

# Biofilmek (élelmiszeripari vízrendszerekben)

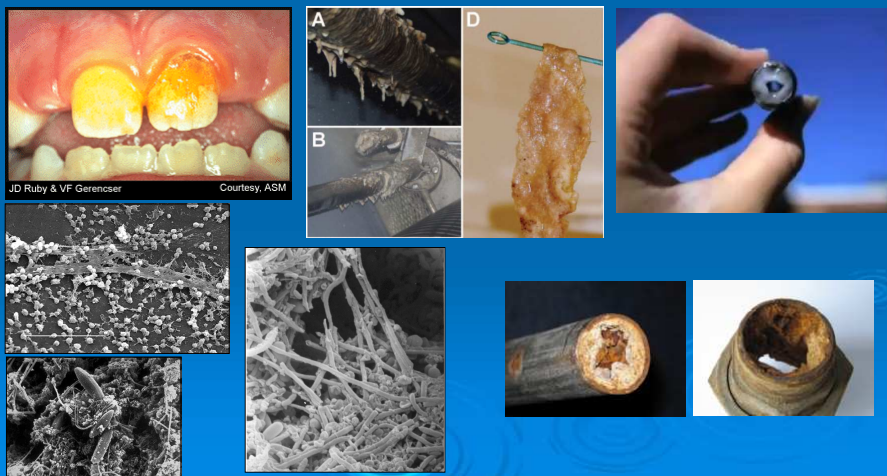
Lippai Dénes

Legenda Sörfőzde

2017.01.21.

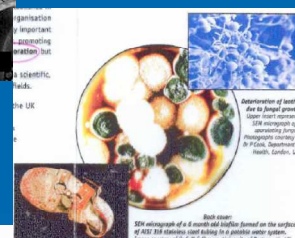
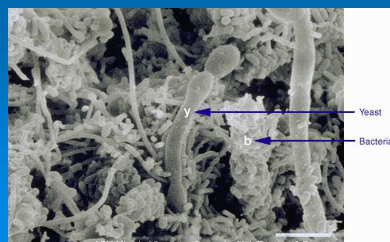
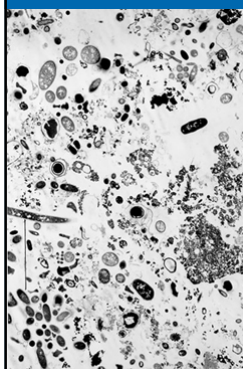
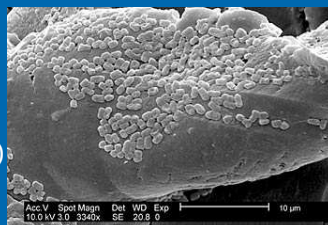
## Mik a biofilmek?

A biofilmek szilárd felszíneket bevonó mikro-  
organizmusok gyűjteménye rendszerint bakteriális eredetű  
szerves polimer mátrixba ágyazva.



# BIOFILM-KÉPZŐ MIKROBÁK

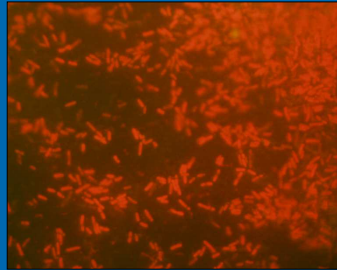
1. Baktériumok
2. Penészgombák
3. Élesztők
4. Vírusok (enterovírusok)
5. Bakteriofágok
6. Protozoák



„A mikrobiális biofilm egy szubsztrátum (anyag) felületén immobilizálódott baktériumtömeg, rendszerint bakteriális eredetű szerves polimer mátrixba ágyazva. Ezek a biofilmek ubikviterek a vizes környezetben, térben és időben nem egyenletesek, és idegen eredetű szerves és szervetlen anyagokat is tartalmazhatnak. Az így jellemzett „klasszikus biofilm” kialakulásához rendszerint 2-4 hét szükséges.”

(Marshall, 1992)

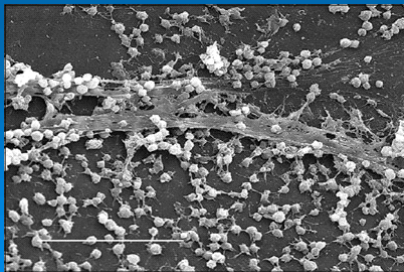
*L. monocytogenes*  
biofilm



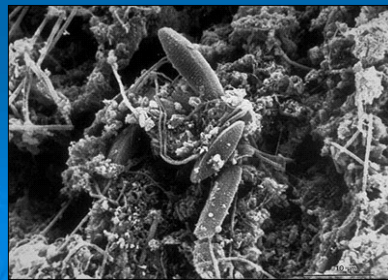
Kevert biofilm



Biofilm orvosi eszközön



Biofilm vízrendszerben



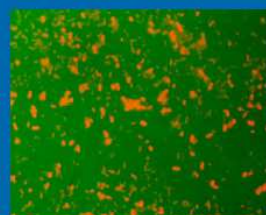
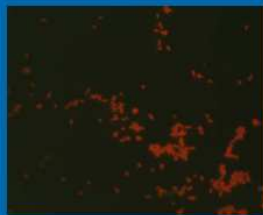
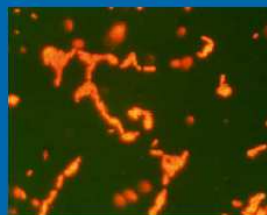
## Vegyes biofilm képzés – 2 órás, 1 hetes

*P. aeruginosa*

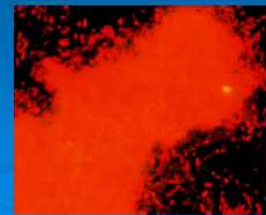
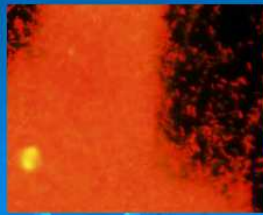
*E. coli*

