniać funkcje sensoryczne i regulować lokalne i globalne stężenie c-di-GMP [73, 145]. Dla szczepu *P. aeruginosa* PA14 odkryto do tej pory trzy istotne enzymy regulujące aspekty związane z mobilnością komórek i tendencją do tworzenia biofilmów bakteryjnych: SadC, BifA i SadB. SadC to znajdująca się wewnątrz błony cyklaza diguanidynowa odpowiedzialna za produkcję c-di-GMP w wyniku niezbadanego do tej pory bodźca – prawdopodobnie jest to sygnał kontaktu z powierzchnią lub zmian w gęstości medium [94]. BifA, będący fosfodiesterazą, pozwala na kontrolowanie stężenia c-di-GMP, co z kolei wiąże się z regulacją natężenia sygnału [82]. SadB jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za przeniesienie sygnału do loci *pel* i *psl* zawierających geny regulujące wydzielanie egzopolisacharydów oraz genów związanych z regulacją funkcji rzęsek. Co ciekawe, wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Hickmana i Harwooda [61] wskazują, że główny regulator ekspresji genów odpowiedzialnych za formowanie rzęsek – FleQ, jest również zdolny do represji genów *pel* poprzez zmiany w obrębie c-di-GMP.

Obecnie dla szczepu *P. aeruginosa* znane są dwa loci odpowiedzialne za kontrolę poziomu ekspresji i aktywności białek z domen GGDEF i EAL – *wsp* i *sadSRA*. Szereg prac poświęconych tej tematyce pozwala stwierdzić, że oba systemy przewodzenia sygnałów w odpowiedzi na warunki środowiskowe wyraźnie wpływają na zachowanie komórek. Zakłócenia w obrębie *wsp* powodują wzmoczoną agregację komórek, zmiany w morfologii komórki oraz zahamowanie ruchu poprzez ruch drgający i pływanie [62]. Prawidłowe działanie drugiego z systemów jest niezbędne dla przebiegu procesów związanych z dojrzewaniem biofilmu [81, 83]. Poprzez kontrolę poziomu c-di-GMP systemy te regulują ruchliwość komórek, wydzielanie egzopolisacharydów i tworzenie biofilmu, przez co stanowią swoisty „przełącznik” pomiędzy mobilnym a stacjonarnym trybem życia.

Obecnie wielu badaczy na całym świecie prowadzi eksperymenty w celu odnalezienia kolejnych kluczowych elementów genetycznych wpływających na wybory podejmowane przez mikroorganizmy. Decyzje te mają często charakter drastycznych zmian w morfologii nie tylko pojedynczej komórki, lecz również całych kolonii. Analiza wielu sygnałów zewnętrznych i związanych z nimi systemów regulacyjnych pozwala na odkrycie kolejnych intrygujących zależności. Najnowsze prace podejmujące tę trudną tematykę zwracają uwagę na nowe czynniki wpływające na sposób egzystowania mikroorganizmów w danych warunkach:

białko regulacyjne AlgR, białko autotransporterowe EstA, fosfatazę tyrozynową TpbA oraz obecność żelaza [49, 96, 135, 143]. Prace te dostarczają jednocześnie kolejnych dowodów na to, że ramnolipidy stanowią istotny element w funkcjonowaniu tych systemów.

## 8. Podsumowanie

Jaka jest rola biosurfaktantów? – w świetle najnowszych odkryć z pewnością można stwierdzić, że jest ona bardzo różnorodna. Historia badań nad ramnolipidami może służyć jako doskonały przykład na nieustanne dojrzewanie myśli naukowej, które porównać można do ewolucji. Analizując wnikliwie wszystkie przeprowadzone badania stajemy się świadkami wspaniałego cyklu nieustannych pytań i odpowiedzi, które rodzą nowe pytania.

