

## OKREŚLENIE DYNAMIKI FORMOWANIA BIOFILMU PRZEZ MIKROORGANIZMY ZŁOŻA METANOGENNEGO TECHNIKĄ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ I CIEMNEGO POLA Z WYKORZYSTANIEM KOMPUTEROWEJ ANALIZY OBRAZU\*

Dariusz Chudy<sup>1</sup>, Sławomir Jabłoński<sup>1</sup>, Marcin Łukaszewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Wrocławski

<sup>2</sup> Politechnika Wroclawska

**Streszczenie.** Większość znanych populacji mikroorganizmów wykształciła uzdolnienia adhezyjne prowadzące do wytwarzania biofilmu, będącego swoiście niepowtarzalnym mikroekosystemem. Badania koncentrowały się na dynamice adhezji i tworzeniu biofilmu w warunkach beztlenowych przez złożo metanogenne. Opracowano metodę umożliwiającą szacowanie liczby metanogennych archebakterii na podstawie technik mikroskopowych. Identyfikację metanogenów oparto na autofluorescencji koenzymów  $F_{420}$  i  $F_{430}$ . W przeprowadzonych eksperymentach powstawanie biofilmu badano na płytkach polistyrenowych, zanurzonych w beztlenowym reaktorze wypełnionym złożem fluidalnym. Badana płytka była częściowo zanurzona w złożu granulowanym, a częściowo w supernatancie nad złożem. Początkowo liczba komórek metanogenne biofilmu wynosiła  $4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$  po 6 godz. kolonizacji, a następnie wzrosła do  $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$  w 27 dobie kolonizacji. Biofilm zawierający więcej bakterii metanogennych szybciej powstawał w części płytki zanurzonej w supernatancie niż w tej części, która była zanurzona w złożu granulowanym. Przełomowym momentem w tworzeniu biofilmu była 21. doba, po której agregaty (mikrokolonie) znacznie się powiększały oraz zaczynała rosnąć ilość archebakterii metanogennych.

**Słowa kluczowe:** metanogenne złożo, biofilm, warunki beztlenowe, mikroskopia fluorescencyjna,  $F_{420}$ ,  $F_{430}$ , polistyren

### WSTĘP

Uzdolnienia adhezyjne mikroorganizmów wpływają m.in. na ochronę przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Umiejscowione na wilgotnych powierzchniach stałych

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

\* Praca była częściowo finansowana z grantów NCBiR KB/48/13639/IT1-B/U/08 oraz EU POIG.01.01.02-00-016/2008.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marcin Łukaszewicz, Wydział Biotechnologii, Zakład Biotransformacji, Uniwersytet Wrocławski, Przybyszewskiego 63-77, 51-148, Wrocław, e-mail: lukasz@biotrans.uni.wroc.pl

drobnoustroje tworzące trwałe, cienkie warstwy definiuje się jako biofilm [Bower i in. 1996]. Złożone wielokomórkowe heterogenne struktury otacza macierz (matrix), zbudowana z zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS, ang. extracellular polymeric substance). Dominującymi elementami EPS są: węglowodany, białka, lipidy, kwasy nukleinowe i różne nieokreślone heteropolimery, wpływające na wytrzymałość, elastyczność oraz zdolność biofilmów do adsorpcji [Orgaz i in. 2006].

Przyleganie znajdujących się w zawieszynie komórek planktonicznych do powierzchni jest warunkowane obecnością białek adhezyjnych (z ang. cell adhesion molecule (CAM)) oraz innych struktur białkowych, takich jak wici lub fimbrie. Osiedle komórki rozrastają się, tworząc mikrokolonie, a ich metabolizm ulega zmianie, w wyniku czego wytwarzane są proteoglikany spajające i ochraniające kolonie [Drenkard 2003]. Pomiędzy zespolonymi w macierzy mikrokoloniami, poprzez sieć kanalików, zachodzi transport składników pokarmowych i produktów przemiany materii, a także transmisja cząsteczek sygnałowych, związana z wydzielaniem autoinduktorów AIPs (ang. autoinducing polypeptides). Transfer ten umożliwia komunikowanie się komórek (tzw. quorum sensing), zmiany morfologiczne komórek i organizację struktury biofilmu [Hogan i in. 2004, Krasowska i in. 2009, Murzyn i in. 2010].

Pewne grupy mikroorganizmów rezydujących w formie biofilmu mogą być wykorzystywane w biotechnologii. Można zastosować je np. w procesach degradacji zanieczyszczeń w ściekach, biofiltracji lotnych związków organicznych (VOC's) czy produkcji różnego rodzaju związków chemicznych [Xie i in. 2009].