*P. aeruginosa* + *E. coli*

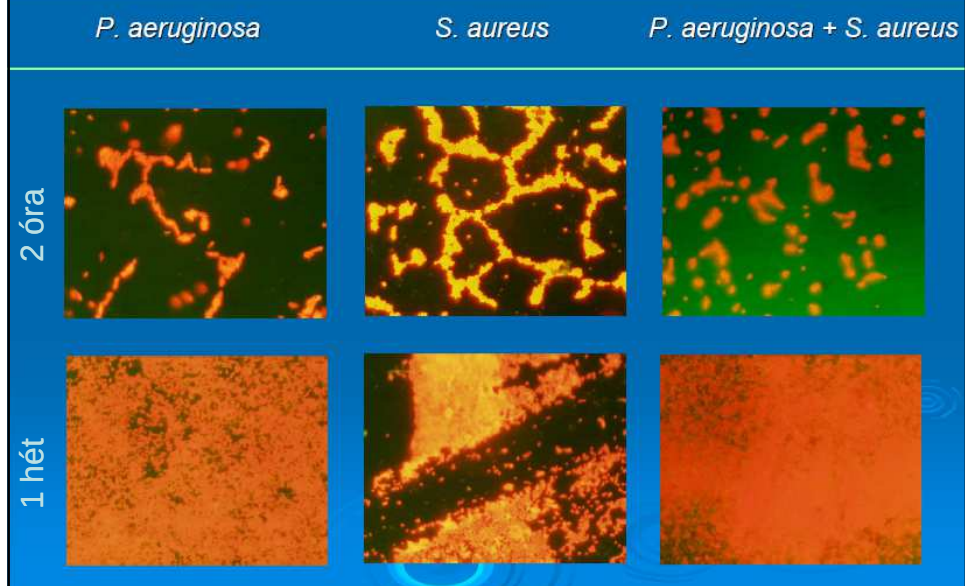
2 óra



1 hét



## Vegyes biofilm képzés – 2 órás, 1 hetes

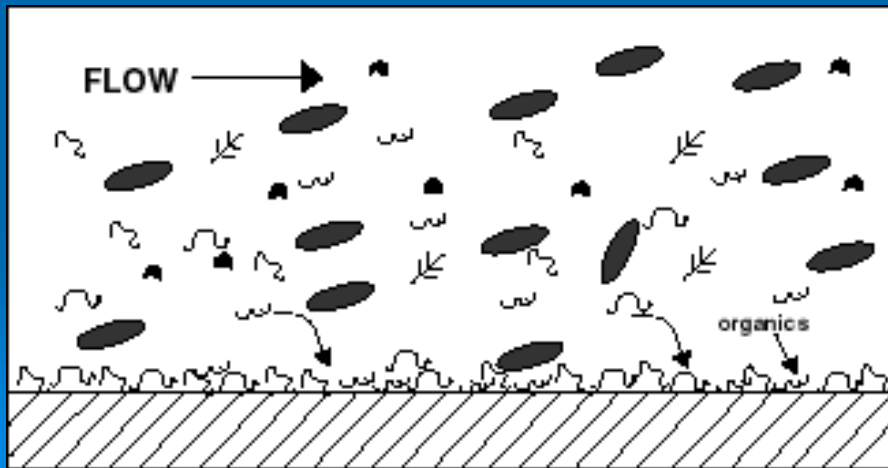


## Miért előnyös a baktériumoknak a biofilm képzés?

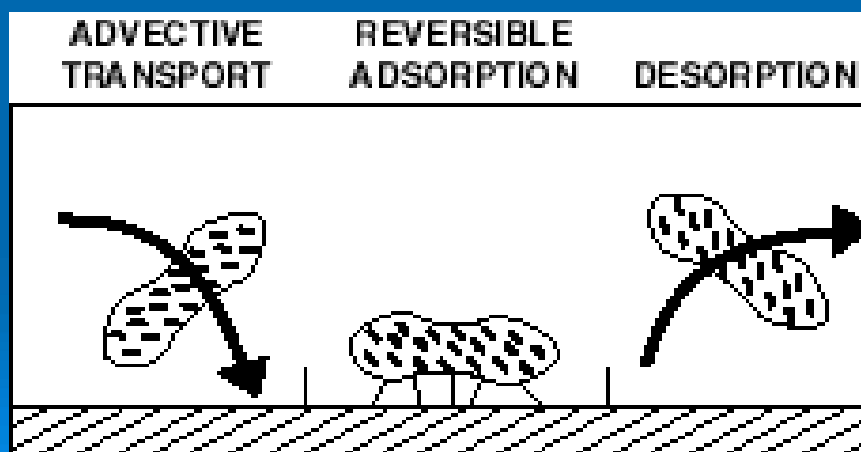
- A kapcsolódás okai
  - Gravitáció
  - A sejtfelszín negatív töltése
- Előnyök a baktériumok számára
  - Munkamegosztás
  - Élelem
  - Védelem

# Hogy képződik a biofilm?

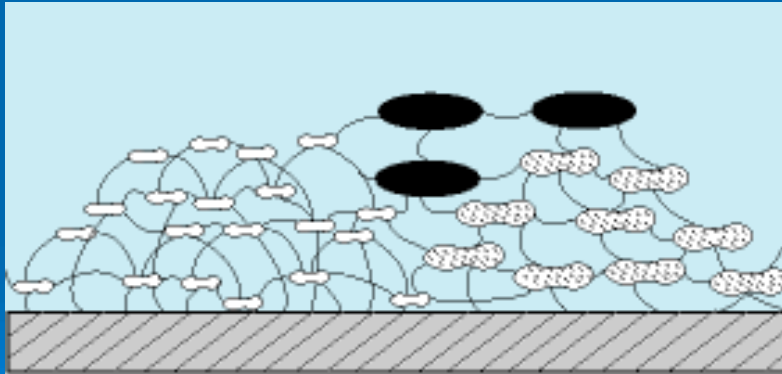
## 1. A felület kondicionálása



## 2. Az „úttörő” baktériumok adhéziója Reverzibilis adszorpció



### 3. Glikokálix (nyálka, tok) képződés Irreverzibilis adszorpció



#### A biofilm mátrix összetétele (Sutherland, 2001)

| Komponens                                   | A mátrix százaléka          |
|---------------------------------------------|-----------------------------|
| Víz                                         | >97 %                       |
| Mikrobák                                    | 2-5 %                       |
| Poliszacharidok                             | 1-2 %                       |
| Fehérjek (extracellularis és sejt törmelék) | <1-2 % (proteinek, enzimek) |
| DNS, RNS                                    | 1-2 % (sejt törmelék)       |
| ionok                                       | (kötött és szabad)          |

