

Biofilm - mechanizm powstawania, struktura i zagrożenia

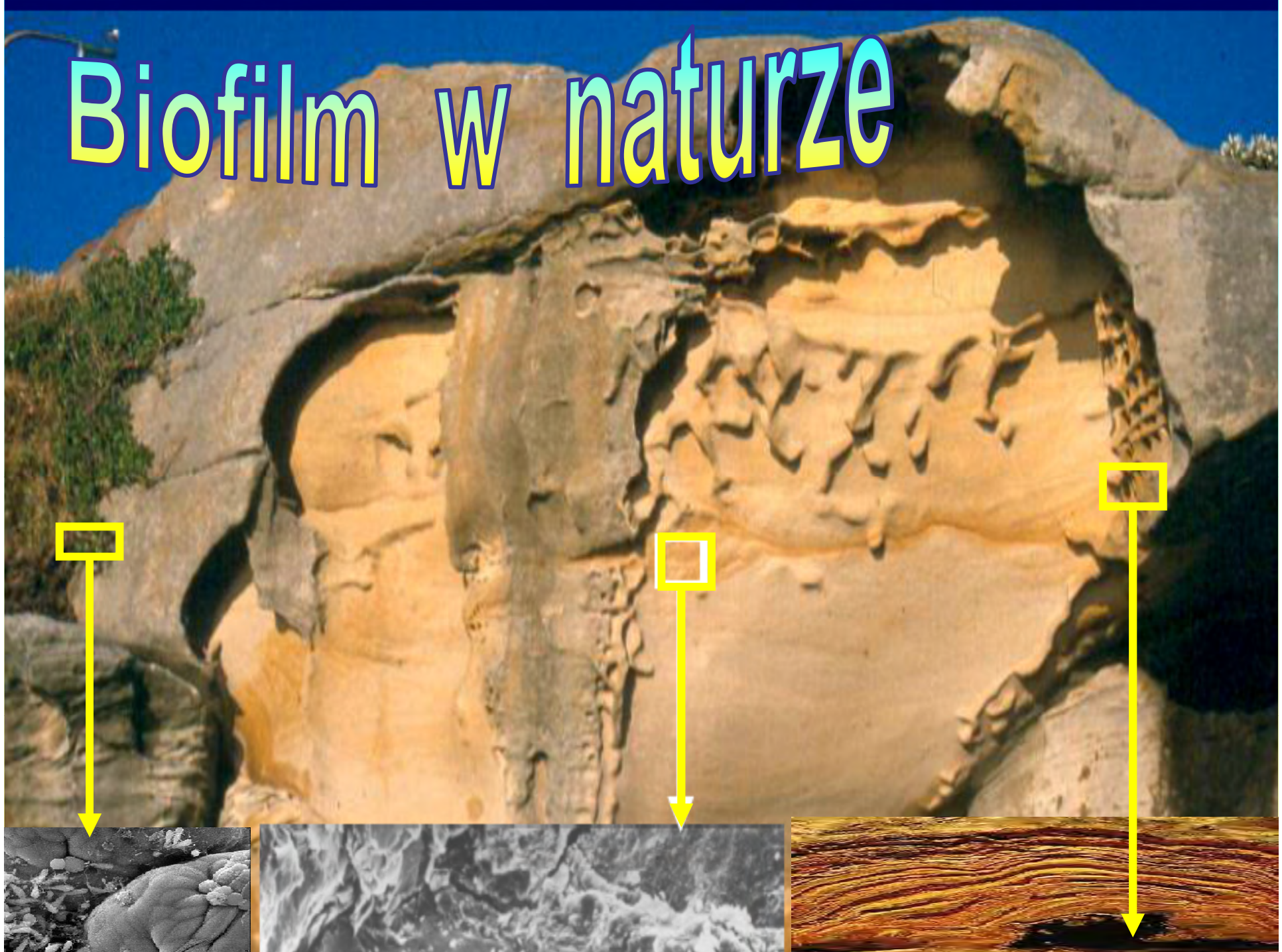


Dr. habil. Anna Sałek
International Bio-Consulting, Germany & Domatec GmbH, Germany
8 – 11 kwiecień 2008, Kraków

A close-up photograph of a stream. The water is clear and shallow, flowing over dark, wet rocks. The rocks are heavily covered with a vibrant green, fuzzy biofilm. Several thin, dry sticks and twigs are scattered across the scene, some lying on the rocks and others partially submerged in the water. The lighting is bright, creating reflections on the water's surface and highlighting the texture of the biofilm.

Biofilm w naturze

Biofilm w naturze



A microscopic image showing a complex, wavy, and translucent biofilm structure. The film has a layered, undulating appearance with various shades of brown, tan, and grey. The background is dark and textured, suggesting a natural substrate. The text "Biofilm w naturze" is overlaid in the lower right quadrant.

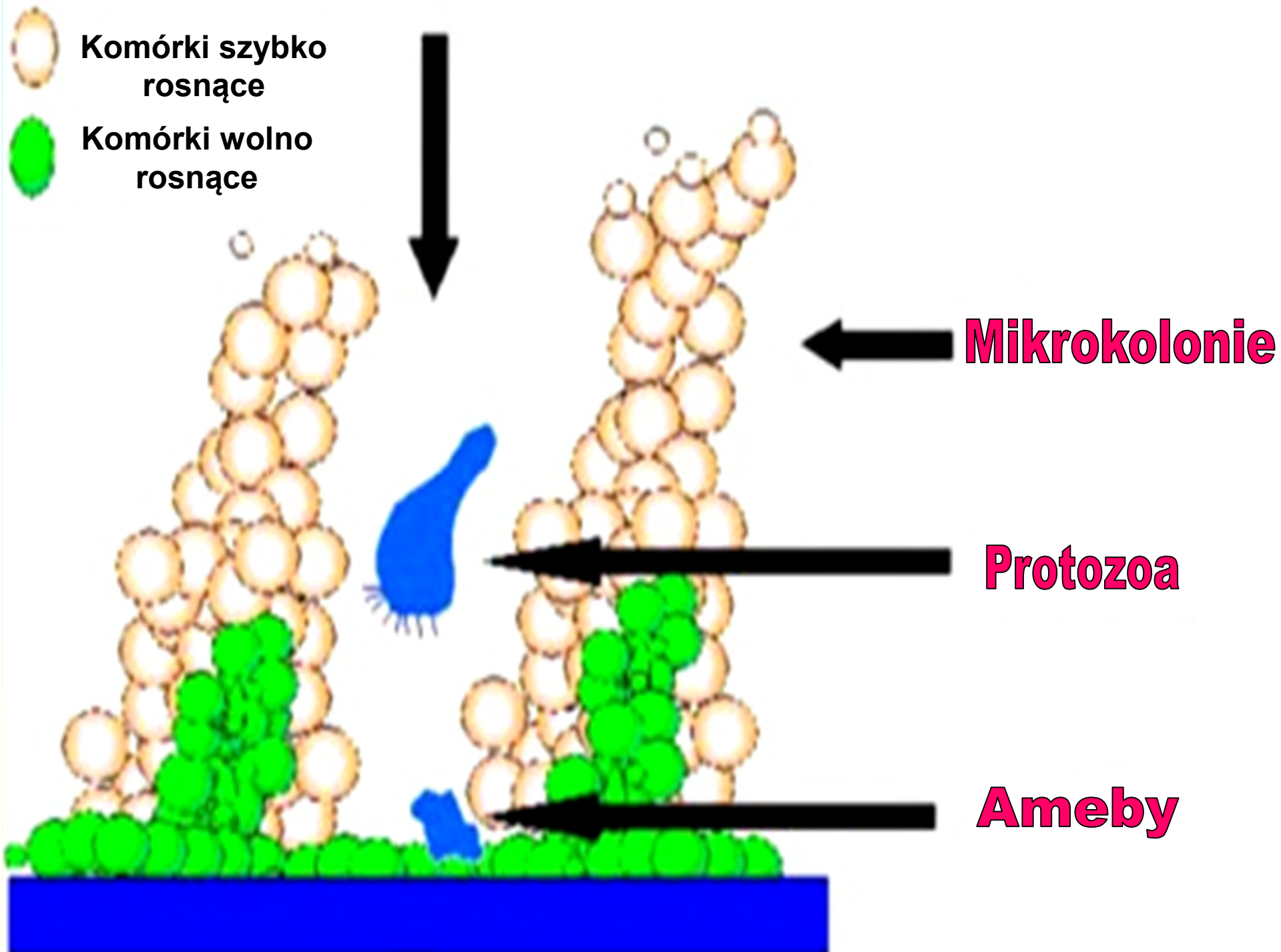
Biofilm w naturze

Co to jest biofilm?

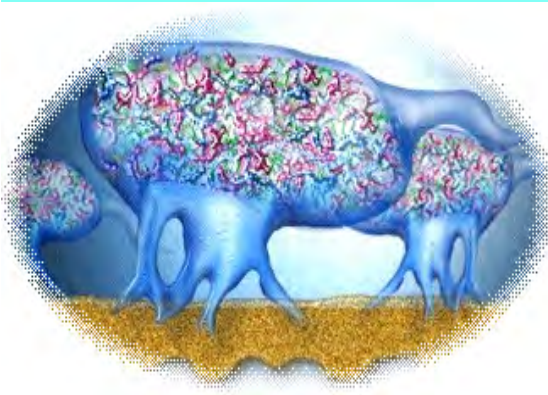
Biofilm to dynamiczny kompleks

zaglomerowanych mikroorganizmów, rosnących na stałych podłożach, pozostających w ciągłym kontakcie ze środowiskiem wodnym.

Biofilm składa się z wielu gatunków bakterii i pierwotnych organizmów (*archaea*), żyjących w granicach matrycy, powstałej z wydzielanych poza komórkę polimerycznych substancji (*extracellular polymeric substances, EPS*).

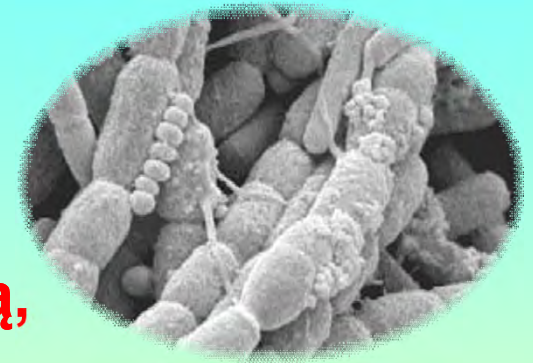


Struktura biofilmu



Biofilm charakteryzuje się:

- heterogeniczną strukturą,
genetyczną różnorodnością,



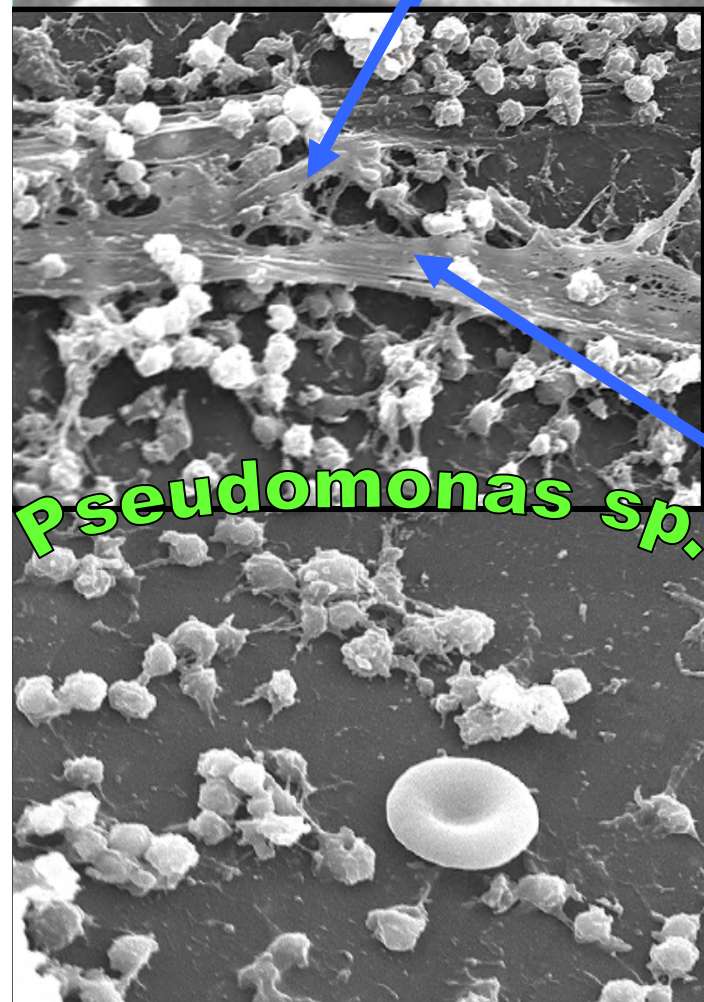
- złożonymi interakcjami w populacji drobnoustrojów,
- pozakomórkową matrycą polimerycznych substancji (EPS).