Od dziesiątek lat w centrum zainteresowania wielu badaczy są biofilmy powstające w warunkach beztlenowych z udziałem metanogennych archebakterii, mających kluczowe znaczenie w technologiach beztlenowego rozkładu ścieków czy w przetwarzaniu odpadów organicznych. Są one odpowiedzialne za końcowy etap konwersji materii organicznej, czyli redukcję jedno- i dwuwęglowych związków do metanu. Przedstawicielei *Euryarchaeota* cechuje naturalna zdolność do wytwarzania macierzy i rezydowania w biofilmie, występującym na powierzchniach stałych lub w zawieszynie w postaci granulek albo kłaczków (z ang. flocs) [Harvey i in. 1984]. Skład mikroflory i jej organizacja wewnątrz granulek odgrywają istotną rolę w konwersji substratu. Agregaty powstają wskutek adhezji metanogenów z bakteriami acetogennymi, produkującymi  $H_2$  lub redukującymi siarczany. Centrum agregacji mogą stanowić same metanogeny albo nośniki abiotyczne. Takimi nośnikami mogą być faza stacjonarna (złoże nieruchome) bądź też faza mobilna (złoże fluidalne, zawieszinowe) [Silva i in. 2006].

Wiele beztlenowych technologii oczyszczania ścieków wykorzystuje w praktyce różnorodne reaktory wypełnione biofilmem. Czynnikiem decydującym o wysokiej efektywności usuwania zanieczyszczeń i produkcji metanu jest odpowiedni rozwój i utrzymanie biofilmu na powierzchni nośnika wypełniającego bioreaktor [Kuroda i in. 1988].

Biosynteza metanu u metanogennych archebakterii przebiega z udziałem unikatowych dla tej grupy mikroorganizmów, enzymów i grup prostetycznych. Przekazywanie elektronów z  $H_2$ , redukujących związki jednowęgłowe do metanu odbywa się za pośrednictwem koenzymu  $F_{420}$ . Forma utleniona tego koenzymu posiada maksimum absorpcji przy długości 420 nm i cechuje się niebiesko-zieloną fluorescencją [Cheeseman i in. 1972]. Końcowy etap powstawania metanu jest katalizowany przez metylo-reduktazę koenzymu M (MCR). Jej integralną częścią jest koenzym  $F_{430}$ , który ma miejsce aktywne w postaci niklowej tetrahydrokorpiny [Dey i in. 2006].

Celem pracy było badanie powstawania biofilmu zawierającego mikroorganizmy metanogenne z wykorzystaniem technik mikroskopii fluorescencyjnej i kontrastowo-fazowej oraz opracowanie zautomatyzowanej metody pozwalającej na zliczanie wszystkich komórek w ciemnym polu oraz metanogenów w mikroskopii fluorescencyjnej [Dodde-ma, Vogels 1978, Nettmann i in. 2010].

## MATERIAŁY I METODY

### Metanogenne złożo fluidalne

Doświadczenia adhezyjne prowadzono na metanogenym złożu fluidalnym, w którym mikroorganizmy tworzą autoagregaty w formie granulek o średnicy ok. 0,5–3 mm. Agregaty w ośrodku dyspergującym (supernatant, płyn hodowlany) tworzą koloid dwu-fazowy.

### Izolacja oraz warunki amplifikacji fragmentów genu kodującego 16s rRNA metodą PCR

DNA izolowano za pomocą zestawu Ultra Clean™, Microbial DNA Isolation Kit firmy Mo Bio Laboratories, Inc. Region w obrębie 16s rRNA powielano za pomocą polimeraz *Taq* i pary primerów Bact27F (5' AGRGTTYGATYMTGGCTCAG 3') oraz Bact1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Reakcję PCR (30 cykli) prowadzono w urządzeniu MJ Reaserch PLC-200 w następujących warunkach: denaturacja (1 min 94°C), hybrydyzacja (1 min 58,7°C dla Bact), elongacja (2 min 72°C). Produkt reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu, następnie chromatogramy uzyskane z sekwencjonowania fragmentów DNA zostały poddane analizie i złożone programem DNA Baser v2 firmy HeracleSoftware. Tak uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami nukleotydowymi zgromadzonymi w bazie NCBI za pomocą programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Badanie powstawania biofilmu na płytkach polistyrenowych zanurzonych w metanogenym złożu fluidalnym