Choć niewątpliwie ramnolipidy związane są z mechanizmami ułatwionego poboru hydrofobowych substratów przez mikroorganizmy [7], to jednak wiele prac wskazuje na to, że nie jest to ich głównym zadaniem. Jak wcześniej wspomniano, związki te mogą oddziaływać na powierzchnię struktur komórkowych, prowadząc do zmian w obrębie właściwości powierzchniowych [4, 148]. Ramnolipidy, lub związki prekursorowe w ich syntezie, wpływają na ruch typu rozpełzliwego po powierzchni [36, 79]. Służą również jako substancje o działaniu podobnym do antybiotyków, skierowanym przeciw innym mikroorganizmom [54], środki ochronne przed fagocytozą [2] oraz związki czynnie uczestniczące w infekcjach chorobotwórczych [117], gdyż można je znaleźć w płwocinie pacjentów chorych na mukowiscydozę [80], wywołują hemolizę [76], a ich obecność zakłóca działanie rzęsek w tkance nabłonkowej układu oddechowego [117]. Ich amfifilowa budowa sprawia, że są one istotnym czynnikiem wpływającym na formę i trwałość biofilmu bakteryjnego [31]. Mogą one oddziaływać z biopolimerową matrycą biofilmu, potencjalnie prowadząc do jej rozpadu przez solubilizację jej składników i zamykanie ich w micelach [11], choć jednocześnie odgrywają istotną rolę podczas wczesnych etapów tworzenia biofilmu bakteryjnego i w późniejszych etapach jego dojrzewania [110]. Połączenie wyżej wymienionych obserwacji z badaniami genetycznymi pozwoliło na otrzymanie modelu określającego zachowanie całych społeczności mikroorganizmów w zależności od czynników środowiskowych [138]. Od formowania biofilmu i ochrony komórek w niesprzyjających warunkach środowiskowych, poprzez stymulację działań odpowiedzialnych za dojrzewanie biofilmu, aż do procesu rozpadu biofilmu i uaktywnienia funkcji odpowiedzialnych za ataki chorobotwórcze – ramnolipidy są bardzo istotnym elementem na każdym etapie tego procesu.

Duża liczba zaobserwowanych i opisanych funkcji ramnolipidów, choć początkowo była przyczyną wielu naukowych sporów, w świetle najnowszych prac naukowych stanowi spójne połączenie wspólnych wysiłków wielu naukowców na przestrzeni kilku dekad. Ramnolipidy są zatem doskonałym przykładem wielofunkcyjnego ogniwa, będącego trybikiem wielkiej maszyny regulującej życie i funkcjonowanie mikroorganizmów. Sposób działania tego ogniwa na wielu równoległych, lecz związanych ze sobą płaszczyznach staje się coraz bardziej widoczny wraz z kolejnymi doniesieniami literaturowymi. I choć wciąż jesteśmy dalecy od pełnego zrozumienia wszystkich mechanizmów, to z każdym krokiem zbliżamy się do prawdy.

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN ID 18672 N N305 035434, lata 2008–2010. Autorzy pragną szczególnie podziękować Alicji Szulc za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