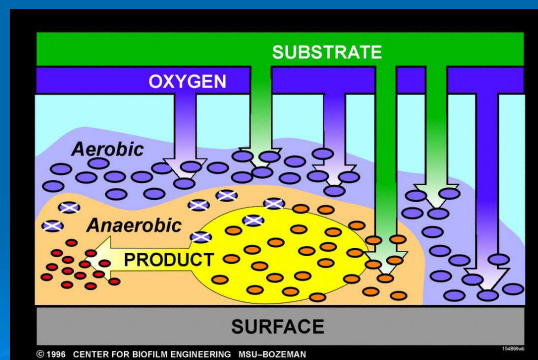
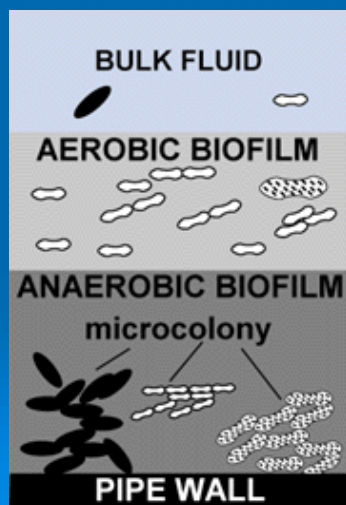


## Extracelluláris polmek, EPS

- Cukor tartalmú polimerek (élelmiszer maradványok, ásványi anyagok)
- Védő réteg
- Véd a kiszáradástól
- Nem egyenletes
- A különböző organizmusok különböző mennyiségben termelik
- Mennyisége a korral nő
- EPS képződést stimulálja
  - Ozmózis nyomás
  - Hőmérséklet
  - Éhezés
  - stb.

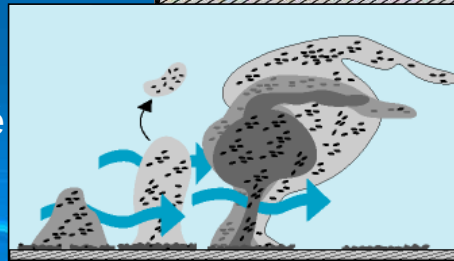
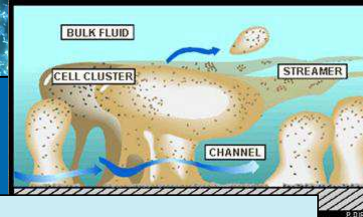
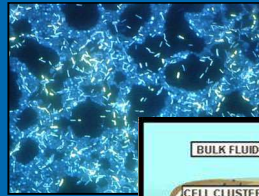
## 4. A biofilm növekedése, terjedése

Másodlagos kolonizálók



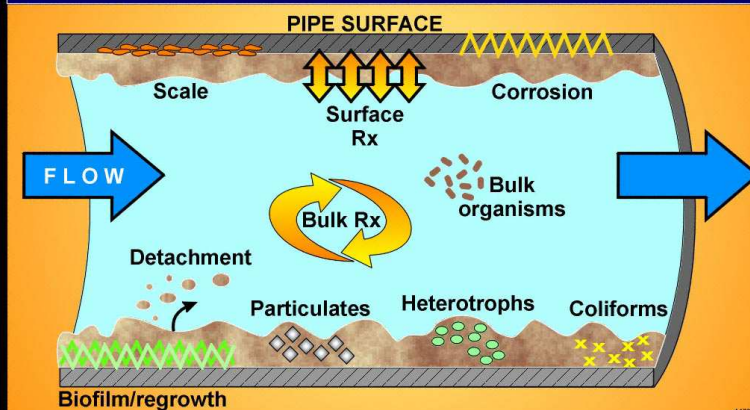
## 5. Érett biofilmek

- Eltávolításukra mechanikai hatás, erős kémiai szerek alkalmazása hosszú behatási idővel valamint magas hőmérséklet szükséges
- Mielőtt a biofilm éretté válik a nyíróerők elegendőek az eltávolításukra



## 6. Leválás, diszpergálódás

### The Distribution System as Reactor



© 1996 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING, MSU-BOZEMAN



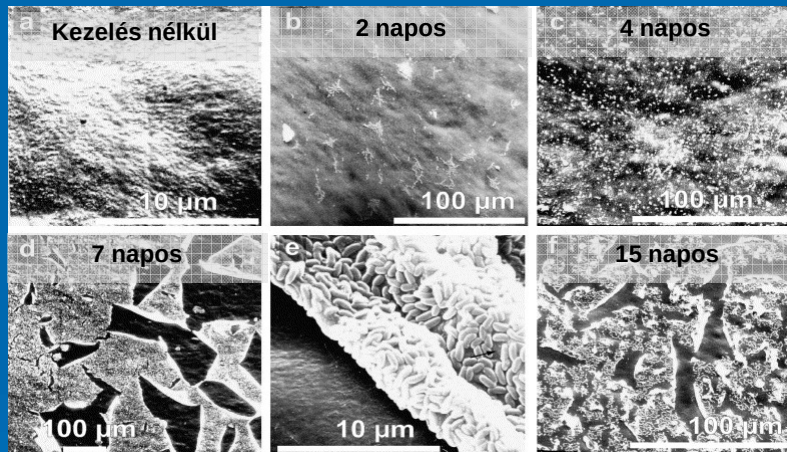
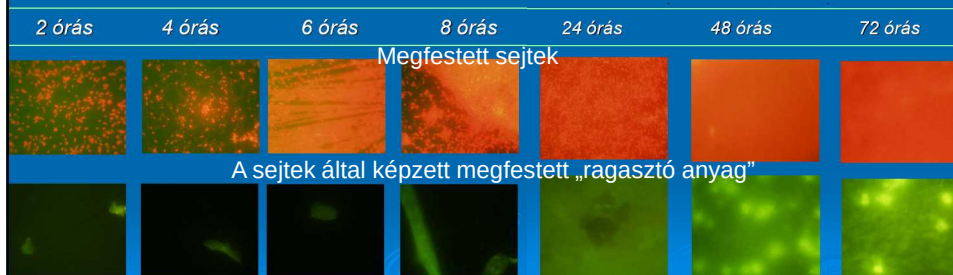


Fig 1. Induction of a biofilm by running drinking water through a silicone tube (inner tube diameter 4 mm). **a**, Inner surface of the control tube without biofilm. **b**, Microcolonies appear after running drinking water for 2 days. **c**, Numerous microcolonies appear after running drinking water for 4 days. **d**, Surface covered with biofilm (disrupted by preparation) after running drinking water for 7 days. **e**, Magnification of **d**. Numerous microorganisms embedded in an extracellular matrix (arrow). **f**, Surface covered with biofilm after running drinking water for 15 days.