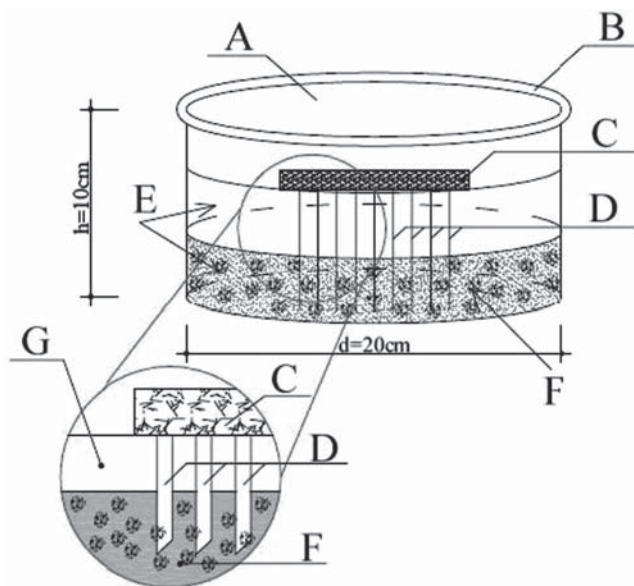
Płytki polistyrenowe (PS), (SARSTEDT) o wym.: 76 x 26 x 1 mm inkubowano w beztlenowym reaktorze o objętości 3 l, wypełnionym granulowanym złożem fluidalnym. Płytki PS zostały zakotwiczone w statywie ze spienionego polistyrenu i umieszczone w bioreaktorze. Objętość złoża w bioreaktorze ( $V_R$ ) dobrano tak, aby dolna część płytki znajdowała się w fazie złoża (F), natomiast górna w fazie supernatantu (G) (rys. 1).

Bioreaktor umieszczono w cieplarni w temp. 36°C i dokarmiano pożywką co 24 h, utrzymując odczyn pH w zakresie 6,5–7,5. Pożywkę ( $V_0$ ) stanowił roztwór: glukoza 10 g, mocznik 0,2 g, fosforan disodowy ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0,381 g, kwaśny węglan sodu 2 g, na 1 l wody destylowanej. Stosunek masowy pożywki wynosił C : N : P = 600 : 15 : 5 [Weiland 2001].

Hydrauliczny czas aktywności (HRT) wynosił 7,5 doby.

$$HRT = \frac{V_R}{V_0}$$

gdzie objętość złoża ( $V_R$ ) wynosiła 1 500 ml, objętość pożywki dodawanej co 24 h ( $V_0$ ) – 200 ml, objętość fazy złoża ( $V_Z$ ) – 500 ml; stosunek  $V_R/V_Z$  – 3:1.



Rys. 1. Schemat reaktora użytego do inkubacji: pokrywa (A), uszczelnienie pokrywy (B), tratwa ze spienionego polistyrenu (C), płytki PS (D), koloid dwufazowy (E), faza złoza granulowanego (F), faza supernatantu (G)

Fig. 1. Scheme of the incubation reactor: cover (A), seal of the lid (B), foamed polystyrene (C), PS plates (D), two-phase colloid (E), granulated sludge (F), supernatant phase (G)

Obserwacje adhezujących mikroorganizmów i powstającego biofilmu wykonywano od 6 godziny do 40 doby eksperymentu (rys. 2).

#### Mikroskopia fluorescencyjna i ciemnego pola

Do obserwacji preparatów przyżyciowych wykonywanych na płytkach PS po inkubacji używano mikroskopu fluorescencyjnego „Axio Imager A2”, (CARL ZEISS). Mikroskop wyposażony był w krótkoświetlową lampę rtęciową HBO 100 (OSRAM) o mocy 100 W i maksymalnym strumieniu świetlnym 2200 lm, z automatycznie centrującym się palnikiem.

Główne parametry techniczne w konfiguracji do obserwacji we fluorescencji i ciemnym polu:

- Filtr HE (High Efficiency) o wąskim zakresie wzbudzenia, 395–440 nm oraz szerokim zakresie emisji, 470–800 nm.
- Immersyjny obiektyw klasy IC<sup>2</sup>S (Infinity Color & Contrast Corrected), N-Achroplan 100x/1,25 z przesłoną irysową do obserwacji w ciemnym polu i fluorescencji.
- Achromatyczny, aplanatyczny kondensator z immersyjną soczewką czołową, Nr 424208 (CARL ZEISS).
- Aparat fotograficzny Canon PowerShot G10, z matrycą CCD 1.7” z 14,7 milionami efektywnych pikseli o maksymalnej rozdzielczości 4416x3312, sterowany zdalnie oprogramowaniem AxioVision Release 4.8.2.0.

### **Sporządzanie preparatów mikroskopowych**

Preparaty przyżyciowe sporządzano na płytkach PS po zadanych czasach inkubacji. Każdą z płytek po wyjęciu z pojemnika przenoszono do zlewki (150 ml) z wodą destylowaną, niedopuszczając do ich wyschnięcia. Następnie z jednej ze stron płytki lub krążka usuwano biofilm bibułą nasączoną 96% etanolem. Drugą stronę splukiwano intensywnym, jednostajnym strumieniem wody destylowanej, kierowanym z tryskawki z odległości ok. 8 cm. Strumień przesuwano „zygzakiem” pomiędzy krawędziami, począwszy od górnej części płytki (sekcja FS) do dolnej (sekcja FZ). Czynność powtarzano kilkakrotnie do odmycia widocznych zanieczyszczeń i delikatnie osuszano krawędzie płytki/krążka, pozostawiając cienką warstwę wody na powierzchni preparatu. Następnie na każdym sporządzanym preparacie umieszczano po dwa szkiełka nakrywkowe. Krawędzie szkiełek nakrywkowych pokrywano cienką warstwą lakieru, niedopuszczając tym samym do wysychania preparatu. Po wyschnięciu lakieru preparaty poddawano obserwacjom mikroskopowym.