## Piśmiennictwo

1. Abdel-Mawgoud A.M., Lépine F., Déziel E.: Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1323–1336 (2010)
2. Alhede, M., Bjarnsholt T., Jensen P.O., Phipps R.K., Moser C., Christophersen L., Christensen L.D., van Gennip M., Parsek, M., Hoiby, N., Rasmussen, T.B., Givskov, M.: *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol. Sgm.* **155**, 3500–3508 (2009)
3. Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert P.: Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 179–184 (1998)
4. Al-Tahhan R.A., Sandrin T.R., Bodour A.A., Maier R.M.: Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3262–3268 (2000)
5. Arino S., Marchal R., Vandecasteele J.P.: Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 162–168 (1996)
6. Arino S., Marchal R., Vandecasteele J.P.: Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 769–776 (2008)
7. Beal R., Betts W.B.: Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 158–168 (2000)
8. Bergmans D.C., Bonten M.J., Stobberingh E.E., van Tiel F.H., van der Geest S., de Leeuw P.W., Gaillard C.A.: Colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in patients developing ventilator-associated pneumonia. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **19**, 853–855 (1998)
9. Bergstrom S., Theorell H., Davide H.: On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobacteria tuberculosis*. *Ark. Kem. Mineral Geol.* **23A**, 1–12 (1946)
10. Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K.: Self-generated diversity produces ‘insurance effects’ in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16630–16635 (2004)
11. Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K.: Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**, 1210–1223 (2005)
12. Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P.: An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. *Microbiol.* **143**, 1087–1093 (1997)
13. Bouchez-Nad’tali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P.: Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 421–8 (1999)
14. Boulton C.A., Ratledge C.: The physiology of hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: *Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Ed. Wieseman, A. Halstead Press, John Wiley, New York 1984, p. 11–77
15. Caiazza N.C., Shanks R.M., O’Toole G.A.: Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 7351–7361 (2005)
16. Campos-Garcia J., Caro A.D., Najera R., Miller-Maier R.M., Al-Tahhan R.A., Soberon-Chavez G.: The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* **180**, 4442–4451 (1998)
17. Chrzanowski L., Bielicka-Daszkiwicz K., Owsianiak M., Aurich A., Kaczorek E., Olszanowski A.: Phenol and n-alkanes (C<sub>12</sub> and C<sub>16</sub>) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1943–1949 (2008)
18. Chrzanowski L., Kaczorek E., Olszanowski A.: Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1273–1277 (2005)
19. Chrzanowski L., Kaczorek E., Olszanowski A.: The Ability of *Candida maltosa* for Hydrocarbon and Emulsified Hydrocarbon Degradation. *Pol. J. Environmen. Studies*, **15**, 47–51 (2006)
20. Chrzanowski L., Kaczorek E., Pijanowska E., Olszanowski A.: The relation between rhamnolipid adsorption on yeast and bacterial strains, hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *Fresen. Environ. Bull.* **15**, 682–686 (2006)
21. Chrzanowski L., Owsianiak M., Wyrwas B., Aurich A., Szulc A., Olszanowski A.: Adsorption of Sodium Dodecylbenzenesulphonate (SDBS) on *Candida maltosa* EH 15 Strain: Influence on Cell Surface Hydrophobicity and n-alkanes Biodegradation. *Water Air Soil Pollut.* **196**, 345–353 (2009)
22. Chrzanowski L., Stasiewicz M., Owsianiak M., Szulc A., Piotrowska-Cyplik A., Olejnik-Schmidt A.K., Wyrwas B.: Biodegradation of diesel fuel by a microbial consortium in the presence of 1-alkoxymethyl-2-methyl-5-hydroxypyridinium chloride homologues. *Biodegradation*, **20**, 661–671 (2009)
23. Chrzanowski L., Wick L.Y., Meulenkamp R., Kaestner M., Heipieper H.J.: Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Let. Appl. Microbiol.* **48**, 756–762 (2009)
24. Cooper D.G.: Unusual aspects of biosurfactant production. *Biotechnology for Oils and Fat Industry*, C. Radledge, P. Dawson, J. Ra (eds.) Amer. Oil Chemist’s Soc. Illinois 1984, p. 281–287
25. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**, 1318–1322 (1999)

26. Czaczyk K., Białas W., Myszka K.: Cell surface hydrophobicity of *Bacillus* spp. as a function of nutrient supply and lipopeptides biosynthesis and its role in adhesion. *Pol. J. Microbiol.* **57**, 313–319 (2008)
27. Czaczyk K.: Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Post. Mikrobiol.* **43**, 267–283 (2004)
28. Danese P. N., Pratt L. A., Kolter R.: Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**, 3593–3596 (2000)
29. Darzins A.: Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **11**, 137–153 (1994)
30. Davey M. E., Caiazza N. C., O'Toole G. A.: Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**, 1027–1036 (2003)
31. Davey M. E., O'Toole G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847–867 (2000)
32. Desai J.D., Banat I.M.: Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47–64 (1997)
33. Déziel E., Comeau Y., Villemur R.: Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with the emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J. Bacteriol.* **183**, 1195–1204 (2001)
34. Déziel E., Lépine F., Dennie D., Boismenu D., Mamer O.A., Villemur R.: Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 244–252 (1999)
35. Déziel E., Lépine F., Milot S., Villemur R.: RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* **149**, 2005–2013 (2003)
36. Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F., Bisailon J.G.: Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1908–1912 (1996)
37. Dubeau D., Déziel E., Woods D., Lépine F.: *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* **9**, 263 (2009)
38. Duldhardt I., Gaebel J., Chranowski L., Nijenhuis I., Härtig C., Schauer F., Heipieper H.J.: Adaptation of anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Geobacter sulfurreducens* and *Desulfococcus multivorans* to organic solvents on the level of membrane fatty acid composition. *Microbial Biotechnol.* **3**, 201–209 (2010)
39. Edwards J., Hayashi J.: Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 415–421 (1965)
40. Espinosa-Urgel M.: Resident Parking Only: Rhamnolipids Maintain Fluid Channels in Biofilms. *J. Bacteriol.* **185**, 699–700 (2003)
41. Espinosa-Urgel M., Salido A., Ramos J. L.: Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* **182**, 2363–2369 (2000)
42. Falatko D.F., Novak J.T.: Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* **64**, 163–169 (1992)
43. Feichter A.: Biosurfactants moving towards industrial applications. *Trends Biotechnol.* **10**, 208–217 (1992)
44. Feldman C., Kassel M., Cantrell J., Kaka S., Morar R., Goolam M.A., Philips J.I.: The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur. Respir. J.* **13**, 546–551 (1999)
45. Finnerty W.: Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 291–295 (1994)
46. Fraser G. M., Hughes C.: Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 630–635 (1999)
47. Friedman L., Kolter R.: Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**, 4457–4465 (2004)
48. Girón J. A., Torres A. G., Freer E., Kaper J. B.: The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**, 361–379 (2002)
49. Glick R., Gilmour C., Tremblay J., Satanower S., Avidan O., Déziel E., Greenberg E.P., Poole K., Banin E.: Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 2973–2980 (2010)
50. Goldflam M., Rowe J.J.: Evidence for gene sharing in the nitrate reduction systems of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **155**, 1446–1449 (1983)
51. Goodman A.L., Kulasekara B., Rietsch A., Boyd D., Smith R.S., Lory S.: A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell*, **7**, 745–754 (2004)
52. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.: *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 301–305 (1984)
53. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.: Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 443–448 (1986)
54. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A.: Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 316–322 (2003)
55. Hahn H.P.: The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene*, **192**, 99–108 (1997)
56. Hassett D.J., Ma J.F., Elkins J.G., McDermott T.R., Ochsner U.A., West S.E.: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**, 1082–1093 (1999)
57. Hauser G., Karnovsky M.L.: Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **224**, 91–105 (1957)
58. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710–3713 (1999)
59. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G.J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., Parsek M.R.: Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* **183**, 5395–5401 (2001)
60. Heurlier K., Williams F., Heeb S., Dormond C., Pessi G., Singer D., Cámara M., Willis P., Haas D.: Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **189**, 2936–2945 (2004)