EPS jest mieszaniną różnych polimerów, zawierających, m.in.
polisacharydy, białka, fosfolipidy i kwasy nukleinowe,
wzajemnie powiązane.

Matryca polisacharydowa

EPS

Pseudomonas sp.



Pseudomonas sp.

EPS

Polisacharodywa matryca biofilmu

Acc.V - Exp | 5 μ m
25.0 kV 5076 Travertine ZF#5 Unetched Area 2



Polisacharodywa matryca biofilmu



Matryca biofilmu jako hydrożel

Niektóre z wielocukrowców matrycy mają charakter obojętny, inne zaś, wydzielane przez bakterie

Gram-ujemne, są polianionami,

jak np. egzopolisacharyd alginianu, produkowany przez *Pseudomonas aeruginosa*, który w łatwy sposób łączy się z kationami wapnia (Ca^{+2}) i magnezu (Mg^{+2}), tworząc zręby matrycy biofilmu.

W przypadku bakterii Gram-dodatnich, polisacharydy mają głównie charakter kationowy.

Skład biologiczny biofilmu

**W skład hydrożelu wchodzi wiele gatunków bakterii,
drożdży i grzybów, alg, jednokomórkowców (ameb),**

a ponadto fragmenty organiczne, pochodzące z



żywych organizmów,



niektóre związki mineralne oraz produkty korozji.

Całość stanowi swoisty, złożony ekosystem.

Bakterie budujące biofilm tworzą



ekosystem we wnętrzu matrycy EPS

Biofilm - "groźny" ekosystem

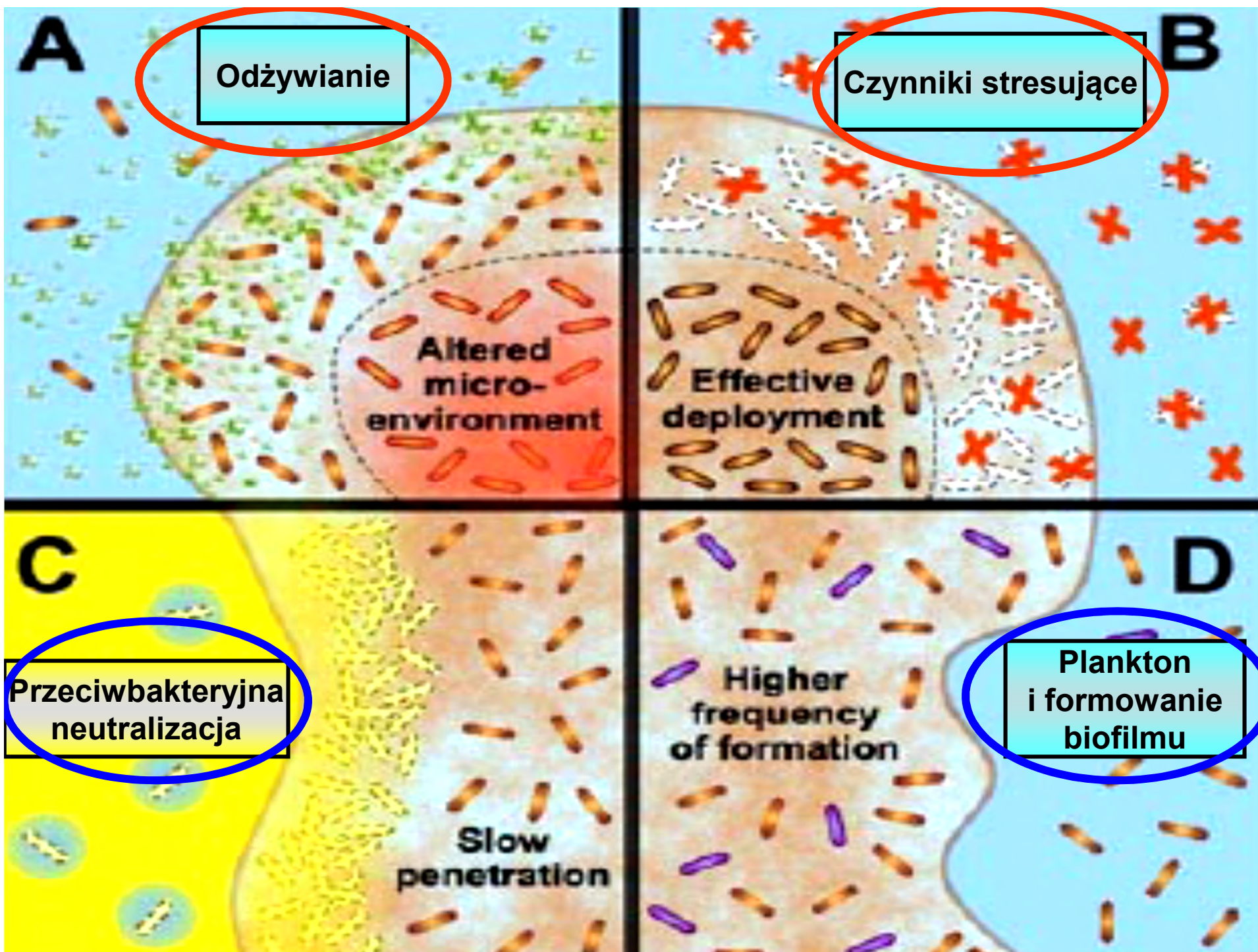
Do najbardziej niebezpiecznych gatunków bakterii biofilmu, z punktu widzenia przemysłowego, środowiskowego i medycznego, należy zaliczyć bakterie:

- *Escherichia coli* (w tym EHEC),
- *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp.,
- *Staphylococcus* sp., *Helicobacter pylori*,
- *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* sp.,
- *Salmonella* sp., *Cryptosporidium parvum*,
- *Legionella pneumophila*

Legionella w polisacharydowym śluzie



Kolonizacja wilgotnych powierzchni materiałów stałych

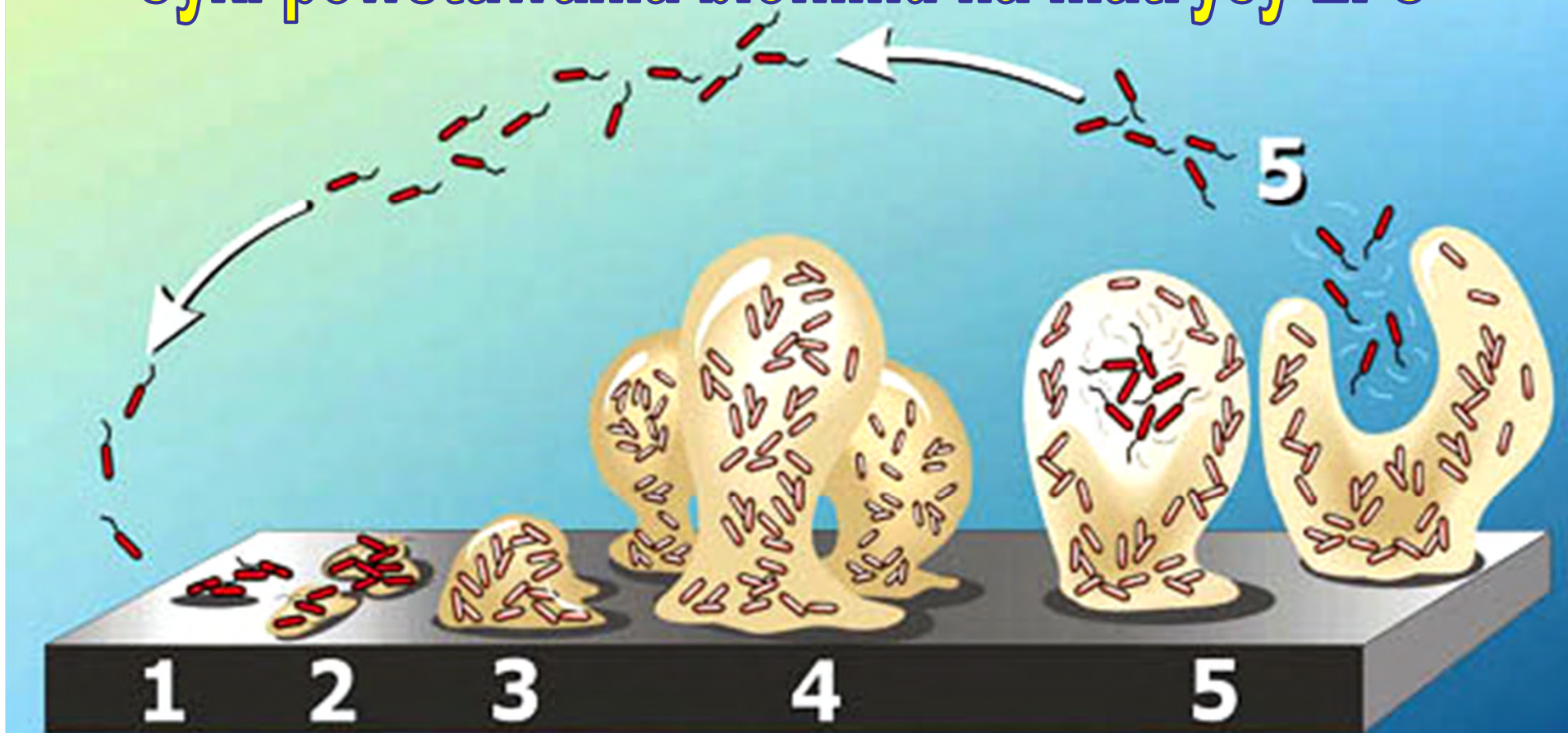


Cykl powstawania biofilmu na matrycy EPS

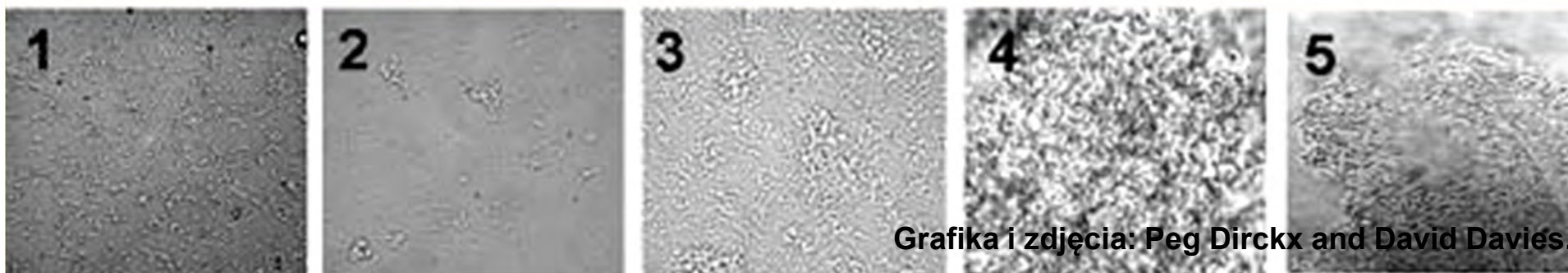
Proces formowania „dojrzełego” biofilmu obejmuje cztery stadia:

- 1. wstępna adsorbcja bakterii na powierzchni stałej,**
- 2. sekrecja EPS i nieodwracalna adhezja bakterii,**
- 3. kolonizacja bakterii, ich wzrost i powiększanie objętości biofilmu,**
- 4. proces dojrzewania biofilmu oraz powstawanie mikrokolonii,**
- 5. śmierć komórek i ich dyspersja do planktonu.**