### **Obserwacje mikroskopowe**

Przygotowywane preparaty analizowano mikroskopowo. Przed przystąpieniem do obserwacji centrowano kondensator mikroskopu metodą wg Köhlera. Po otrzymaniu obrazu w pierwszym punkcie odniesienia wykonywano po dwie fotografie (ciemne pole/fluorescencja). Następnie przesuwano preparat na stoliku mikroskopu o 1,5 mm w osi X, koordynaty stolika, do kolejnego punktu. Dla każdego z preparatów wyznaczano dwa rzędy punktów (po 5 przesuniętych w osi X i kolejnych 5 równoległych do osi X, z przesunięciem 1 cm w osi Y). W celu jak najwierniejszego odwzorowania średniego zagęszczenia biofilmu na całej płytce każdy preparat analizowano, stosując te same przesunięcia.

### **Cyfrowe przetwarzanie obrazu**

Uzyskane obrazy, w zalecanej przez producenta rozdzielczości 1230x960 (24 bit RGB color) dla obiektywu N-Achroplan 100x/1,25, przed zachowaniem poddawano przetworzeniu. W celu wzmocnienia sygnału w zakresie 0–255 dla obrazu kolorowego wykorzystano narzędzia aplikacji AxioVision. Zastosowano funkcje „najlepszego dostosowania” (best fit) dla obrazów uzyskanych we fluorescencji oraz funkcję zawężającą (Min/Max) dla obrazów w ciemnym polu. W przypadku obrazów w ciemnym polu zwiększano wartość gamma do 2,3–2,7 (w zależności od jakości uzyskanego obrazu). Następnie obrazy zapisywano bez kompresji w formacie \*.zvi (Axio Vision Image).

### **Szacowanie liczby komórek i stopnia pokrycia powierzchni płytek**

Do szacowania liczby komórek/poligonów użyto modułu do automatycznych pomiarów aplikacji AxioVision.

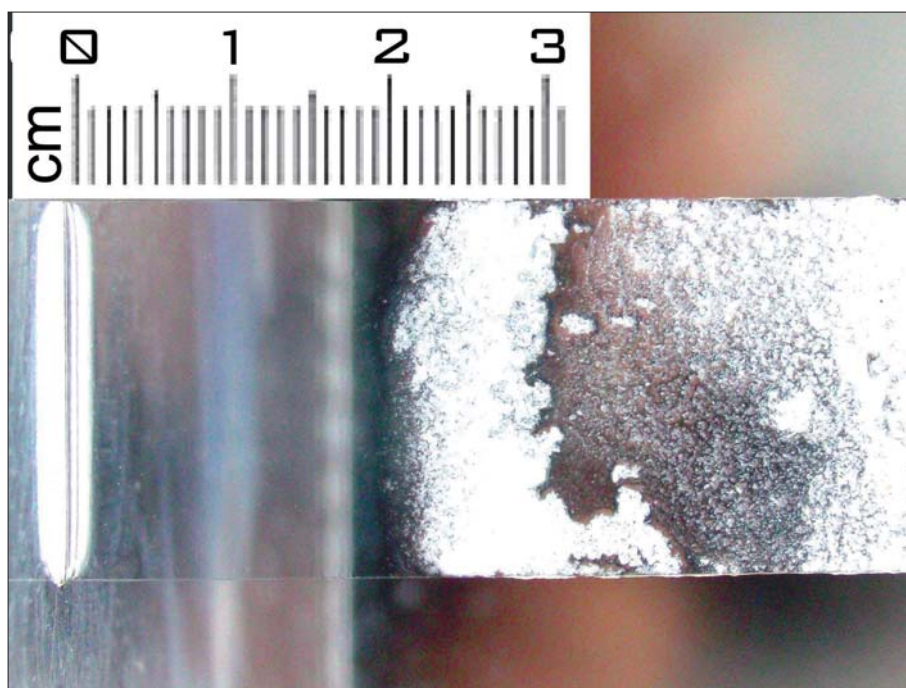
## **WYNIKI I DISKUSJA**

Do obserwacji tworzenia biofilmu zawierającego mikroorganizmy metanogenne wykonano bioreaktory wypełnione granulowanym złożem metanogennym. Populację granuliek stanowią zespoły mikroorganizmów (grupy odpowiedzialne za poszczególne etapy procesu, tworzące układy symbiotyczne). Badania przeprowadzone w Zakładzie Bio-

transformacji wykazały na podstawie sekwencji 16S rRNA, że poza mikroorganizmami metanogennymi w skład mikroflory złoża wchodziły również: *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Delftia sp.*, *Comamonas sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Trichococcus sp.*, *Nostocoida sp.*