61. Hickman J.W., Harwood C.S.: Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **69**, 376–389 (2008)
62. Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S.: A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14422–14427 (2005)
63. Hirayama T., Kato I.: Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **139**, 81–85 (1982)
64. Hisatsuka K.T., Nakahara T., Sano N., Yamada K.: Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 686–692 (1971)
65. Hobbs M., Collie E.S., Free P.D., Livingston S.P., Mattick J.S.: PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **7**, 669–682 (1993)
66. Hommel R.K.: Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. In: *Biochemistry of Microbial Biodegradation*. Ed. Ratledge C. Kluwer Acad. Publi. Dordrecht: 1994, p. 63–87
67. Humhries M., Jaworzyn F., Cantwell J.B.: The effect of a range of biological polymers and synthetic surfactants on the adhesion of marine *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021 to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiol. Lett.* **38**, 299–308 (1986)
68. Hunt S.M., Werner E.M., Huang B., Hamilton M.A., Stewart P.S.: Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7418–7425 (2004)
69. Irie Y., O'Toole G.A., Yuk M.H.: *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 237–243 (2005)
70. Ishimoto K. S., Lory S.: Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1954–1957 (1989)
71. Jain D. K., Lee H., Trevors J.T.: Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol.* **10**, 87–93 (1992)
72. Jarvis F.G., Johnson M.J.: A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 4124–4126 (1949)
73. Jenal U., Malone J.: Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 385–407 (2006)
74. Johnsen A.R., Karlson U.: Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Appl. Microbiol. Biot.* **63**, 452–459 (2004)
75. Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H.: Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, **133**, 71–84 (2005)
76. Johnson M. K., Boese-Marrazzo D.: Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **29**, 1028–1033 (1980)
77. Kaczorek E., Chrzanowski Ł., Pijanowska A., Olszanowski A.: Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants Rhamnolipides and saponins. *Biores. Technol.* **99**, 4285–4291 (2008)
78. Koch A.K., Käppeli O., Feichter A., Reiser J.: Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* **173**, 4212–4219 (1991)
79. Köhler T., Curly L. K., Barja F., Van Delden C., Pechère J.C.: Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**, 5990–5996 (2000)
80. Kownatzki R., Tummler B., Doring G.: Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet*, **i**, 1026–1027 (1987)
81. Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., O'Toole G.A.: BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**, 8165–8178 (2007)
82. Kuchma S.L., Connolly J.P., O'Toole G.A.: A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 1441–1454 (2005)
83. Kulasekara H.D., Ventre I., Kulasekara B.R., Lazdunski A., Filloux A., Lory S.: A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol. Microbiol.* **55**, 368–380 (2005)
84. Lang S., Gilbon A., Syldatk C., Wagner F.: Comparison of interfacial active properties of glycolipid from microorganisms, In: K. L. Mittal and B. Lindman (eds.), *Surfactants in solution*. Plenum Press, New York 1984, p. 1365–1376
85. Lang S., Wagner F.: Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric N. (ed.) *Biosurfactants*. (Surfactant Specie series, vol 48) Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1993, p. 251–268
86. Lang S., Wullbrandt D.: Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 22–32 (1999)
87. Lequette Y., Greenberg E.P.: Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 37–44 (2005)
88. Makkar R., Cameotra S.: An update on the unconventional substrates of the biosurfactant production and their (new) applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 428–434 (2002)
89. Makkar R.S., Rockne K.J.: Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Env. Toxicol. Chem.* **22**, 2280–2292 (2003)
90. Manresa M.A., Bastida J., Mercade M.E., Robert M., de Andres C., Espuny M.J., Guinea J.: Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J. Ind. Microbiol.* **8**, 133–136 (1991)
91. Mata-Sandoval J., Karns J., Torrents A.: High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromatogr. A* **864**, 211–220 (1999)
92. Matsufuji M., Nakata K., Yoshimoto A.: High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **9**, 1213–1215 (1997)
93. Meadows P. S.: The attachment of bacteria to solid surfaces. *Arch. Mikrobiol.* **75**, 374–381 (1971)
94. Merritt J.H., Brothers K.M., Kuchma S.L., O'Toole G.A.: *SadC* reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**, 8154–8164 (2007)
95. Miller R.M.: Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In: Skipper H.D., Turco R.F. (Eds.), *Bioremediation: Science and Applications*, Soil Sci. Soc. America, Madison, WI, 1995, s. 322–354
96. Morici L.A., Carterson A.J., Wagner V.E., Frisk A., Schurr J.R., zu Bentrup K.H., Hassett D.J., Iglewski B.H., Sauer K., Schurr M.J.: *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Represses the Rhl Quorum-Sensing System in a Biofilm-Specific Manner. *J. Bacteriol.* **189**, 7752–7764 (2007)