Cykl powstawania biofilmu na matrycy EPS

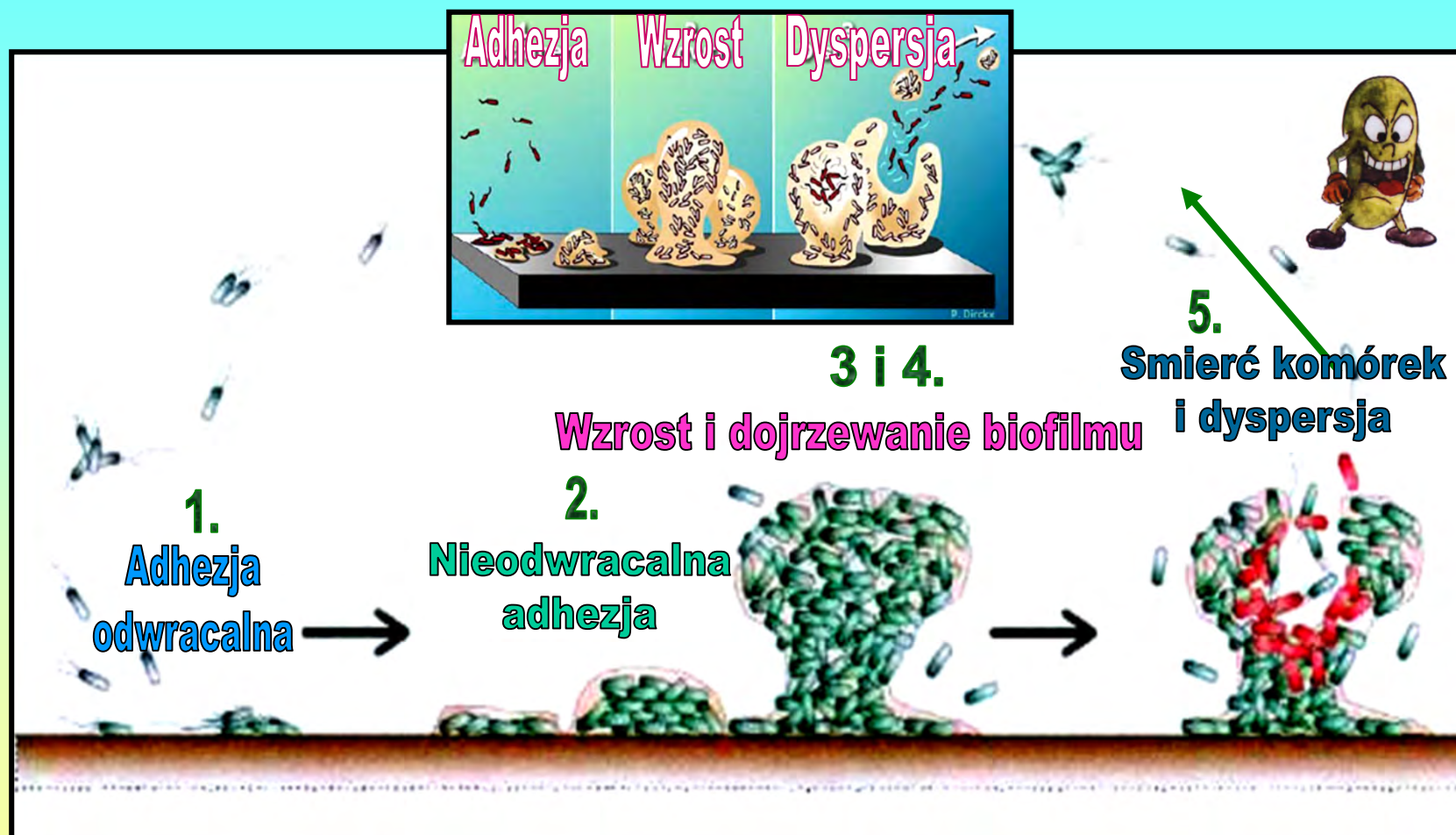


Typowy biofilm produkowany przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa*



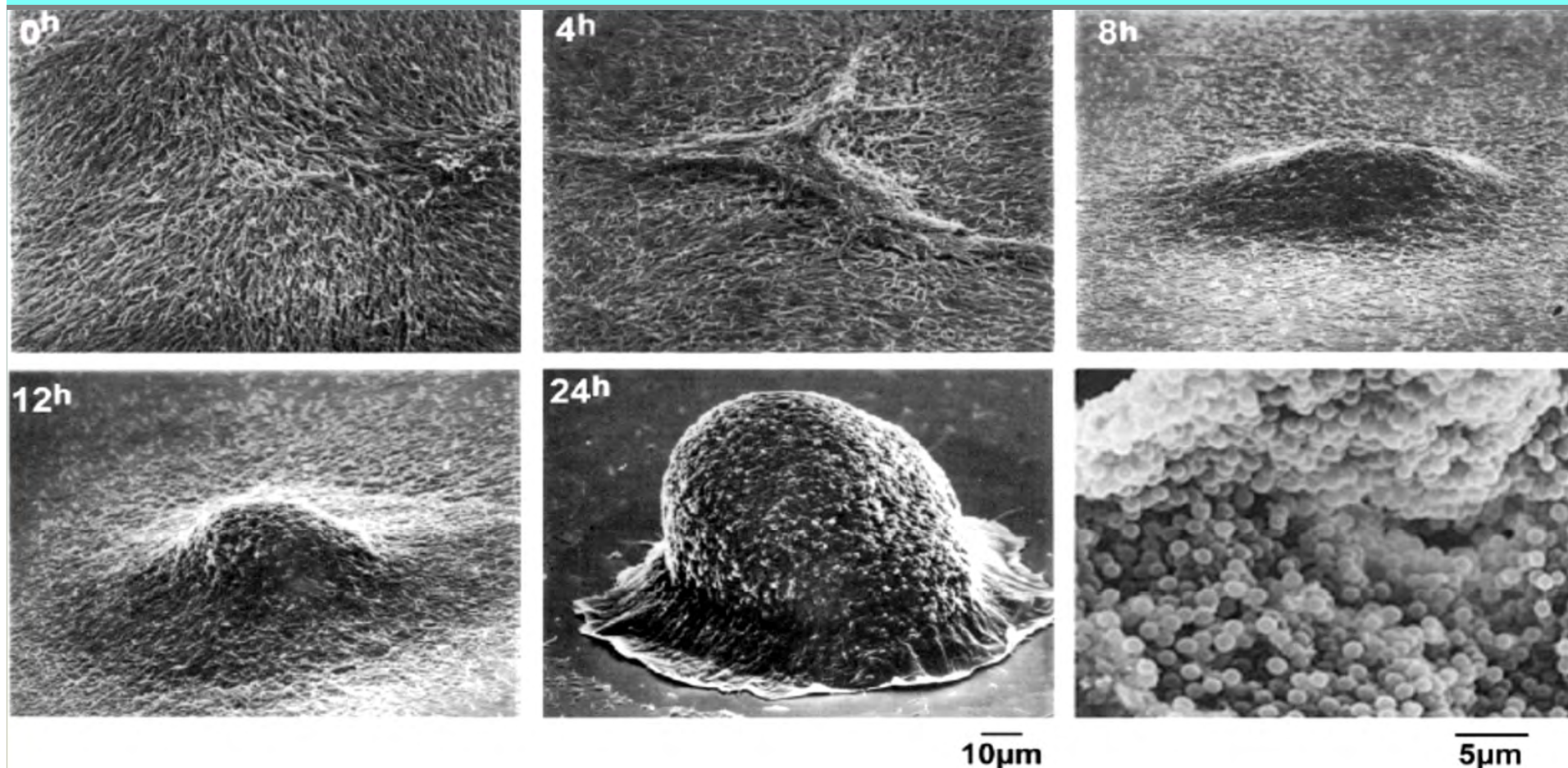
Grafika i zdjęcia: Peg Dirckx and David Davies.

Cykl powstawania biofilmu na matrycy EPS



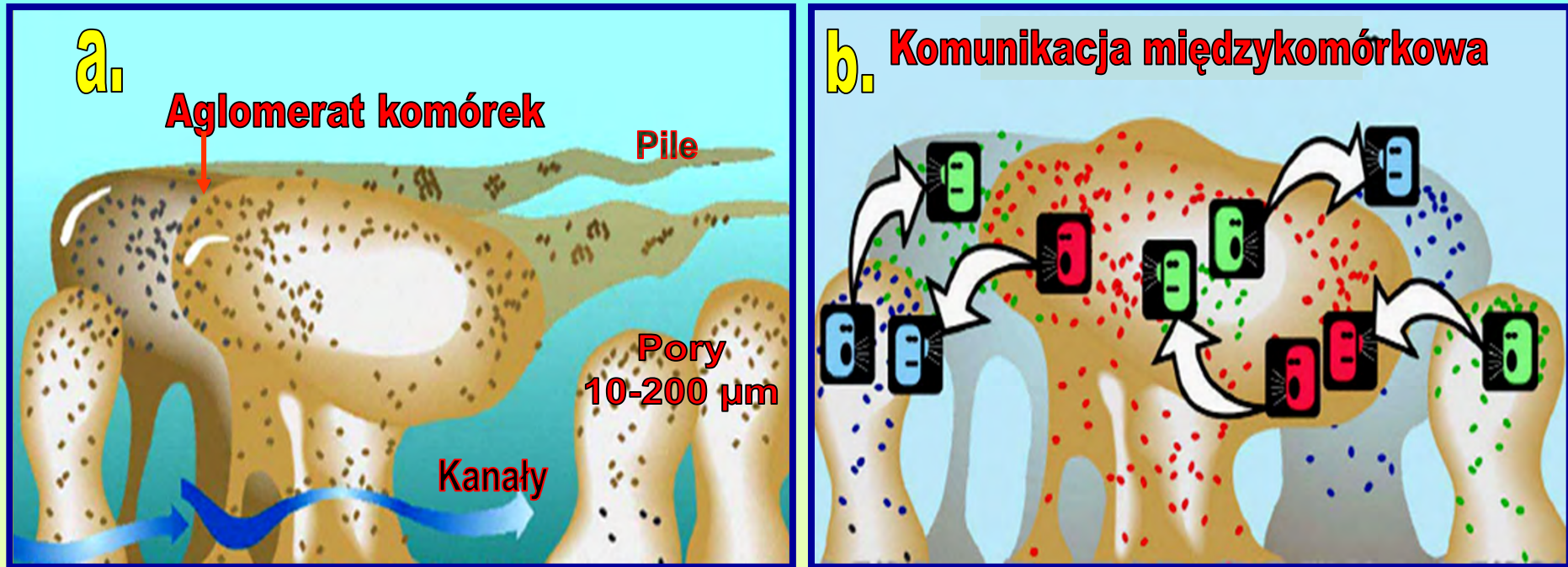
Cykl życiowy powstawania biofilmu, obejmujący cztery etapy (1 - 4) formowania i śmierć (Barraud, 2007).

Cykl powstawania biofilmu na matrycy EPS



Cykl powstawania dojrzałego biofilmu z udziałem *Myxococcus xanthus*

Formowanie i struktura biofilmu



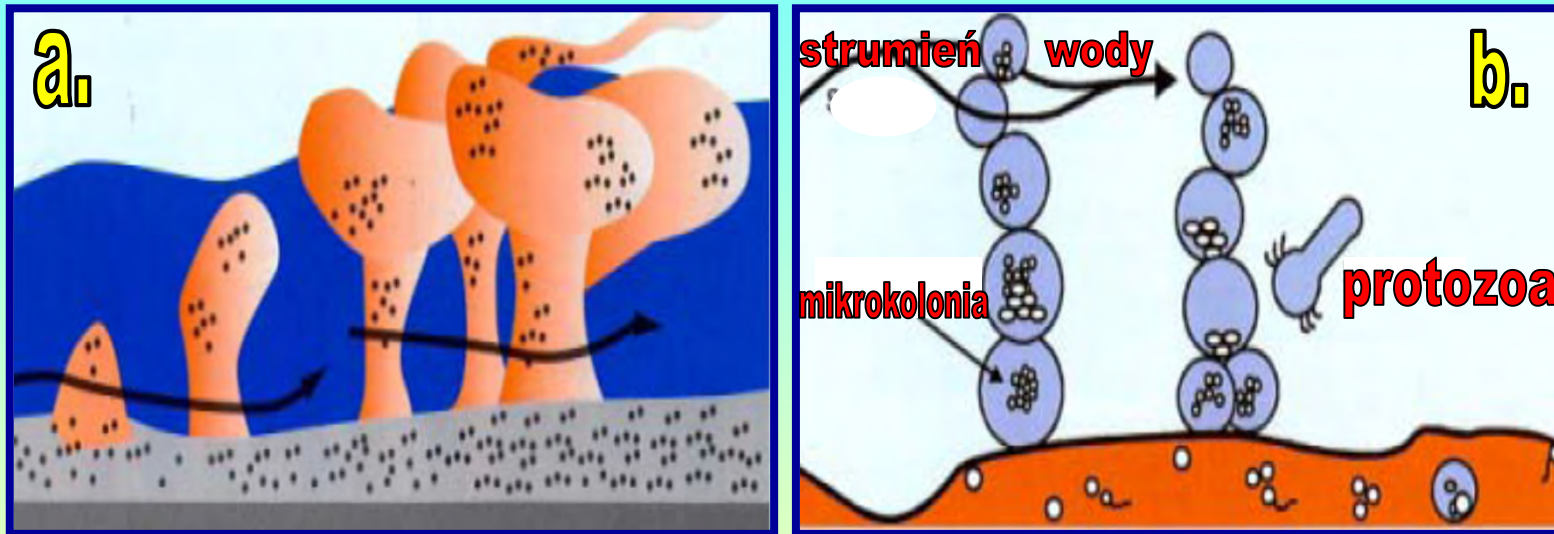
Diagramy przedstawiające zróżnicowaną strukturę biofilmu:

(a) z pilami, porami i formami w postaci grzyba, oraz

(b) sposób komunikacji między komórkami

w strukturze matrycy ESP

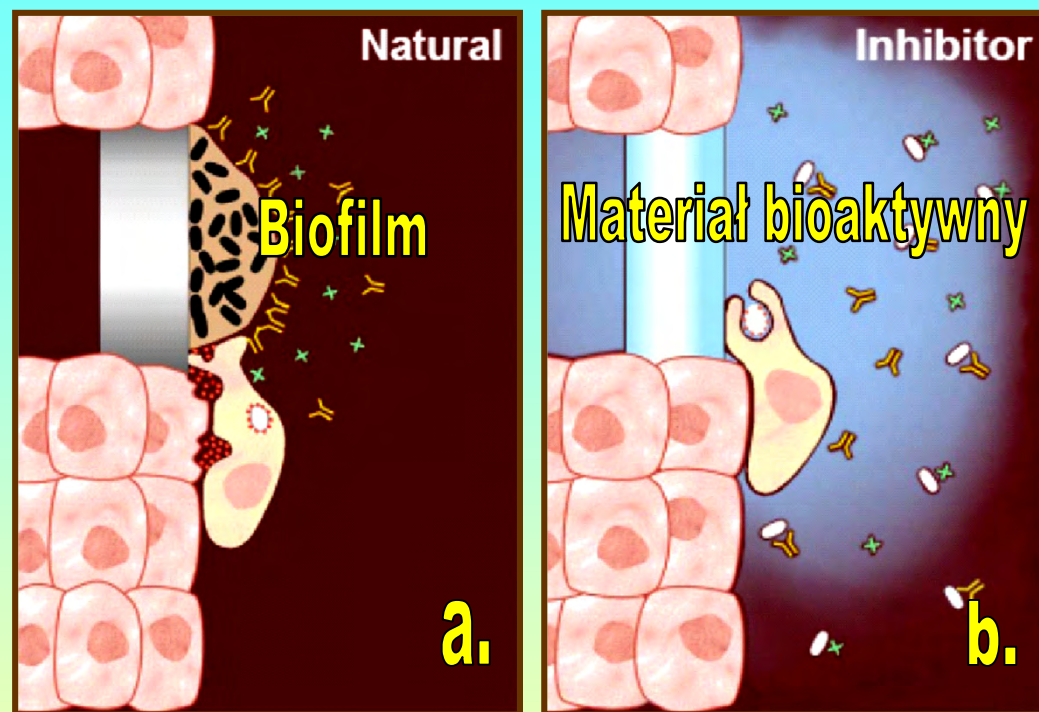
Struktura biofilmu a obecność substratów



Struktura biofilmu jest zależna od składu i ilości substratów:

- (a) Struktura biofilmu przy optymalnej zawartości substancji odżywczych dla mikroflory biofilmu;
- (b) Struktura biofilmu przy minimalnej ilości substratów dla mikroflory biofilmu

Formowanie biofilmu na materiałach konstrukcyjnych

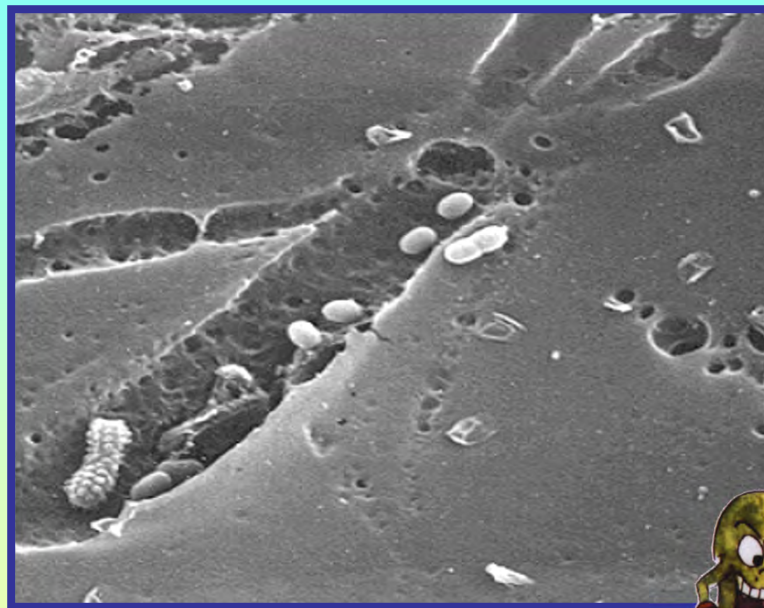
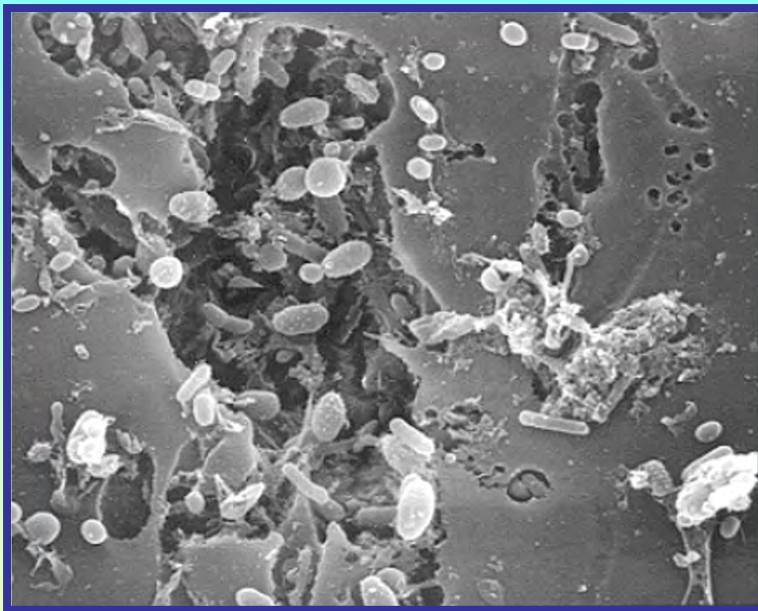


(Montana State University – Bozeman, 2002)

Model przedstawia element materiału:

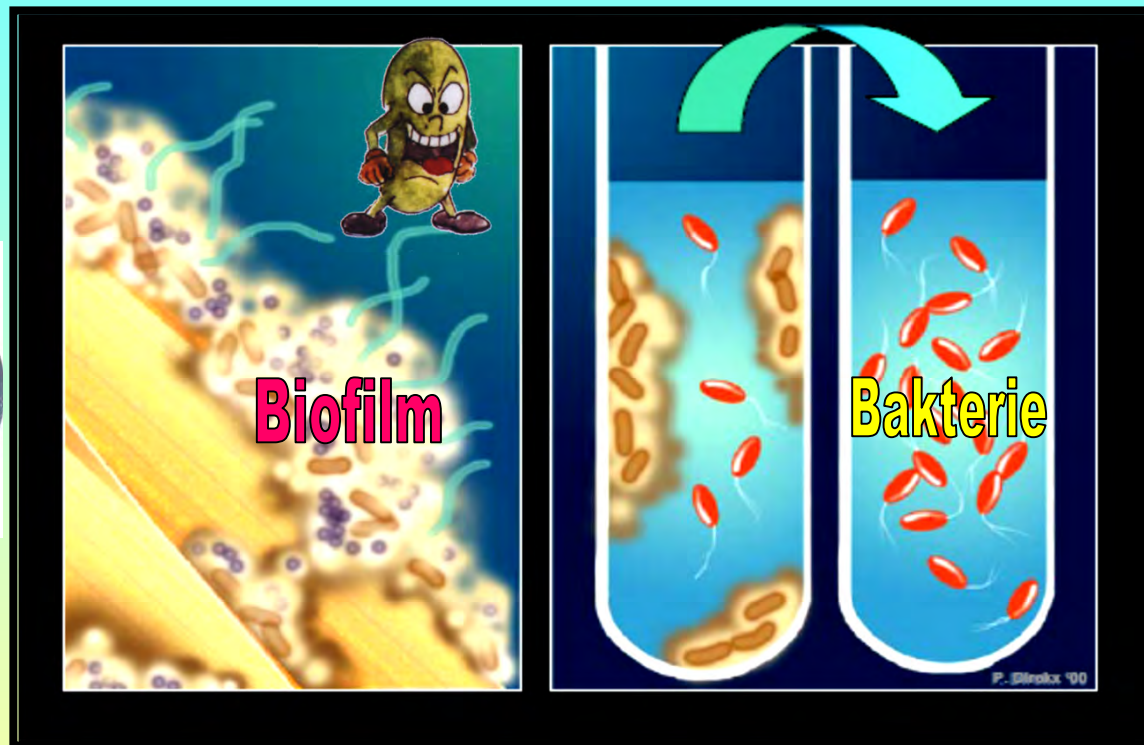
- (a). **tradycyjnego**, na którym osadza się biofilm trudny do usunięcia;
- (b). **bioaktywnego**, np. z nano-polimeru, na którym powstawanie biofilmu jest praktycznie niemożliwe, a bakterie zawieszone w planktonie, są łatwo dostępne dla inhibitorów

Niszczące działanie biofilmu



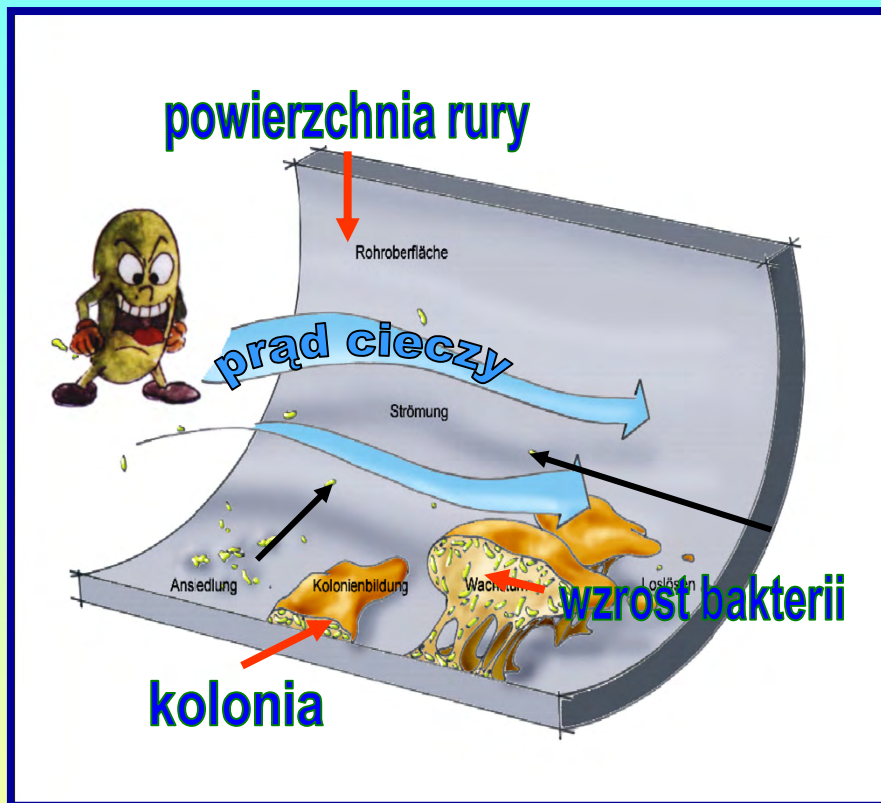
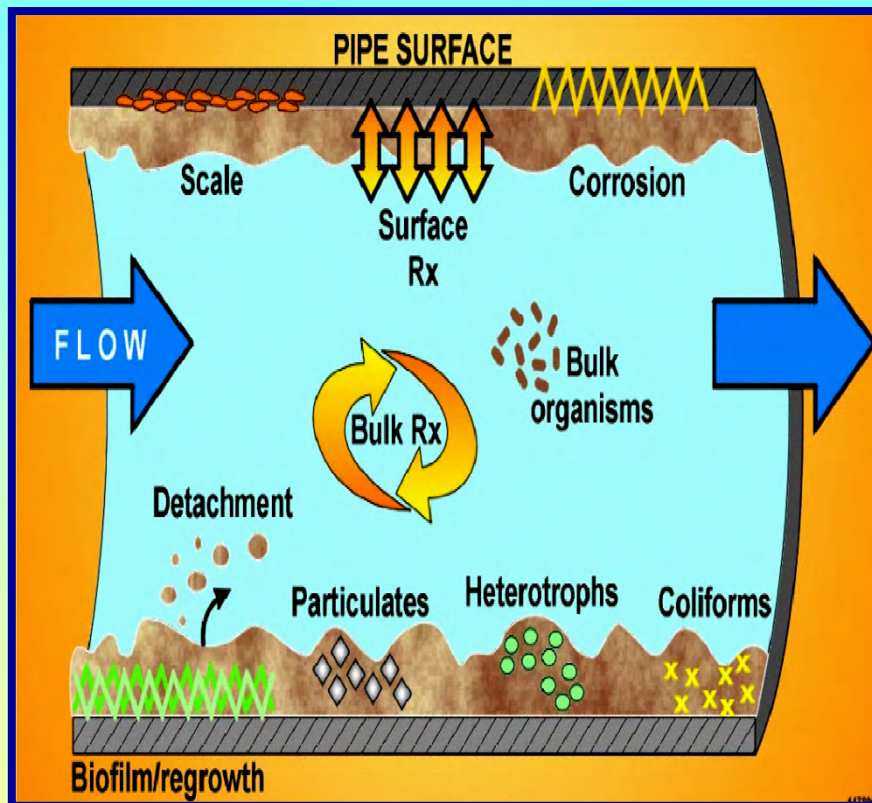
**Mikrobiologiczna degradacja membrany z octanu celulozy
przez bakterie tworzące biofilm; proces zachodzi
podczas odwróconej osmozy**