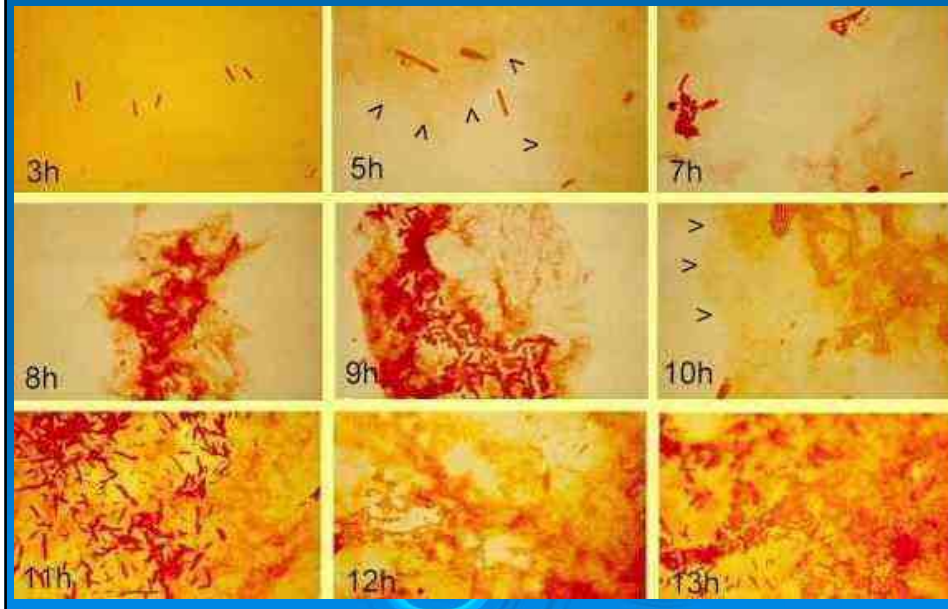
(Exner et al., 2005)

## Biofilm képzés rozsdamentes acél felületen - *Pseudomonas aeruginosa* festés: akridin narancs, FITC



Pap és Kiskó, 2003

## Biofilm képzés üveg felületen - *Pseudomonas* sp.



## A sejt kapcsolódást és biofilm képzést befolyásoló tényezők

| A szubsztrátum tulajdonságai                                           | Az áramló folyadék tulajdonságai                                           | A sejt tulajdonságai                                           |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Szerkezet<br>A felület simasága<br>Hidrofobicitás<br>Kondicionáló film | Tápanyagok<br>Áramlási sebesség<br>pH<br>Hőmérséklet<br>Kationok jelenléte | A sejtfelület hidrofobicitás<br>Fimbriák<br>Flagellumok<br>EPS |

## A biofilm képzést befolyásoló tényezők

### • A felület anyaga

#### Különbségek a kötődésben

- hidrofób felület – gyorsabb kapcsolódás  
(Teflon, gumi stb.)
- hidrofil felület – lassabb kapcsolódás  
(üveg, fém stb.)



#### Nincs különbség a kötődésben

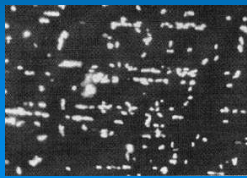
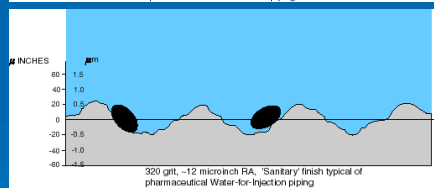
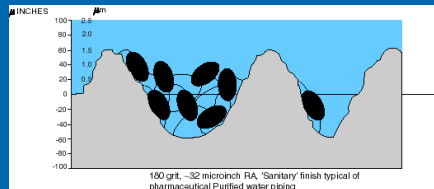
A magas szaporodási sebesség a különbségeket csekély tényezővé teszi

## A biofilm képzést befolyásoló tényezők

### • Felület mérete

- Membránok, gyanták
- Tároló tankok
- Szűrő betétek
- Vezeték rendszerek
- Hosszú lefutású műveletek
- Csak hetenkénti száraz tisztítás
- Naponkénti tisztítás, de nem biofilm eltávolítására alkalmas szerrel
- Padozat
  - Falak
  - 24 óránál ritkábban tisztított lefolyók stb.

## A biofilm képzést befolyásoló tényezők



### • A felület simasága

! Befolyásolja a bevonat képződést, de, csak eleinte, az első órákban. A biofilm képződés néhány nap után elkerülhetetlen.

## A FELÜLET SZEREPE A MIKROORGANIZMUSOK MEGTAPADÁSÁBAN

- Teljesen intakt felületen is megtapadnak
- A kopott felület visszatartja a mikrobákat (retenció); védi a nyírófeszültségtől.
- A felületi sérülések inkább a szerves szennyeződés, mint a mikrobák megkötődését segíti elő
- A szerves anyagok kondicionálják a felületet – specifikus kötődési lehetőség a mikrobáknak
- A kopott felület megtisztítása szerves szennyeződéstől nehezebb, mint a mikrobáktól
- A takarítás után mindig marad szennyeződés – szerves anyag felhalmozódás
- A szerves anyagba ágyazódott mikrobák észrevétlenek maradnak

## A biofilm képzést befolyásoló tényezők

### • Korlátozott mennyiségű tápanyag

Tisztított vízrendszerekben talált tápanyagok (Mittelman 1985)

| Nutrient               | Sources                                                                                                                                                                                    |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Organic Carbon         | Humic and fulvic acids (source water), Pipe plasticizers and solvents, Fiberglass-reinforced plastics (FRPs)<br>Pump and gage lubricants, Microbial byproducts, Personnel<br>Airborne dust |
| Nitrogen               | Humic and fulvic acids (source water), Nitrates and nitrites (source water), Microbial byproducts, Airborne dust                                                                           |
| Phosphorus             | Phosphates (source water)<br>Microbial byproducts, Airborne dust                                                                                                                           |
| Sulfur                 | Sulfates (source waters), Sulfuric acid (RO pretreatment)<br>Membrane surfactants, Airborne dust                                                                                           |
| Trace metals and salts | Source waters, Process piping, Fiberglass-reinforced plastics (FRPs), Stainless steel system components<br>RO pretreatment chemicals, Personnel, Airborne dust                             |