97. Mulligan C.N., Gibbs B.F.: Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3016–3019 (1989)
98. Mulligan C.N., Mahmoudides G., Gibbs B.F.: The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **12**, 199–209 (1989)
99. Neu T.R.: Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**, 151–166 (1996)
100. Noordman W.H., Janssen D.B.: Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4502–4508 (2002)
101. O'Toole G.A., Kolter R.: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998)
102. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R.: Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49–79 (2000)
103. Oberbremer A., Müller-Hurtig R., Wagner F.: Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 485–489 (1990)
104. Obuekwe C.O., Al-Jadi Z.K., Al-Saleh E.S.: Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1876–1887 (2008)
105. Obuekwe C.O., Al-Jadi Z.K., Al-Saleh E.S.: Insight into heterogeneity in cell-surface hydrophobicity and ability to degrade hydrocarbons among cells of two hydrocarbon-degrading bacterial populations. *Can. J. Microbiol.* **53**, 252–260 (2007)
106. Ochsner U.A., Koch A.K., Fiechter A., Reiser J.: Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**, 2044–2054 (1994)
107. Ochsner, U.A., Reiser J.: Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6424–6428 (1995)
108. Owsianiak M., Chrzanowski L., Szulc A., Staniewski J., Olszanowski A., Olejnik-Schmidt A.K., Heipieper H.J.: Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Biores. Technol.* **100**, 1497–1500 (2009)
109. Owsianiak M., Szulc A., Chrzanowski L., Cyplik P., Bogacki M., Olejnik-Schmidt A.K., Heipieper H.J.: Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 545–553 (2009)
110. Pamp S.J., Tolker-Nielsen T.: Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 2531–2539 (2007)
111. Parra J.L., Pastor J., Comelles F., Manresa M.A., Bosch M.P.: Studies of biosurfactants obtained from olive oil. *Tenside Surfactant Detection*, **27**, 302–306 (1990)
112. Parsek M.R., Greenberg E.P.: Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8789–8793 (2000)
113. Parsek M.R., Singh P.K.: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003)
114. Pijanowska A., Kaczorek E., Chrzanowski L., Olszanowski A.: Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 677–682 (2007)
115. Pornsunthorntawe O., Maksung S., Huayyai O., Rujiravanit R., Chavadej S.: Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. *Biores. Technol.* **100**, 812–818 (2009)
116. Rahim, R., Ochsner U.A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam J.S., Soberon-Chavez G.: Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **40**, 708–718 (2001)
117. Read R.C., Roberts P., Munro N., Rutman A., Hastie A., Shryock T., Hall R., McDonald-Gibson W., Lund V., Taylor G.: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* **72**, 2271–2277 (1992)
118. Rivera M., McGoarty E.J.: Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length. *J. Bacteriol.* **170**, 512–521 (1988)
119. Roberts N.A., Gray G.W., Wilkinson S.G.: Release of lipopolysaccharide during the preparation of cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **135**, 1068–1071 (1967)
120. Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G.: *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140–1154 (2002)
121. Schooling S.R., Charaf U.K., Allison D.G., Gilbert G.: A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms*, **1**, 91–99 (2004)
122. Shapiro J.A.: Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 81–104 (1998).
123. Sharma M., Anand S.K.: Swarming: a coordinated bacterial activity. *Curr. Sci.* **83**, 707–715 (2002)
124. Sim L., Ward O.P., Li Z.Y.: Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 232–238 (1997)
125. Singer M.E., Finnerty W.R.: Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: *Microbial Metabolism of Straight-Chain and Branched Alkanes*, ed. Atlas R.M. Macmillan Publ. Co. New York, 1984, p. 1–60
126. Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E.: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 718–725 (2005)
127. Southam G., Whitney M., Knickerbocker C.: Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **47**, 197–201 (2001)
128. Stewart P.S.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 107–113 (2002)
129. Stoodley P., Cargo R., Rupp C.J., Wilson S., Klapper I.: Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 361–367 (2002)
130. Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W.: Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5608–5613 (2001)
131. Sylđatk C., Lang S., Matulović U., Wagner F.: Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z. Naturforsch.* **40**, 61–67 (1985)