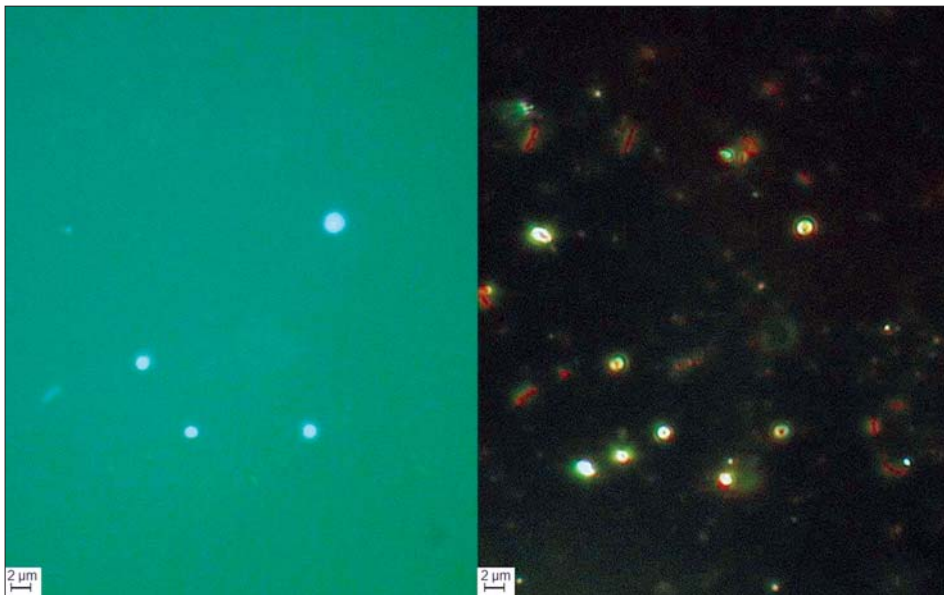
Wstępne testy z płytkami z różnych materiałów (szkło, polipropylen i polistyren) pokazały, że biofilm najszybciej powstaje na powierzchni polimerów syntetycznych, zwłaszcza hydrofobowego polistyrenu.

Obserwacje prowadzono po: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h oraz po 5, 6, 7, 8, 10, 15, 21, 24, 27, 28, 33, 40 dobie (fot. 2 i 3). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach w trzylitrowym bioreaktorze, zasilając złoża fluidalne pożywką z glukozą. W opracowaniu statystycznym zestawiono m.in. zmianę wielkości identyfikowanych na obrazach mikroskopowych obszarów (poligonów) widocznych w ciemnym polu oraz ilość widocznych we fluorescencji komórek (metanogeny). Ilość poligonów w całym zakresie wielkości identyfikowanych obiektów malała w czasie. Taki trend jest wynikiem stopniowego zanikania w czasie inkubacji najbardziej licznej frakcji pojedynczych komórek wraz ze wzrostem ilości poligonów złożonych z wielu komórek. Zaobserwowano również, że liczba poligonów w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu jest przeważnie wyższa niż w sekcji inkubowanej w fazie złoża, co sugerowały obserwacje makroskopowe (fot. 1).