Oznaczanie poszczególnych bakterii w biofilmie

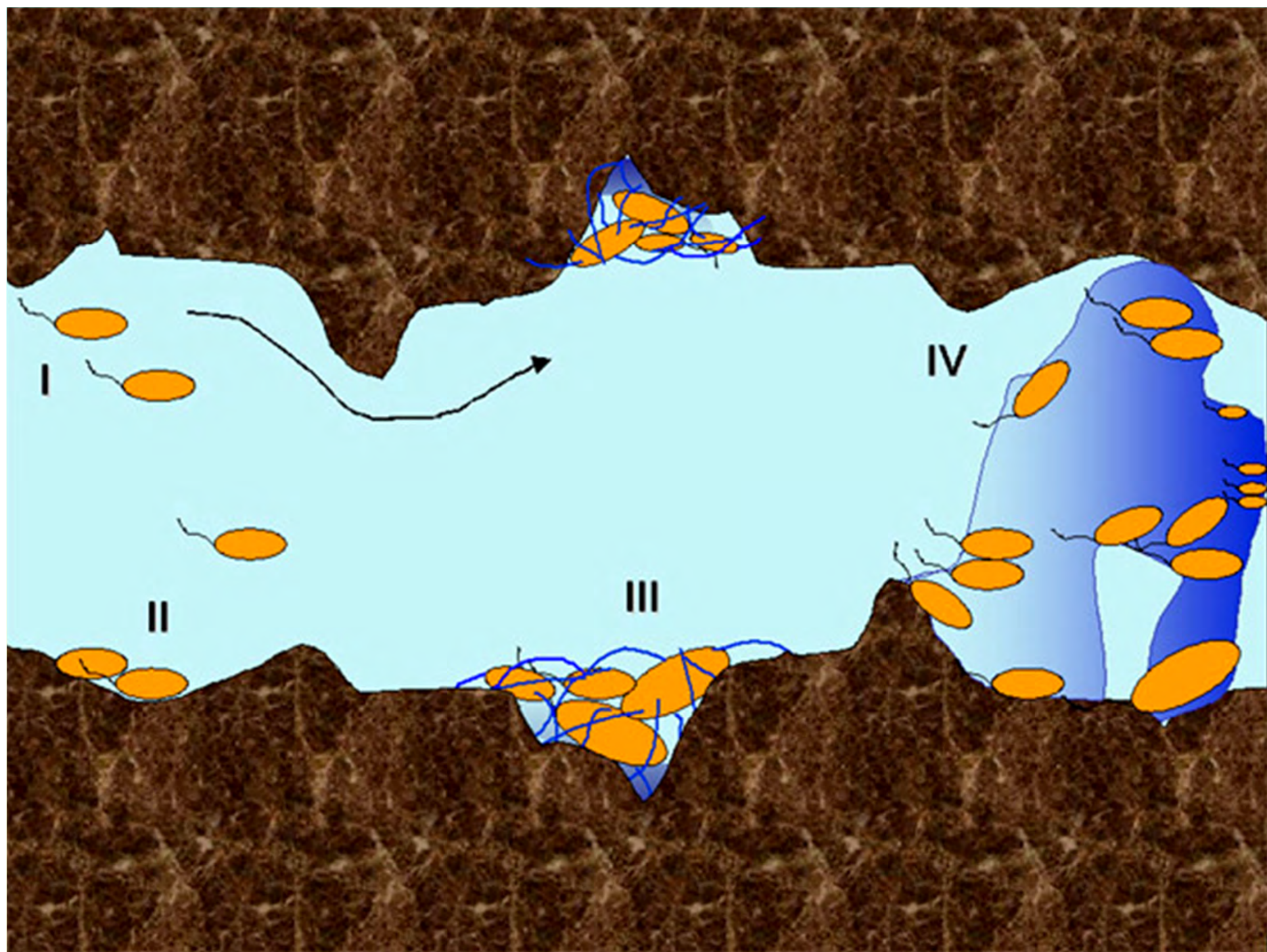


Metodą kolejnych rozcieńczeń i posiewów na podłoża agarowe można oznaczyć jedynie bakterie pozostające w roztworze (jako plankton); drobnoustroje egzystujące wewnątrz biofilmu są niemierzalne

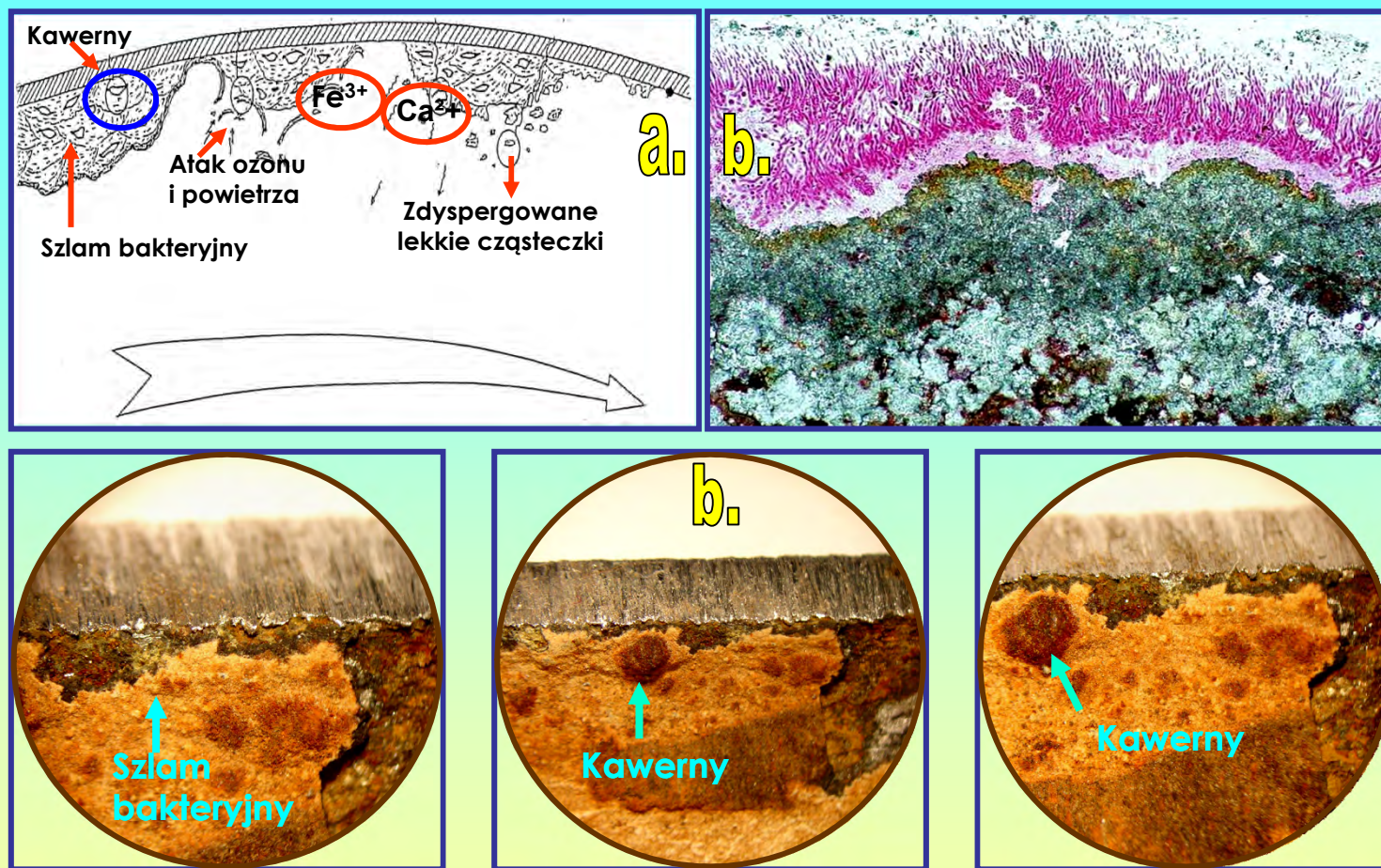
Biofilm w przemysłowej instalacji cieplnej



Tworzenie się biofilmu po wewnętrznej stronie rur w przemysłowej instalacji wodociągowej do ciepłej wody



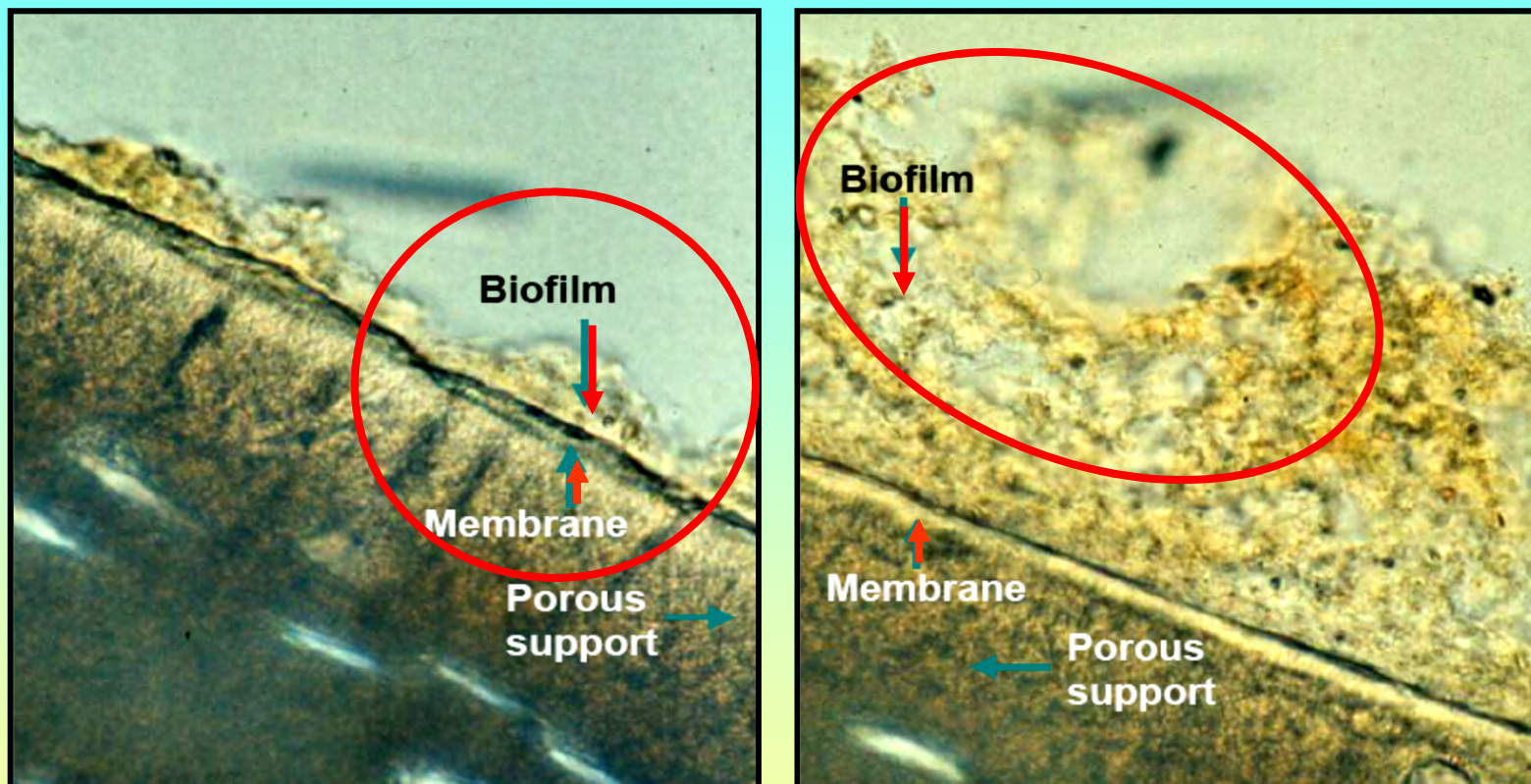
Formowanie i struktura biofilmu w instalacji ciepłej



Obraz wewnętrzny rury z instalacji ciepłej wody:

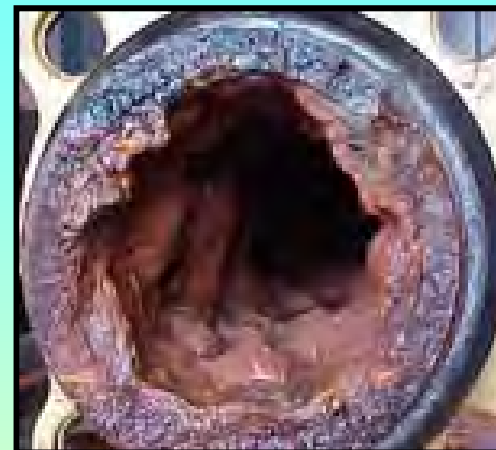
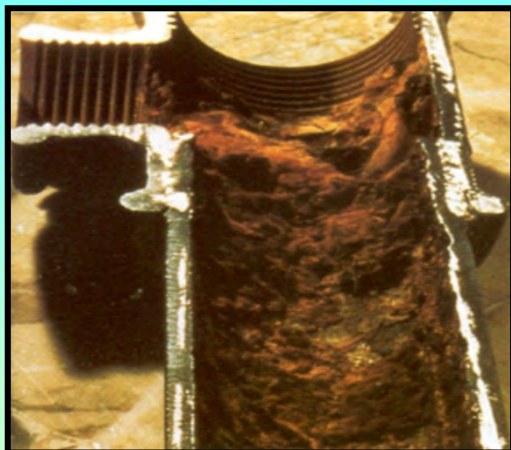
- (a) Schematyczny przekrój rury z biofilmem i minerałami,
(b) Zdjęcia wnętrza skorodowanej i obłożonej biofilmem rury
w systemie doprowadzającym ciepłą wodę (Photo: A. Salek)