132. Taguchi K., Fukutomi H., Kuroda A., Kato J., Ohtake H.: Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **143**, 3223–3229 (1997)
133. Thormann K.M., Saville R.M., Shukla S., Spormann A.M.: Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 1014–1021 (2005)
134. Tremblay J., Richardson A.P., Lépine F., Déziel E.: Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behavior. *Environ. Microbiol.* **9**, 2622–2630 (2007)
135. Ueda A., Wood T.K.: Tyrosine phosphatase TpbA of *Pseudomonas aeruginosa* controls extracellular DNA via cyclic diguanylic acid concentrations. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**, 449–455 (2010)
136. Van Gennip M., Christensen L.D., Alhede M., Phipps R., Jensen P.O., Christophersen L., Pamp S.J., Moser C., Mikkelsen P.J., Koh A.Y., Tolker-Nielsen T., Pier G.B., Hoiby N., Givskov M., Bjarnsholt T.: Inactivation of the rhlA gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Apmis*, **117**, 537–546 (2009)
137. Ventre I., Goodman A.L., Vallet-Gely I., Vasseur P., Soscia C., Molin S., Bleves S., Lazdunski A., Lory S., Filloux A.: Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 171–176 (2006)
138. Verstraeten N., Braeken K., Dabkurami B., Fauvart M., Franssaer J., Vermant J., Michiels J.: Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* **16**, 496–506 (2008)
139. Volkering F.A., Breure M., Rulkens W.H.: Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegrad.* **8**, 401–417 (1998)
140. Webb J.S., Thompson L.S., James S., Charlton T., Tolker-Nielsen T., Koch B.: Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **185**, 4585–4592 (2003)
141. Whitchurch C.B., Hobbs M., Livingston S.P., Krishnapillai V., Mattick J.S.: Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene*, **101**, 33–44 (1991)
142. Whiteley M., Bangera M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P.: Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, **413**, 860–864 (2001)
143. Wilhelm S., Gdynia A., Tielen P., Rosenau F., Jaeger K.E.: The Autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**, 6695–6703 (2007)
144. Wilkinson S.G., Galbraith L.: Studies of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **52**, 1893–1897 (1975)
145. Wolfe A.J., Visick K.L.: Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* **190**, 463–475 (2008)
146. Yamaguchi M., Sato A., Yukuyama A.: Microbial production of sugar-lipids. *Chem. Ind.* **4**, 741–742 (1976)
147. Zhang Y., Miller R.M.: Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2101–2106 (1994)
148. Zhang Y., Miller R.M.: Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2247–2251 (1995)
149. Zhang Y., Miller R.M.: Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3276–3282 (1992)