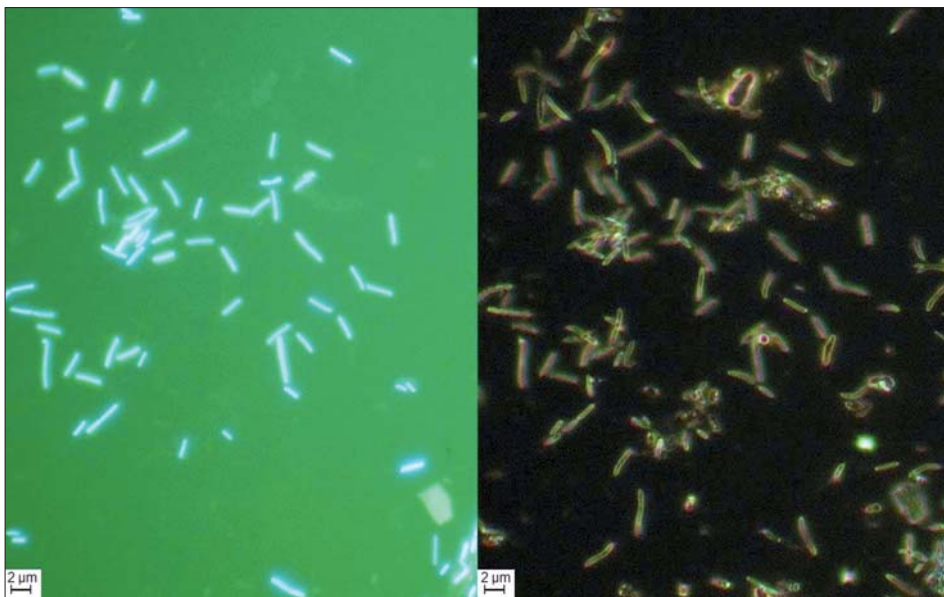


Fot. 1. Płytką po 60 dobach inkubacji jest wyraźnie pokryta biofilmem tylko w strefie inkubowanej w obrębie supernatantu

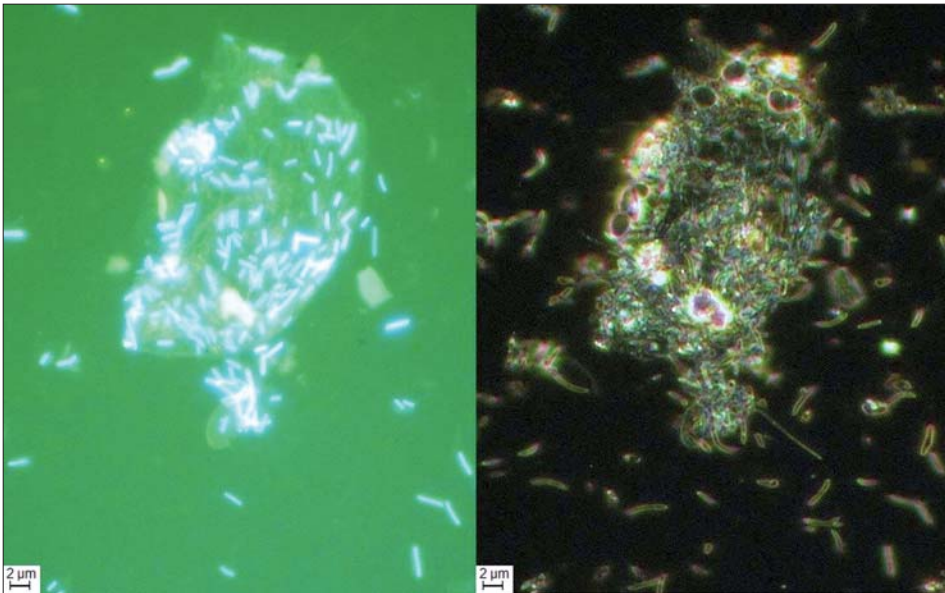
Phot. 1. Plate after 60 days of incubation is clearly coverage with biofilm, but only within the zone incubated in supernatant



Fot. 2. Obraz po 72 godzinie inkubacji  
Phot. 2. Image after 72 hour of incubation



Fot. 3. Zespół pojedynczych komórek o intensywnej fluorescencji (33. doba inkubacji)  
Phot. 3. The complex of singular cells with intense fluorescence (33 day incubation)



Fot. 4. Agregaty obserwowalne po 21. dobie inkubacji  
 Phot. 4. The aggregates observed after 21 day of incubation

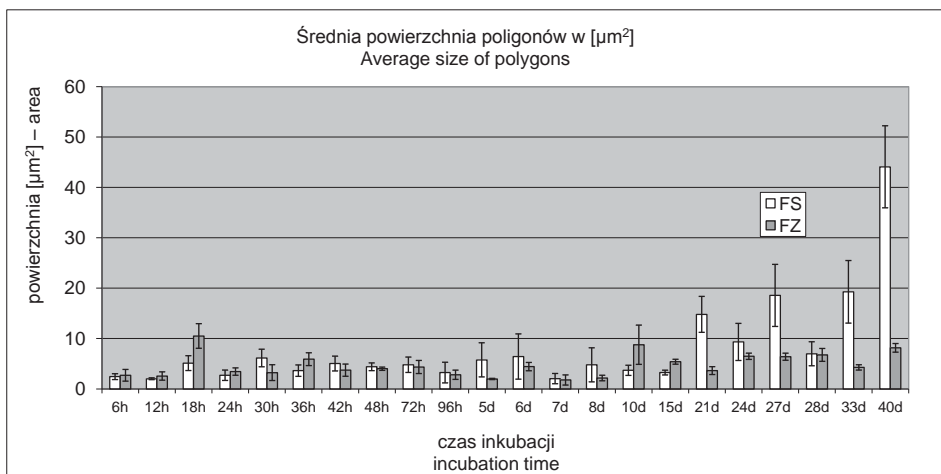
Średnia powierzchnia poligonów rośnie w czasie (rys. 2). Najbardziej wyraźny wzrost wielkości identyfikowanych obiektów ma miejsce w 21. dobie inkubacji w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu. W sekcji płytki zanurzonej w fazie złoża przez cały czas trwania eksperymentu średnia wielkość poligonów oscylowała poniżej  $10 \mu\text{m}^2$ . Do 21. doby nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między średnimi wielkościami poligonów zaobserwowanych w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu a sekcją płytki zanurzonej w fazie złoża. Po 21. dobie inkubacji istotnie wzrosła średnia powierzchnia poligonów oraz ilości komórek fluoryzujących (zawierających koenzym  $F_{420}, F_{430}$ ) (rys. 3).