Formowanie i struktura biofilmu w instalacji cieplnej

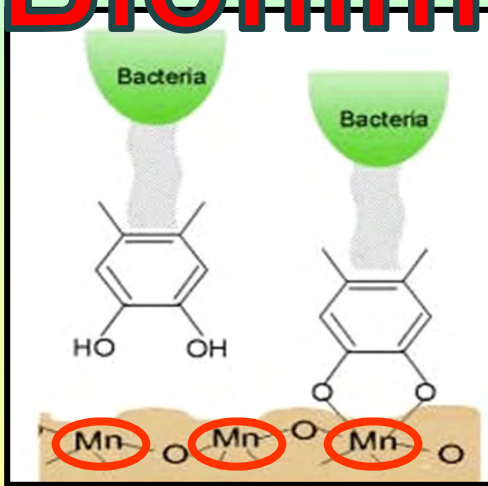


**Ukształtowanie biofilmu – przekrój poprzeczny;
ultracienki preparat biofilmu z powierzchni membrany**

Formowanie i struktura biofilmu w instalacji cieplnej

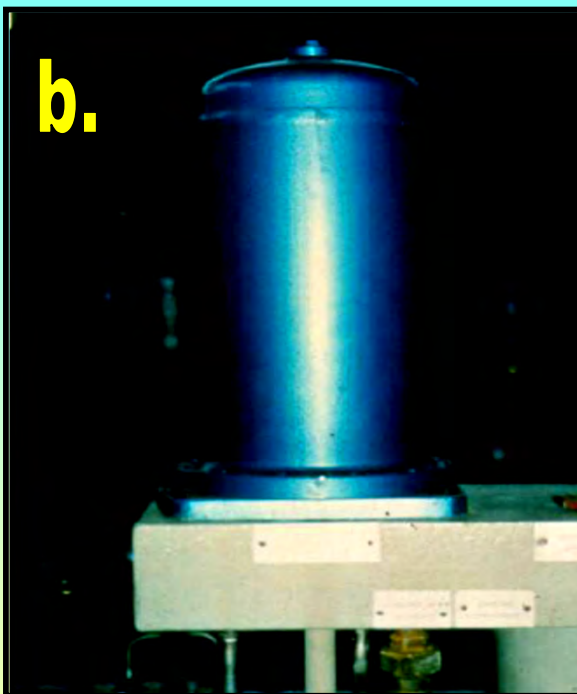


Biofilm



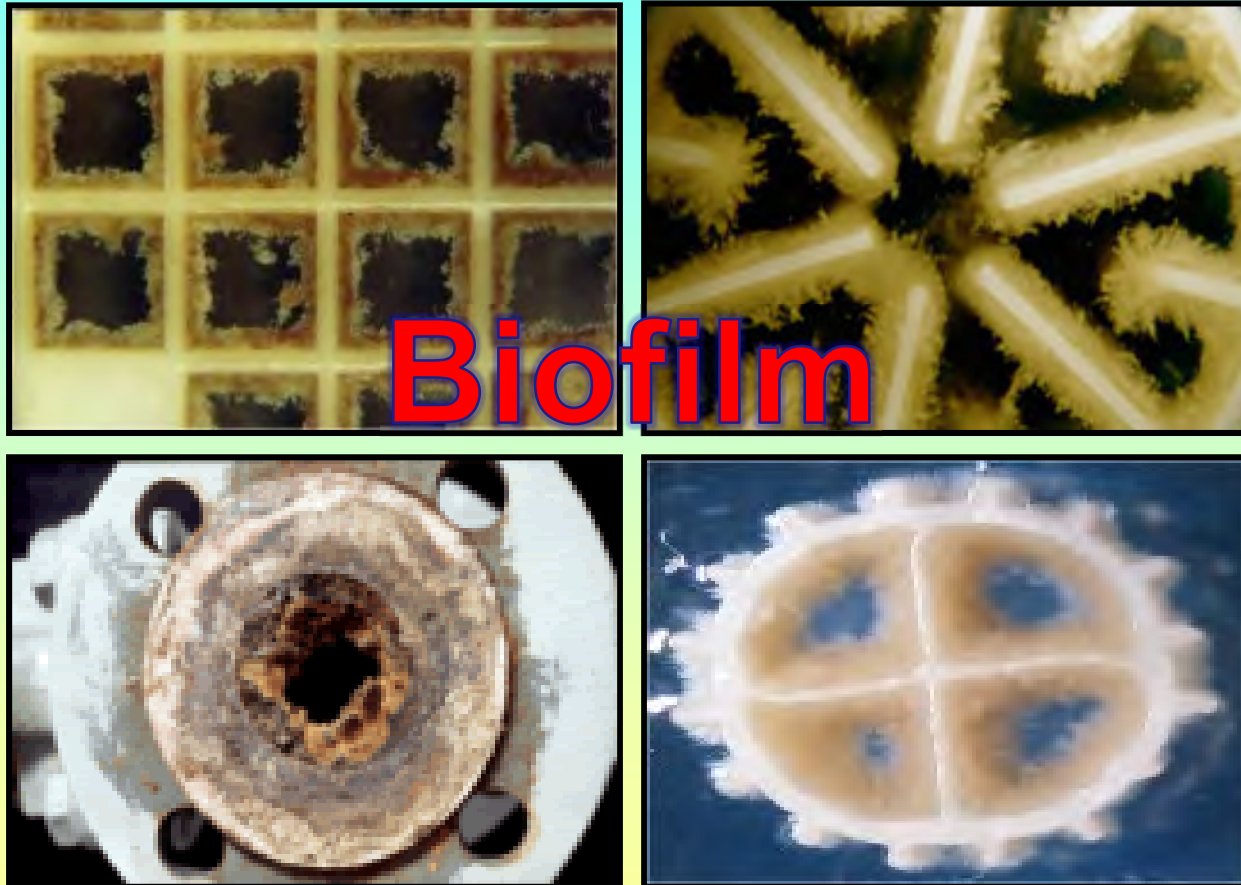
Biofilm w rurach przemysłowych, inkrustowany związkami mineralnymi, jak wapń, mangan lub magnez

Biofilm w instalacji chłodniczej i wymiennikach ciepła



**Biofilm na urządzeniach chłodniczych (a) i w wymiennikach ciepła (b),
znacznie inkrustowany kamieniem wodnym i skażony różnego
rodzaju bakteriami**

Rodzaje biofilmu w instalacji wodnej



Bakterie w biofilmie z instalacji browaru

Za kolonizację wilgotnych powierzchni odpowiedzialne są przeważnie bakterie z gatunku *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter frateurii*.

Ponadto wszechobecny jest szlam, zalegający szczególnie pewnego rodzaju nisze w instalacjach produkcyjnych, w których rozwijają się bakterie jelitowe, jak *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, drożdże *Rhodotorula sp.* i inne.

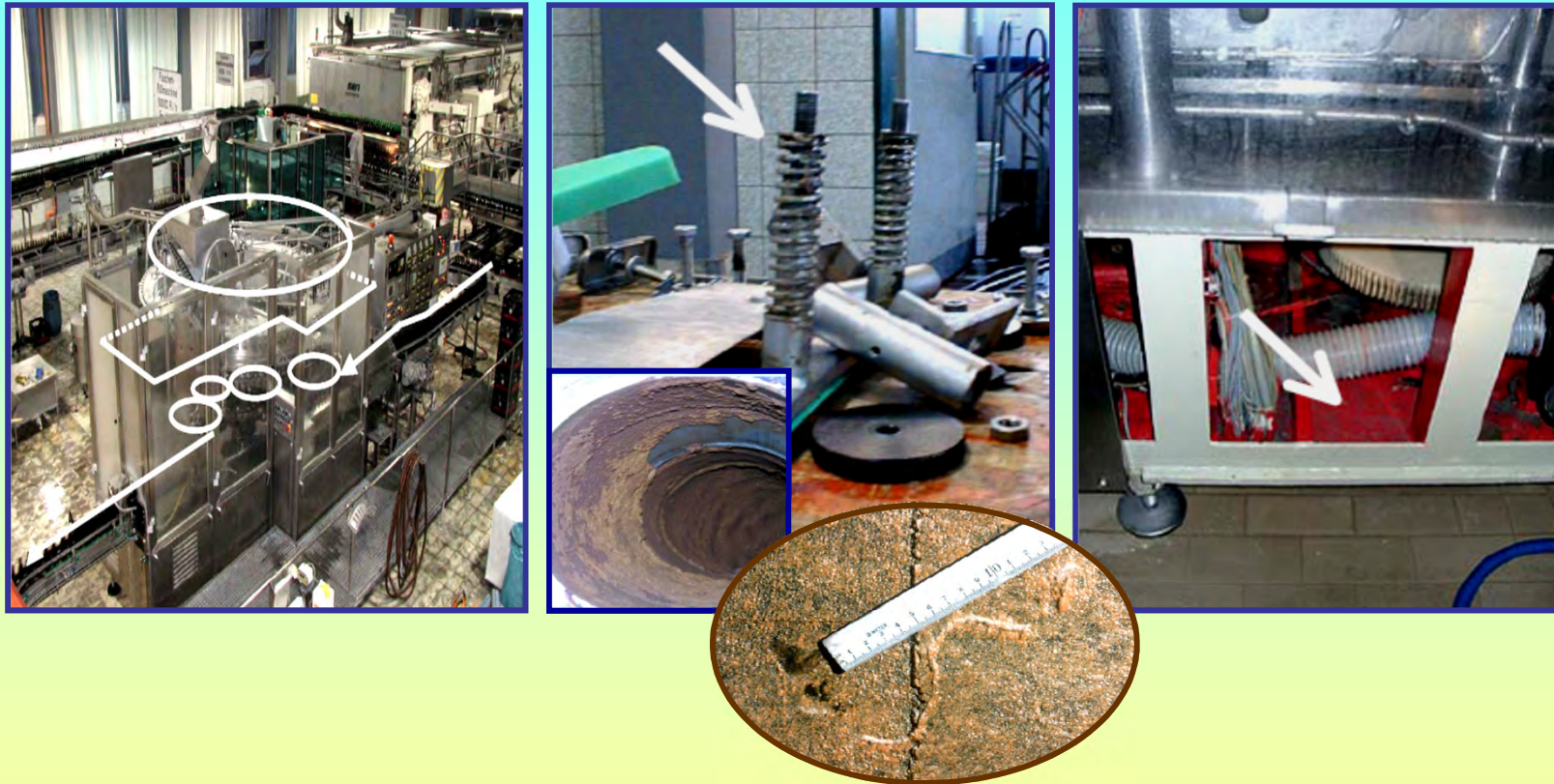
Następnie, osadzają się drożdże i pałeczki bakterii mlekowych.

Rodzaje bakterii w biofilmie z instalacji browaru

Największą grupą mikroorganizmów skażających piwo są bakterie z rodziny *Lactobacillaceae*, np. *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, beztlenowiec *Pectinatus* sp. oraz niektóre drożdże.

Interrelację tych mikroorganizmów z pozostałymi drobnoustrojami w biofilmie wspierają warunki acidofilne i beztlenowe, wytworzone przez proces technologiczny produkcji piwa.

Biofilm w instalacjach browaru



Działy rozlewni piwa: w instalacjach spotykany jest biofilm, częściowo skamieniały, ze stosunkowo dużym skażeniem bakteriami octowymi

Health hazards by biofilms:

Legionellosis

- Every case is proof of contact with an improperly managed water system
- Every case could have been prevented by applying practical scientific management principles
- Legionella are typical biofilm-related pathogens as they survive in protozoa which graze on biofilms



World Health Organization
Geneva

A close-up photograph of water droplets falling from a faucet. Several droplets are in focus, and many of them have two small yellow circles with black outlines added to them, giving them a cartoonish, face-like appearance. The background is a blurred, warm-toned surface.