## A biofilm képzést befolyásoló tényezők

### • Áramlási sebesség

Lamináris réteg vastagság (micron) [Pittner 1988]

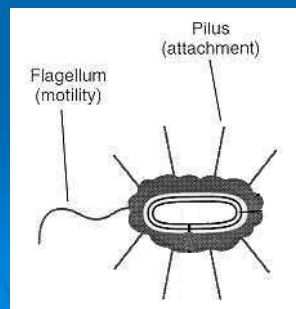
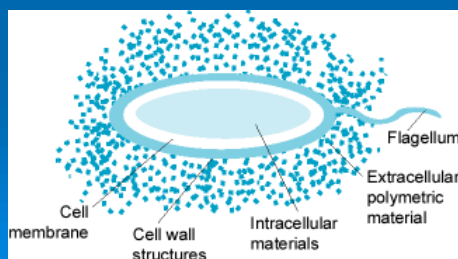
| Cső méret         | Áramlási sebesség (ft/sec) |     |     |     |     |      |
|-------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
|                   | 0.2                        | 1.0 | 2.0 | 5.0 | 8.0 | 12.0 |
| E.I. RDS 0.428"ID | *                          | *   | 125 | 55  | 37  | 26   |
| 1/2" Sch.80       | *                          | *   | 136 | 60  | 40  | 28   |
| 1" Sch.80         | *                          | 265 | 146 | 65  | 43  | 30   |
| 2" Sch.80         | 537                        | 291 | 158 | 69  | 46  | 32   |
| 3" Sch.80         | 563                        | 305 | 165 | 74  | 48  | 33   |
| 4" Sch.80         | 582                        | 312 | 170 | 75  | 50  | 34   |

\* Az áramlás lehet turbulens vagy nem ilyen körülmények között

### • Alacsony áramlás a határ rétegben

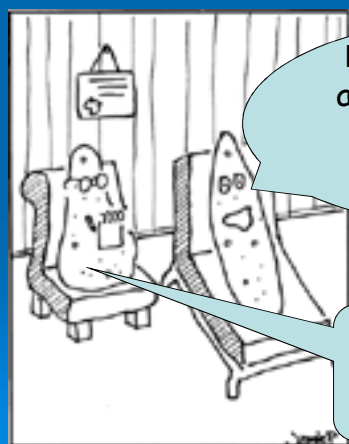
## A biofilm képzést befolyásoló tényezők

- Motilitás és kemotaxis
- Flagellumok



## A mikroorganizmusok kommunikációja a biofilmekben

- „kémiai nyelv”
- quorum-sensing – sejt – sejt kommunikáció

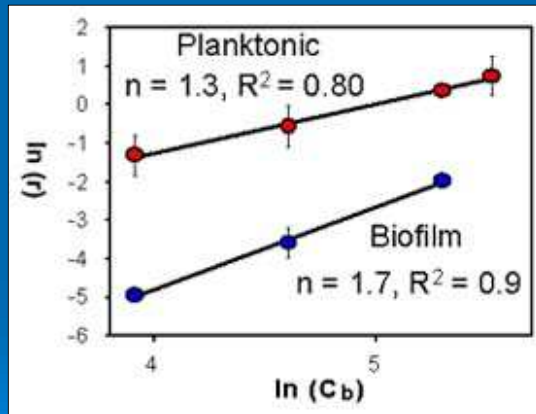
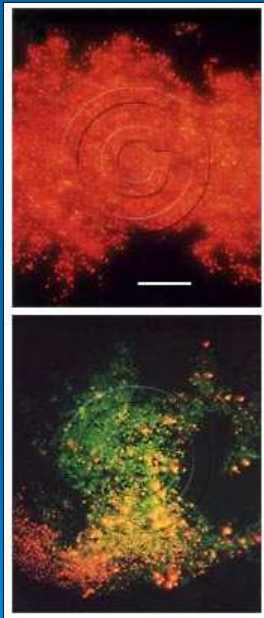


Már nem bírok többé az áramlással tartani. Azon gondolkodom, hogy egy biofilmhez csatlakozom.

Mennyi kaja van ott!!

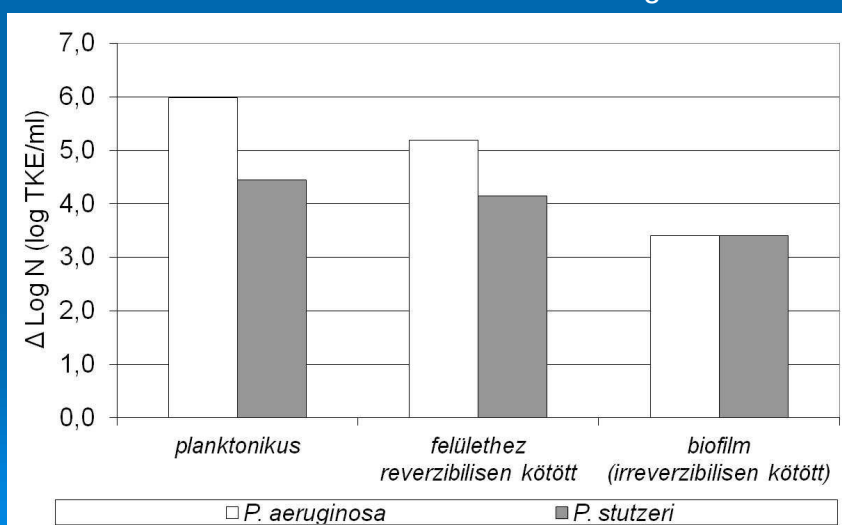


## Antimikrobás kezelések



## Felületekhez való tapadás

Hő inaktiválás - 85 °C-os melegvíz



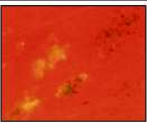
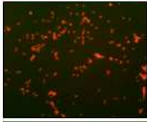
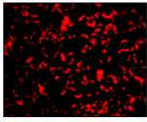
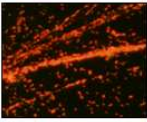
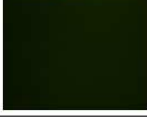
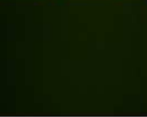
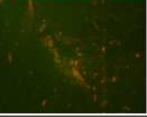
(Kiskó és Szabó-Szabó, 2012)