Liczba komórek metanogennych rosła skokowo i była ściśle powiązana ze wzrostem średniej wielkości poligonów, a co za tym idzie, zwiększeniem udziału frakcji agregatów w biofilmie. Z ilości i wielkości poligonów wynika, że przełomowy moment następuje około 21. doby. Po pojawieniu się frakcji agregatów gwałtownie zaczyna rosnąć ilość metanogenów. Pomiedzy częściami inkubowanymi w fazie supernatantu i w fazie złoża zaobserwowano istotną różnicę zarówno jeżeli chodzi o średnią wielkość identyfikowanych poligonów, jak i ilość metanogenów.

Biofilm szybciej i intensywniej formował się na powierzchniach znajdujących się w supernatancie. Może to być powodowane transmisją autoinduktorów z granulek złoża. Po 27. dobie zaobserwowano na powierzchni płytki ponad  $1 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$  poligonów odpowiadających wielkością pojedynczym komórkom. Po tym samym czasie we fluorescencji, zaobserwowano najintensywniejszy przyrost liczby komórek metanogennych.

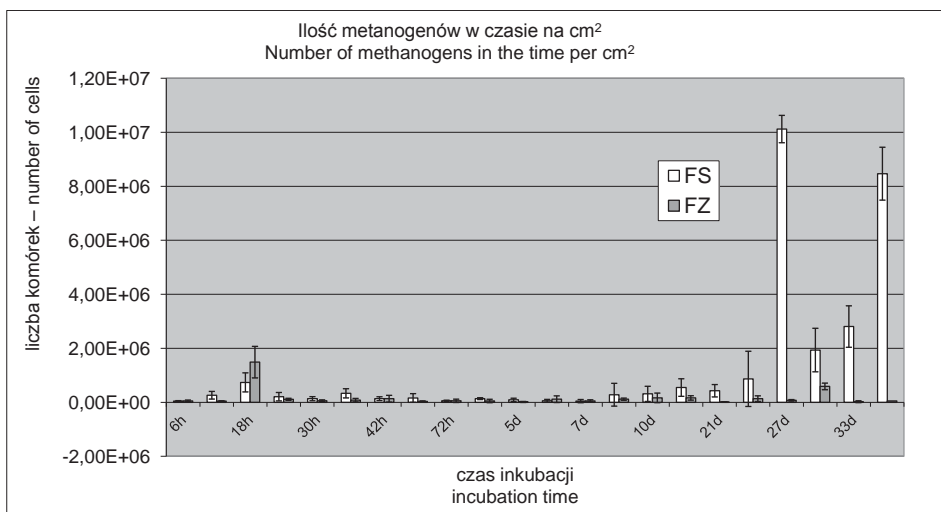
Jednak do bardziej precyzyjnego zobrazowania procentowego udziału populacji archebakterii należałoby posłużyć się analizą 16S rRNA, np. metodą według [Habouzit i in. 2011].





Rys. 2. Średnia wielkość poligonów obserwowana w fazie supernatantu oraz w fazie złoża. Słupki błędów pokazują  $\pm$  przedział ufności (dla  $\alpha = 0,05$ )

Fig. 2. Average size of polygons in the supernatant phase and the phase of the granulated sludge. Error columns shows  $\pm$  confidence interval (for  $\alpha = 0.05$ )



Rys. 3. Występowanie komórek zawierających koenzym F420 w biofilmie podczas trwania eksperymentu. Słupki błędów pokazują odchylenie standardowe

Fig. 3. Occurrence of the coenzyme F420 containing cells in the biofilm during the experiment. Error bars show the standard deviation

Najwyraźniej widoczny jest spadek liczebności frakcji pojedynczych komórek niezależnie od usytuowania na części płytki. Jednak tylko w fazie supernatantu zauważalny jest wzrost frakcji agregatów w czasie hodowli. Ten fakt można tłumaczyć zdolnością porozumiewania się (*quorum sensing*), umożliwiającą „wyczuwanie” zagęszczenia.