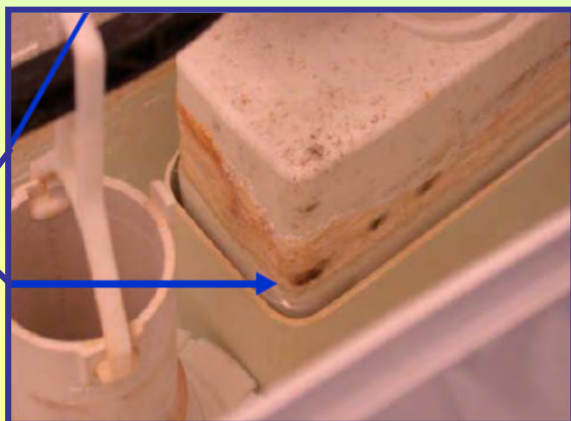
Legionella pneumophila
w aerozolu

Biofilm w sanitariatach

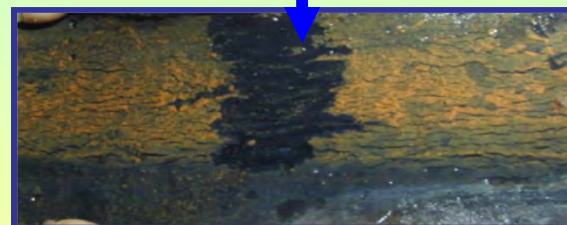
Biofilm

razem z kamieniem wodnym
w domowych urządzeniach
sanitarnych

Przewód doprowadzający ciepłą wodę
z osadzonym biofilmem



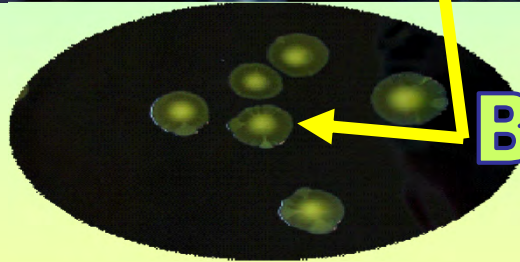
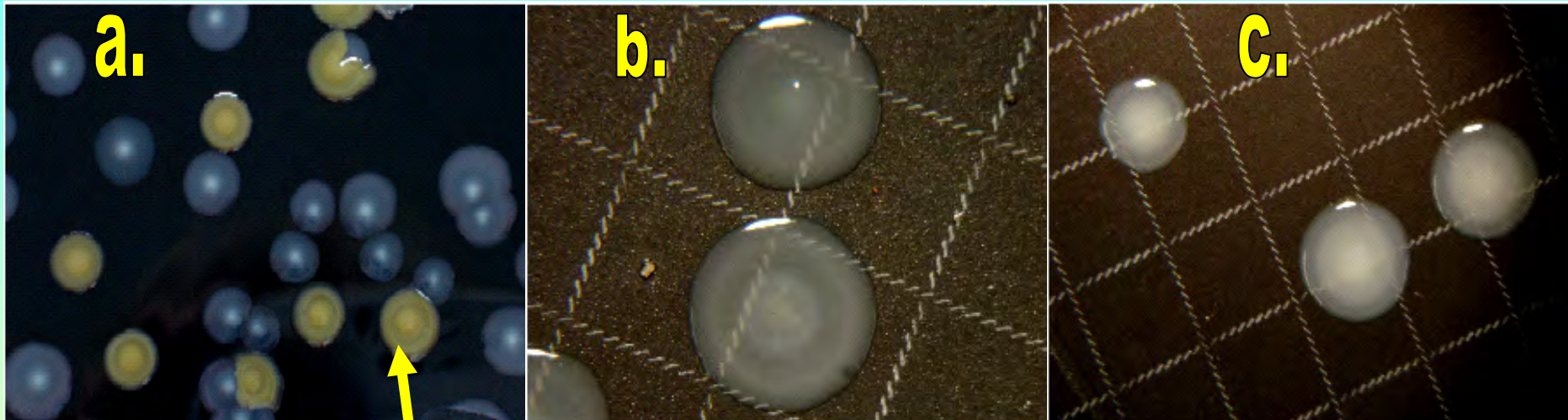
Biofilm





Legionella pneumophila serogrupa 1

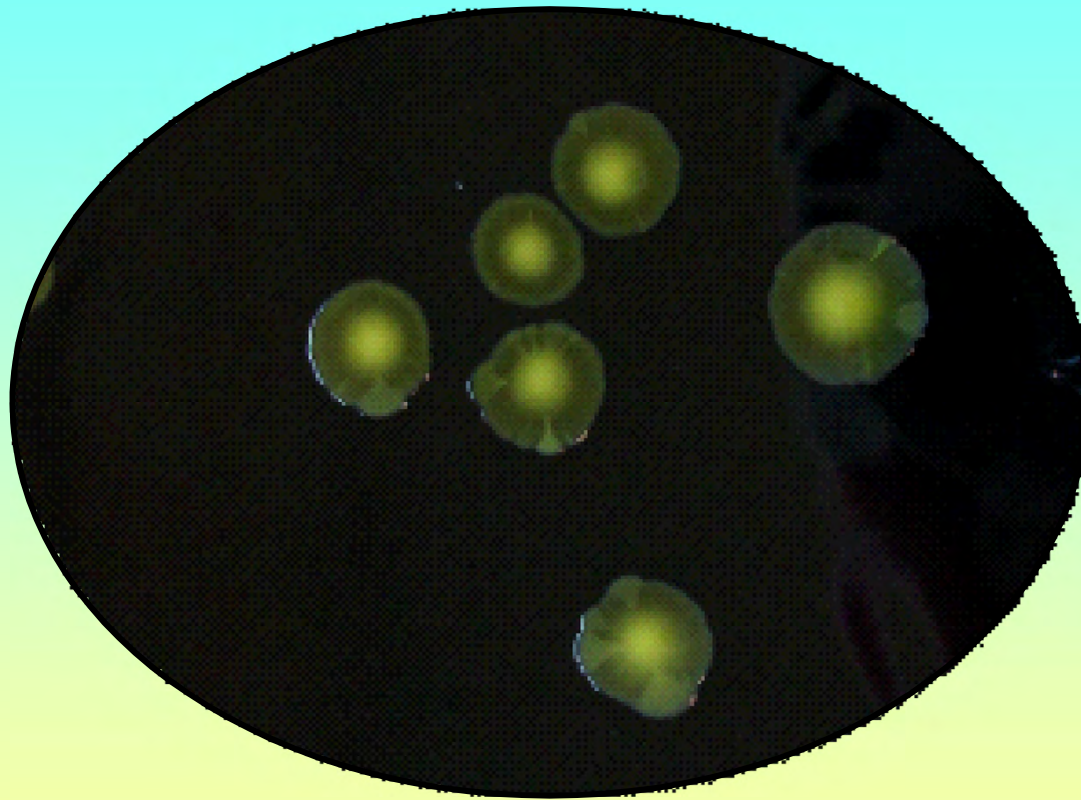
Grupy serologiczne *Legionella pneumophila*



Bakterie non - Legionella

Legionella pneumophila: (a) serogrupa 1 na podłożu selektywnym GVPC,
(b) serogrupa 1 na czarnym filtrze celulozowo-octanowym i na GVPC
(c) *L. pneumophila* serogrupa 2 - 15 również na czarnym filtrze
celulozowo-octanowym i na GVPC medium agarowym (Photo: A. Salek)

Bakterie non - Legionella pneumophila



**Wzrost na selektywnym podłożu GVPC z antybiotykami
(gentamycyną, vankomycyną, polimyksyną i cycloheximidem)**

Legionella sp. w browarnictwie

**W browarnictwie, z bakteriami *Legionella*
spotkać się można wówczas,
gdy klasyczny proces technologiczny
poddany jest modernizacji
wg nowych trendów,
np. podczas suplementacji brzeczek
związkami mineralnymi, m.in. Zn^{+2}**

Legionella sp. w browarnictwie

Ponadto, jakość i skład chemiczny wód technologicznych warunkuje potencjał zagrożenia bakteriami *Legionella* i innymi pałeczkami Gram-ujemnymi.

Wynika to z faktu specyficznych zapotrzebowań i właściwości fizjologicznych, np. *Legionella* na związki mineralne, szczególnie na jony

Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} i inne.

Legionella sp. w browarnictwie

W przeciwieństwie do bakterii *Legionella*, wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, również występujących w biofilmie, jest stymulowany przez następujące metale:

Fe^{+3} , Ca^{+2} , Mg^{+2} i Zn^{+2} .

W tabeli poniżej podane są maksymalne, nieinhibujące stężenia w.w. metali dla bakterii z biofilmu.

Metal	Związek	Stężenie związku	
		mg/litr	mM
Wapń	CaCl_2	12,0	0,194
Miedź	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,006
Zelazo	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	228,0	0,820
Magnez	MgSO_4	1662,0	13,804
Mangan	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	43,0	0,217
Cynk	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	200,0	0,696

Legionella sp. w browarnictwie

Istnieje ryzyko, że zbyt duża zawartość żelaza w wodzie technologicznej może sprzyjać rozwojowi bakterii *Legionella pneumophila* i tworzeniu się biofilmu w instalacjach ciepłej wody.

Suplementacja brzeczek jonami Zn^{+2} , czy Cu^{+2} wspiera system enzymatyczny bakteryjnych dysmutaz, ochraniając bakterie *Legionella pneumophila*, przed wolnymi rodnikami.



Legionella sp. w browarnictwie

Jony Zn^{+2} , niezależnie od bioaktywności w dysmutazach, odgrywają ważną rolę w mechanizmie adsorpcji *Legionella* do powierzchni innych mikroorganizmów, rozwijających się w biofilmie. Wiąże się to z systemem receptorowym *Legionella pneumophila* i wzmożoną, w wyniku podwyższonej koncentracji jonów Zn^{+2} , zdolnością adhezyjną w stosunku do innych komórek.



Legionella sp. w browarnictwie

Natomiast miedź sama w sobie, jako metal, jest **doskonałym inhibitorem wzrostu bakterii *Legionella pneumophila*** i innych patogenów, co jest ważnym aspektem w browarach, gdyż do dziś wiele z nich jest wyposażone w urządzenia, m.in. kadzie fermentacyjne, których głównym materiałem jest miedź.





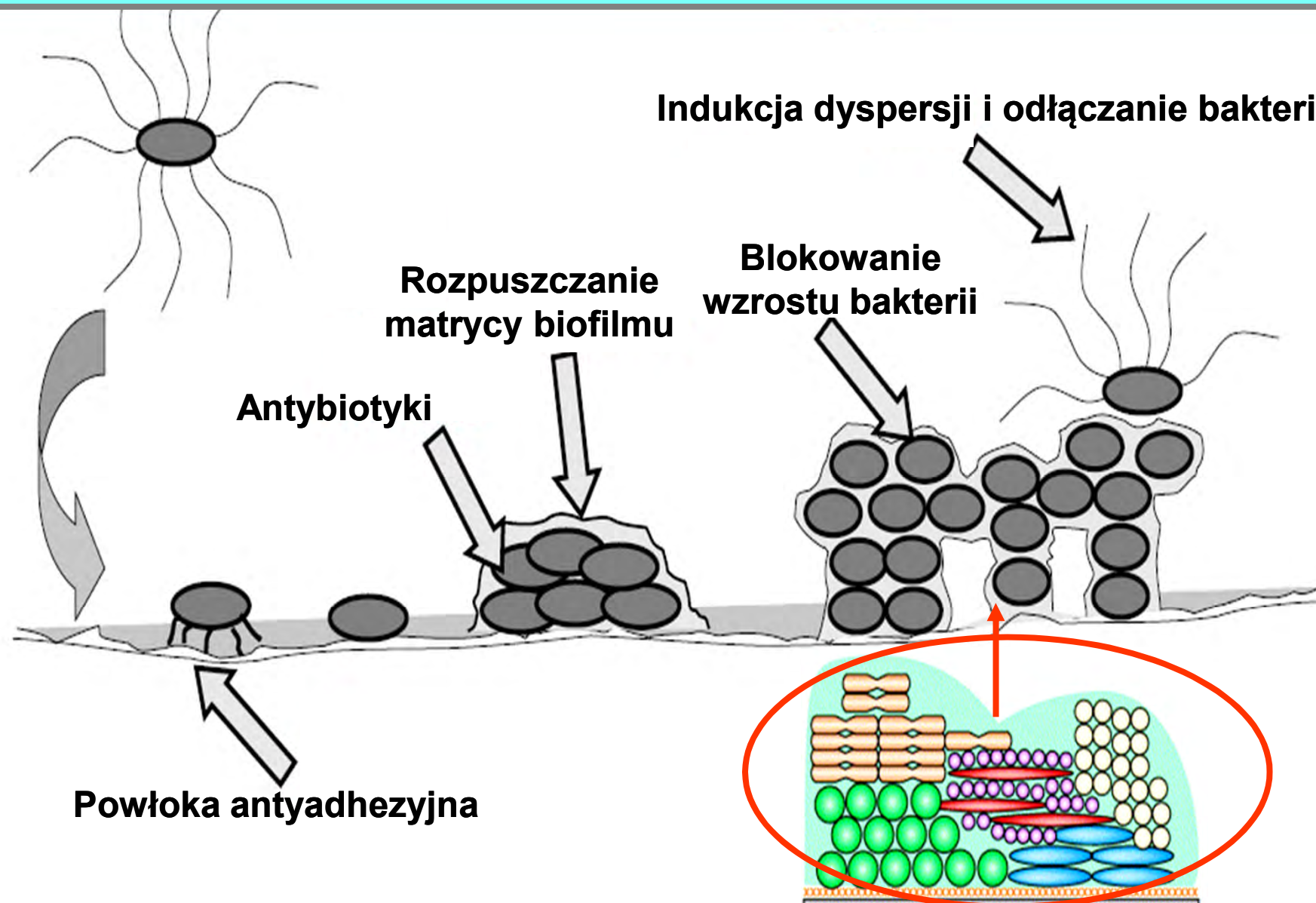
Jony miedzi i srebra likwidują bakterie Legionella

Bakterie *Legionella* można likwidować w przepływie, instalując na rurach z cyrkulacją ciepłej wody system jonizacyjny, składający się z dwóch elektrod miedzianych i z dwóch elektrod srebrnych.