## Antibiotikum rezisztencia

| Baktérium                     | Antibiotikum | MIC [mg/L] a planktonikus fázisban | MIC [mg/L] a biofilmben |
|-------------------------------|--------------|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Staph. aureus</i>          | vancomycin   | 2                                  | 20                      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | imipenem     | 1                                  | 1024                    |
| <i>E. coli</i>                | ampicillin   | 2                                  | 512                     |
| <i>P. pseudomallei</i>        | ceftazidim   | 8                                  | 800                     |
| <i>Str. sanguis</i>           | doxycyclin   | 0.063                              | 3.15                    |

Donlan, *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167–193.

Table 1. Epifluorescent photomicrographs of stainless steel coupons containing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with different age

|                       | Age of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm                                        |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | 2 hours                                                                             | 3 days                                                                              | 7 days                                                                               | 14 days                                                                               |
| Control               |  |  |  |  |
| Treated with Descosal |  |  |  |  |
| Treated with Domestos |  |  |  |  |

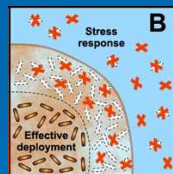
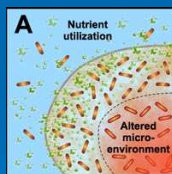
Pap és Kiskó, 2008

## A felülethez kötöttség előnyei

### Antimikrobás anyagokkal szembeni rezisztencia

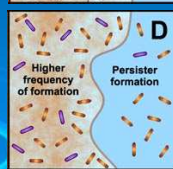
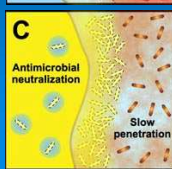
1. Nő a biocidokkal, antitestekkel szembeni védelem. Ez részben a biofilm által nyújtott fizikai védelem, részben megnő a felülethez kötött sejtek rezisztenciája.
2. A tápanyageloszlási feltételek megváltoznak, eltérő viszonyok alakulnak ki a biofilmen belül és a felületen, s ez eltérő szaporodási feltételeket teremt. A tápanyagok közös mobilizációja valósul meg a konzorcium tagjai között.
3. A sejtek fiziko-kémiai környezete megváltozik – tápanyag, pH- és rH gradiens alakul ki a biofilmen belül, s egy vegyes populáció esetén a fajok a nekik megfelelő környezetben helyezkednek el, illetve alkalmazkodnak.
4. A genetikai információcsere lehetősége megnő a konzorcium tagjai között.

A tápanyaghiány megváltoztatja a mikrobás aktivitást



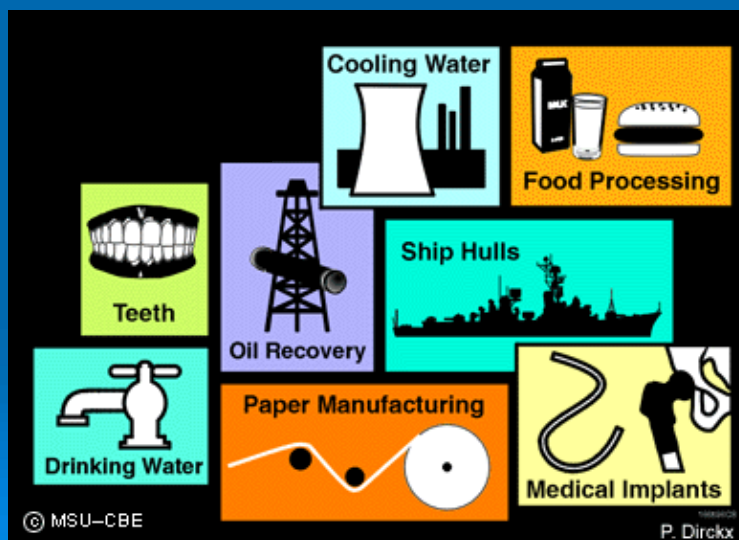
A biofilm belsejében lévő sejteknek több idejük van a stressz-válaszra

A biofilm külső rétege felfogja a külső fizikai és kémiai hatásokat



A „túlélők” száma nagyobb, mint a biofilmen kívül

## Biofilmek hatásai



### Orvosi eszközök felületéről izolált biofilmképző mikroorganizmusok

| Mikroorganizmus                    | Eszköz                                                                                                                                            |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Candida albicans</i>            | Mesterséges hang protézis, Centrál vénás katéter, Vizeletrendszeri eszköz                                                                         |
| Koaguláz-negatív sztafilokokkuszok | Mesterséges csípő protézis, Mesterséges hang protézis, Centrál vénás katéter, Vizeletrendszeri eszköz, Mű szívbillentyű, Vizeletrendszeri katéter |
| <i>Enterococcus</i> spp.           | Mesterséges csípő protézis, Centrál vénás katéter, Vizeletrendszeri eszköz<br>Mű szívbillentyű, Vizeletrendszeri katéter                          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | Centrál vénás katéter, Vizeletrendszeri katéter                                                                                                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | Mesterséges csípő protézis, Centrál vénás katéter, Vizeletrendszeri katéter                                                                       |
| <i>Pseudomonas</i> sp.             | Fogászati implantátumok, kontaktlencsék                                                                                                           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | Mesterséges csípő protézis, Centrál vénás katéter<br>Vizeletrendszeri eszköz, Mű szívbillentyű                                                    |

#### • Kórképek biofilmmel:

- natív szívbillentyű endocarditis (*Streptococcus*, *S. aureus*, *Enterococcus*, *Candida*, *Aspergillus*)
- beültetett eszközök: érpálya kanülök (pl. centrális vénás, perifériás), **húgyúti katéterek** (*Enterococcus*, Gram -, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Citrobacter*), **műbillentyű**, intrauterin eszközök, fogászati implantátumok (titánium), **kontakt lencse**, beültetett szemlencse, csípőprotézis, térdprotézis, ...
- krónikus bakteriális prostatitis
- **CF (cisztikus fibrózis)**: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Burkholderia*, *H. influenzae* (alginát képzés!)
- periodontitis, fog plaque

## Mi történik, ha biofilm van jelen?

- Szórványos környezeti teszt eredmények
- Szivárvány szerű bevonat a rozsdamentes acél felületeken
- A termék eltarthatósági ideje csökken
- A végtermékek mikrobaszáma nő
- A biofilmek patogén mikrobákat is rejthetnek, így azok fertőzési forrásként szolgálhatnak
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Escherichia coli* 0157:H7
  - *Salmonella* sp.
  - *Listeria monocytogenes*
  - stb.