## PODSUMOWANIE

1. W wyniku przeprowadzonych badań opracowane zostało stanowisko do badania tworzenia biofilmu w warunkach beztlenowych.

2. Opracowano metodę umożliwiającą zautomatyzowane zliczanie wszystkich adhezowanych komórek na ciemnym polu oraz metanogenów we fluorescencji.

3. Stwierdzono, że formowanie biofilmu przez złożę metanogenne w warunkach beztlenowych było procesem długotrwałym, a ilość metanogennych archebakterii zaczynała rosnąć po 21. dobie.

4. W obrębie złoża granulowanego zachodzi prawdopodobnie zjawisko *quorum sensing*. Dojrzały biofilm nie powstawał na części płytki inkubowanej bezpośrednio w fazie złoża.

5. Ilość metanogennych archebakterii istotnie się zwiększała tylko w części płytki polistyrenowej zanurzonej w fazie supernatantu.

## PIŚMIENNICTWO

- Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A., 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (5), 152–157.
- Cheeseman P., Toms-Wood A., Wolfe R.S., 1972. Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain M.o.H. *J Bacteriol*, 112 (1), 527–531.
- Dey M., Kunz R.C., Van Heuvelen K.M., Craft J.L., Horng Y.C., Tang Q., Bocian D.F., George S.J., Brunold T.C., Ragsdale S.W., 2006. Spectroscopic and computational studies of reduction of the metal versus the tetrapyrrole ring of coenzyme F430 from methyl-coenzyme M reductase. *Biochemistry*, 45 (39), 11915–11933.
- Doddema H.J., Vogels G.D., 1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.*, 36 (5), 752–754.
- Drenkard E., 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 5(13), 1213–1219.
- Habouzit F., Gévaudan G., Hamelin J., Steyer J.-P., Bernet N., 2011. Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology*, 102 (5), 4054–4060.
- Harvey M., Forsberg C.W., Beveridge T.J., Pos J., Ogilvie J.R., 1984. Methanogenic activity and structural characteristics of the microbial biofilm on a needle-punched polyester support. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 (3), 633–638.
- Hogan D.A., Vik A., Kolter R., 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol. Microbiol.*, 54 (5), 1212–1223.
- Krasowska A., Murzyn A., Dyjankiewicz A., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D., 2009. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research*, 9 (8), 1312–1321.
- Kuroda M., Yuzawa M., Sakakibara Y., Okamura M., 1988. Methanogenic bacteria adhered to solid supports. *Water Research*, 22 (5), 653–656.
- Murzyn A., Krasowska A., Stefanowicz P., Dziadkowiec D., Łukaszewicz M., 2010. Capric Acid Secreted by *S. boulardii* Inhibits *C. albicans* Filamentous Growth, Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 5 (8): e12050.
- Nettmann E., Bergmann I., Pramschufel S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M., 2010. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (8), 2540–2548.

- Orgaz B., Kives J., Pedregosa A.M., Monistrol I.F., Laborda F., SanJosé C., 2006. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (1), 51–56.
- Silva A.J., Hirasawa J.S., Varesche M.B., Foresti E., Zaiat M., 2006. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12 (2), 93–98.
- Weiland P., 2001. *Grundlagen der Methangärung–Biologie der Substrate.*, VDI-Verlag.
- Xie B., Liang S.B., Tang Y., Mi W.X., Xu Y., 2009. Petrochemical wastewater odor treatment by biofiltration. *Bioresour Technol.*, 100 (7), 2204–2209.

**DETERMINATION THE DYNAMICS OF BIOFILM FORMATION BY MICROORGANISMS THE METHANOGENIC CONSORTIUM, BY THE FLUORESCENCE MICROSCOPY AND DARK FIELD TECHNIQUE, USING COMPUTER IMAGE ANALYSIS**

**Abstract.** Most of known populations of microorganisms evolved adhesive abilities leading to a biofilm formation which is a unique microecosystem. This study is focused on dynamic of adhesion and biofilm formation in anaerobic conditions by the methanogenic consortium. Within this work the microscopic method enabling estimation of the number of the methanogenic *Archaea* has been developed. Identification of methanogenes was based on autofluorescence of  $F_{420}$  and  $F_{430}$  coenzymes. Initially, the number of cells in methanogenic biofilm, was  $4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$  (at 6 h colonization), then increased to  $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$  (on day 27 of colonization). Biofilm formation was faster on the plate section within the supernatant. The crucial point in biofilm formation was around 21 day, after which aggregates (microcolonies) were significantly increasing and fluorescent methanogens accumulated.

**Key words:** methanogenic consortium, biofilm, anaerobic conditions, fluorescence microscopy,  $F_{420}$ ,  $F_{430}$ , polystyrene

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Chudy D., Jabłoński S., Łukaszewicz M., 2011. Określenie dynamiki formowania biofilmu przez mikroorganizmy złoża metanogennej techniką mikroskopii fluorescencyjnej i ciemnego pola z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (4), 17–28.