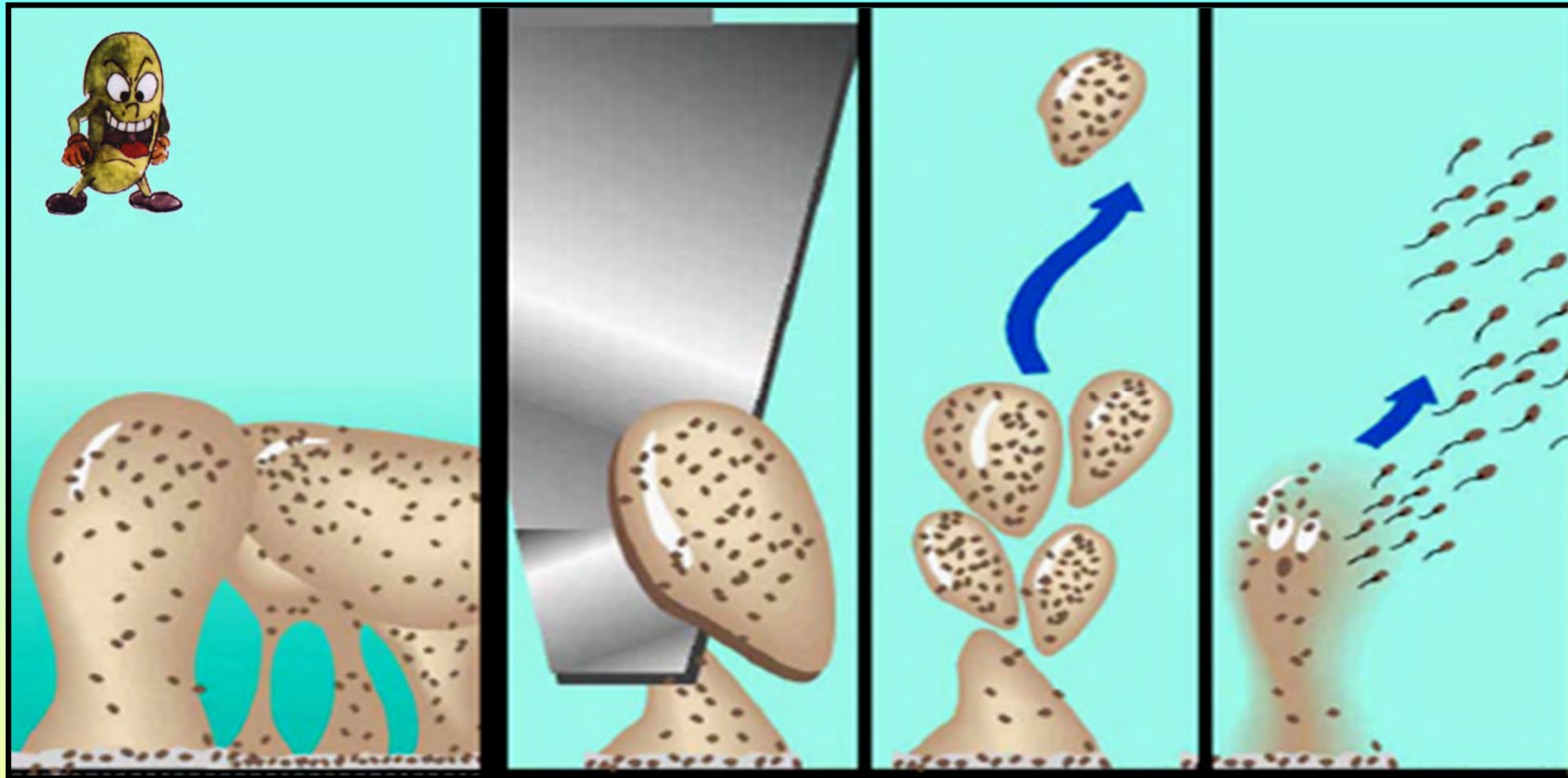
Jony miedzi, lokujące się na powierzchni membrany osłabiają komórki *Legionella*, a jony srebra, przenikające do wnętrza komórki, doprowadzają bakterie do ich lizy.



Strategie zapobiegania formowania biofilmu

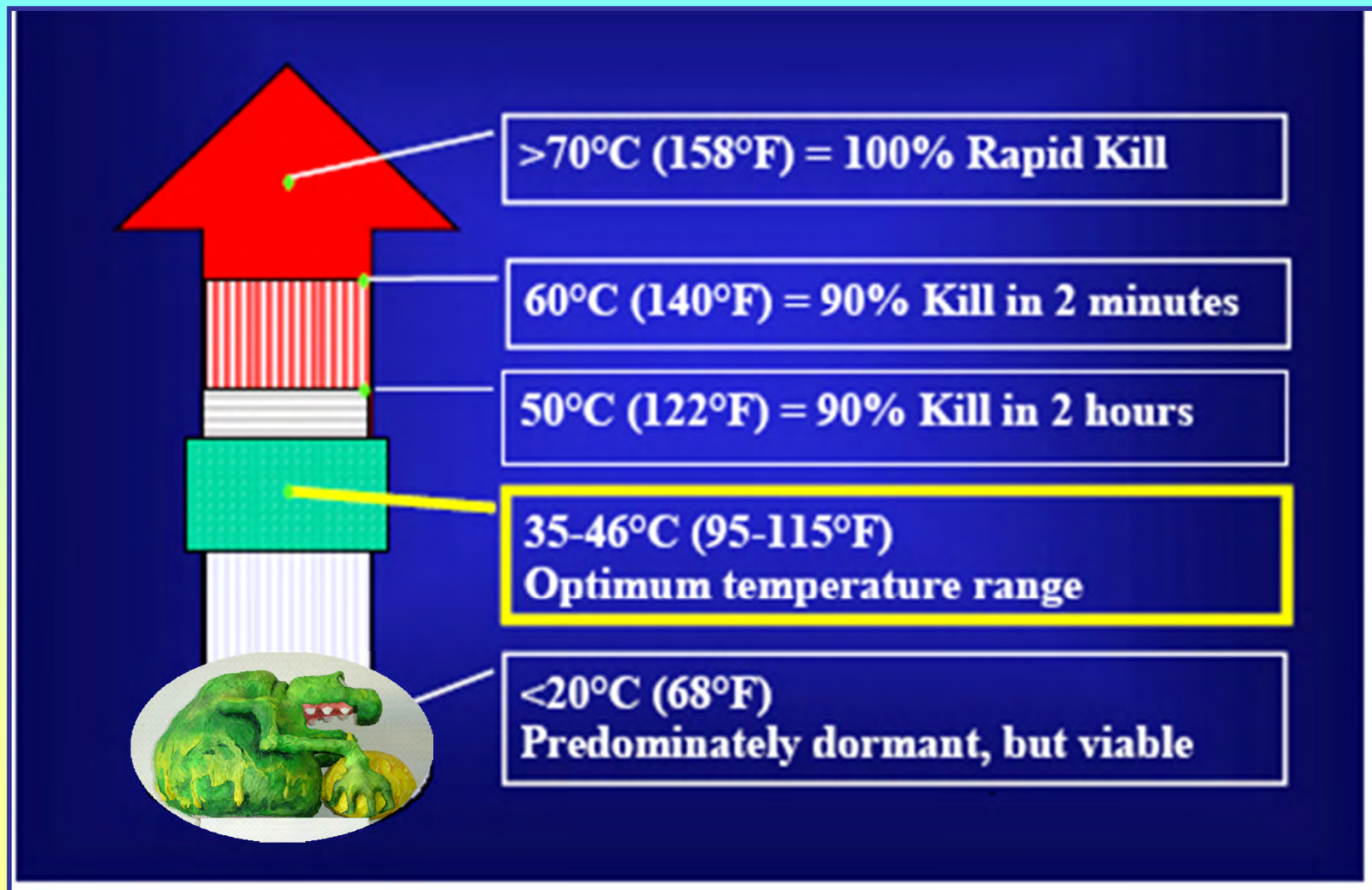


Mechaniczne usuwanie biofilmu



Mechaniczne rozbicie biofilmu w następstwie czego zachodzi dyspersja biofilmu i powrót bakterii do planktonu

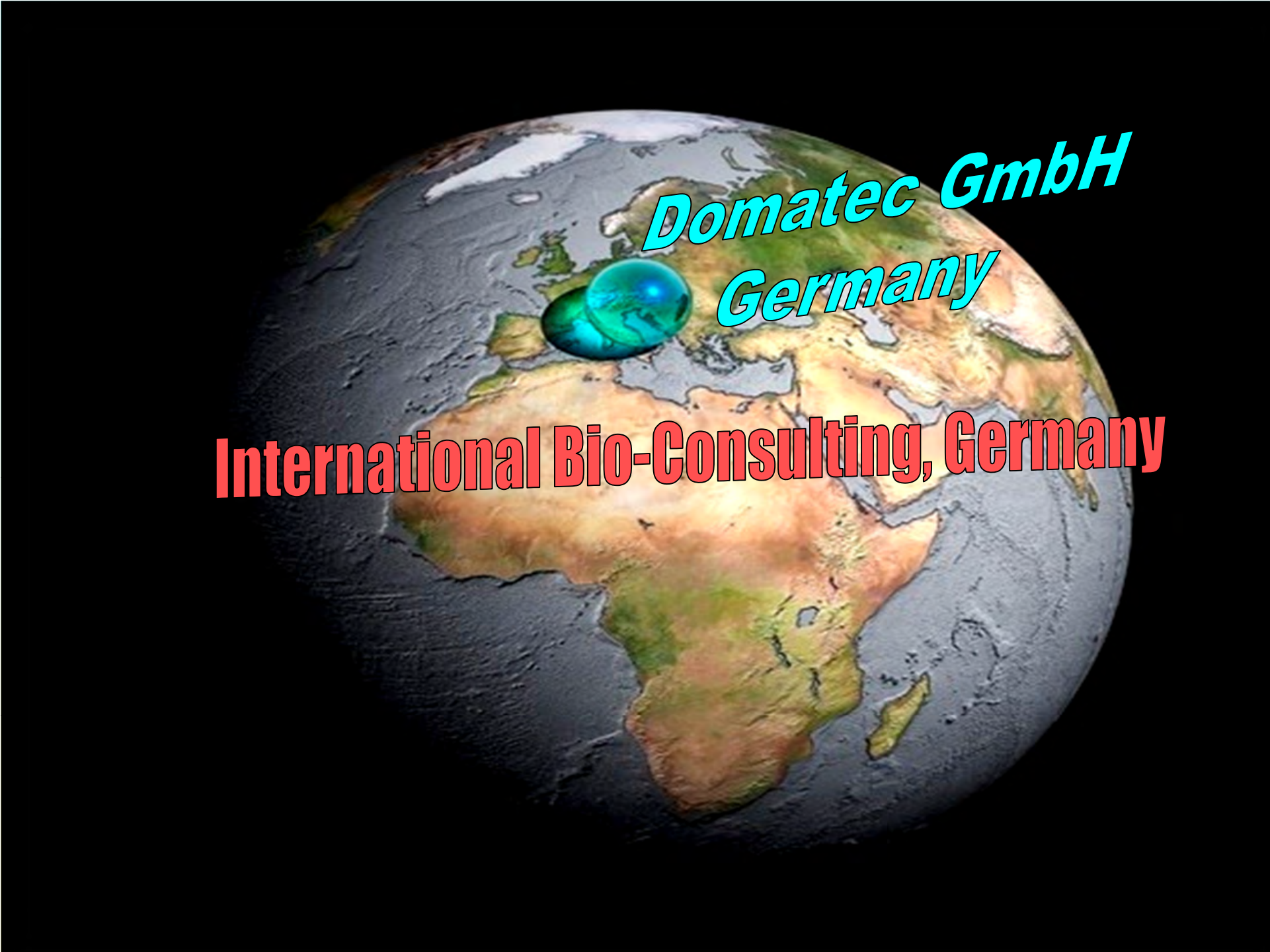
Wpływ temperatury na żywotność *Legionella pneumophila*



Dziękuję za uwagę!



Legionella



Domatec GmbH
Germany

International Bio-Consulting, Germany