## Biofilm kontroll

- Tápanyag limitáció
- Víz limitáció
- Berendezés tervezése
- Hőmérséklet kontroll
- Hatékony tisztítás, fertőtlenítés

## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

- **Fizikai kezelések**

- **Hő**

- 95°C - 100 perc
    - Nem ajánlott! – Segíti a kondicionáló réteg kialakulását a fehérje denaturáció miatt.

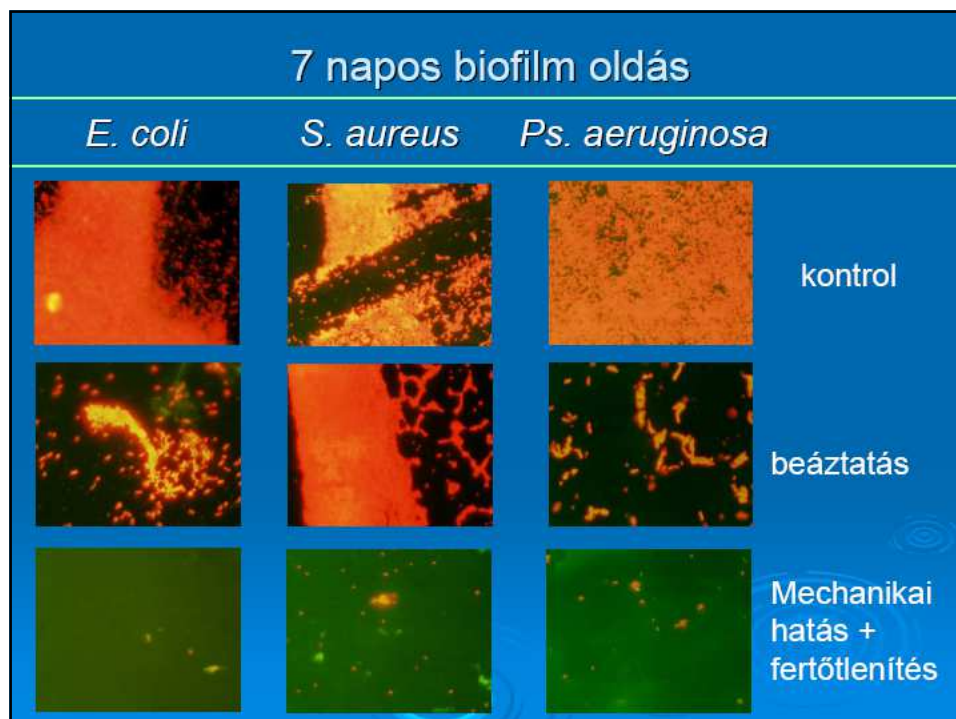
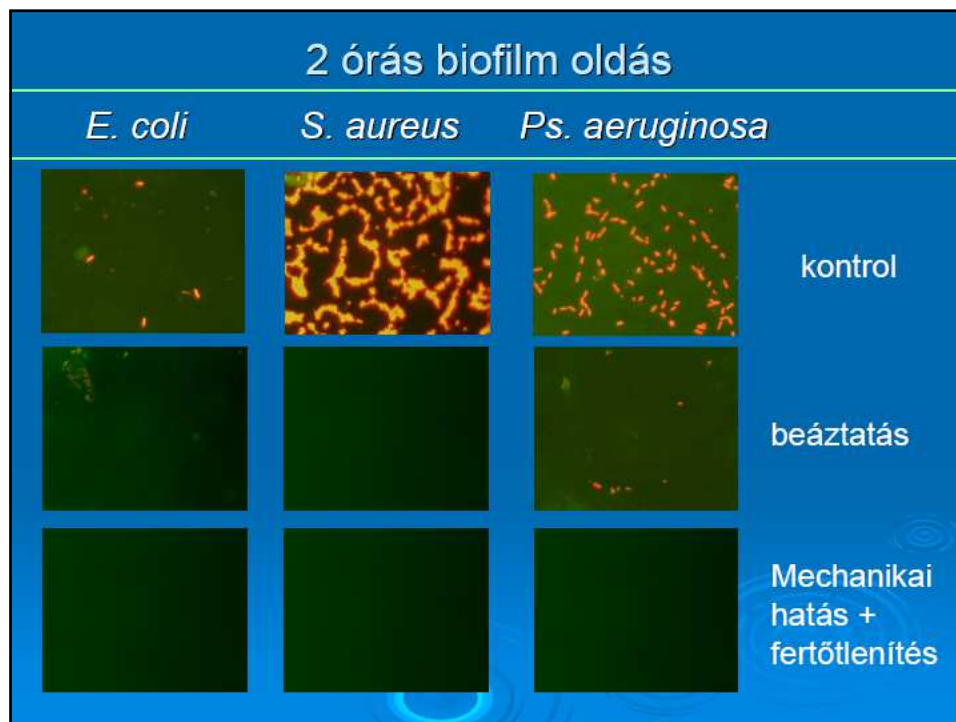
## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

- **Fizikai kezelések**

- **Mechanikai eltávolítás**

- Kaparás
    - Csiszolás
  - ! csiszoló hatású, így karcolatokat hagyhat a rozsdamentes acél felületeken
  - Cirkuláló víz
  - Nagynyomású spray
    - Nem ajánlott!
  - Kombinációk
  - Fagyasztás





## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

- Kémiai kezelés

- Antimikrobás agensek

- Oxidáló szerek

ózon > klór dioxid > klór > jód > hidrogén peroxid

- Nem oxidáló szerek

Quaternar Ammónium komponensek

Anionos és nem anionos felületaktív szerek

- Enzimek

| Biocid                                       | Dózis<br>(mg/l) | Kontakt<br>idő<br>(óra) |
|----------------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| Klór                                         |                 |                         |
| Ózon                                         | 50-100          | 1-2                     |
| Klór dioxid                                  | 10-50*          | <1                      |
| Hidrogén peroxid                             | 50-100          | 1-2                     |
| Jód                                          | 10% (v/v)       | 2-3                     |
| Quaterner ammónium                           | 100-200         | 1-2                     |
| komponensek                                  | 300-1000        | 2-3                     |
| Formaldehid                                  | 1-2% (v/v)      | 2-3                     |
| Anionos & nem-ionos felület aktív<br>anyagok | 300-500         | 3-4                     |

(Mittelman 1986)

## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

Sikeres tisztítási kombináció

– Koncentráció

- 23% hidrogén peroxid és 4% perecetsav 1-2% koncentrációban, 5 perc, 25°C
  - *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* ellen
- A savak eltávolítják a rozsdát és szerves szennyeződéseket

## Hogyan távolíthatók el a biofilmek? COP (clean-out-of-place) tank tisztítás lépései

- Klóros lúg (3750 mg/l), pH 11-12
  - 70 °C-os keringtett víz, 20 perc
- Foszfor sav (7500 mg/l)
  - 70 °C-os keringtett víz, 20 perc
- Klóros oldat (2240 mg/l)
  - 70 °C-os keringtett víz, 15 perc

## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

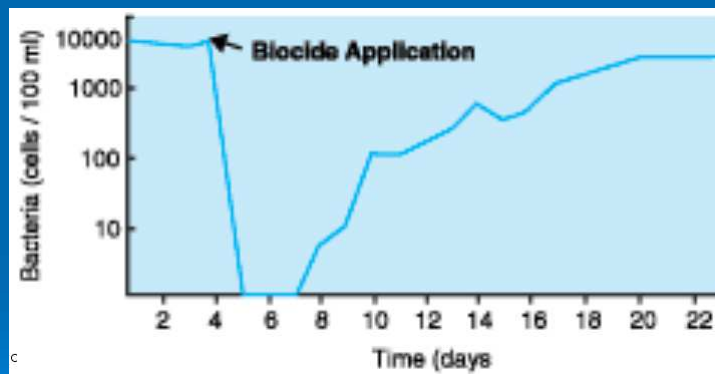
- Sterilix Corporation és az Agriculture Research Service kutató - állításuk szerint a *Listeria monocytogenes* biofilmet 100%-ban eltávolító szert fejlesztettek ki
- lúgos peroxid vegyület és fázis transzferen alapszik
- behatol a biofilmbe, elpusztítja a sejteket és eltávolítja a felületről

<http://www.foodproductiondaily.com/Quality-Safety/Listeria-biofilm-under-attack-from-new-disinfectant> 2009

## Hogyan távolíthatók el a biofilmek?

- A vegyszer alkalmazásának ideje
  - Megnövelt ható idő – jobb eredmény
  - Legalább 5 perc hidrogén peroxid és savak estén

## Biofilm újra épülés



## Hogyan kerülük el a baktériumok az eltávolításukra irányuló próbálkozásainkat:

| Erőfeszítéseink                                                                                                        | A baktériumok reakciói                                                                                                                 | Megoldás?                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Tisztítjuk</b> a vizet, hogy eltávolítsuk belőle a tápanyagokat és azt kérdezzük "Hogy tud ebben bármi is megélni?" | Polimer hálózatot használnak a tápanyagok koncentrálására. Olyan alacsony tápanyagszint mellett is élni tudnak, amit mérni sem tudunk. | <b>Tisztítsunk mindenképpen!</b>            |
| <b>Öblítjük</b> vízrendszereinket, hogy kimossuk őket a csővezetésekből.                                               | Odaragasztják magukat a felszínhez a lamináris rétegben, ahol a nyíró erők nem elegendőek az eltávolításukra                           | <b>Öblítsünk mindenképpen!</b>              |
| <b>Lesimítjuk</b> az alkatrészeket, hogy ne találjanak búvóhelyeket a résekben.                                        | Nem számít. Elkerülhetetlenül gyorsan a felületekhez kötődnek.                                                                         | <b>Minimalizáljuk réseket, hasadékokat!</b> |
| Klórral <b>fertőtlenítünk</b> .                                                                                        | Nyálka rétegbe ágyazzák magukat.                                                                                                       | <b>Fertőtlenítsünk mindenképpen!</b>        |

## Biofilmek detektálása

- Mintataponos mintavételezés
- Adatok nyomon követése (trend analízis)
- Abnormális/nem jellemző eredmények megkérdőjelezése
- Tisztítási és fertőtlenítési rendszer
  - Idő, hőmérséklet, szerek, mechanikai hatás
  - Új technológiák vizsgálata

## Biofilmek detektálása

- Tenyésztési módszerek
  - Mikrobiológiai mintavevő tamponok
  - Lemezöntés dörzsöléssel, súrolással és öblítéssel kombinálva
  - Elárasztás agarral és kontakt agar lemezek
- ATP biolumineszcencia
- Impedancia
- Drága mikroszkópos berendezések
- stb.



## Biofilmek detektálása - Lemezöntés

- Az adatok alábecslése
  - A baktérium csomók csak egy telet képeznek.
  - Az éhező baktériumok nem tudnak szaporodni a tápanyagban gazdag tápközegeken, melyek toxikus hatásúak a tisztított vízrendszerekhez adaptálódott baktériumok számára
  - Speciális tápközeg, csökkentett inkubációs hőmérséklet és hosszabb inkubációs idő – magasabb visszanyert mikrobaszám

## Biofilmek detektálása - ATP biolumineszcencia

- $1.0 \times 10^3$  CFU/g szükséges a detektáláshoz
  - Aktívan növekedő sejtek nagyobb mennyiségű ATP-t termelnek
- Biofilmbe ágyazott baktériumok
  - Kevesebb mozgás = kisebb energiaszükséglet
  - Kisebb energiaszükséglet = kevesebb ATP képződik
  - $1.0 \times 10^3$  CFU/g-nál nagyobb sejtmennyiség szükséges az ATP detektálásához