

Instytut Chemicznej Technologii Żywności
Politechnika Łódzka



Biofilmy w instalacjach przemysłu cukrowniczego

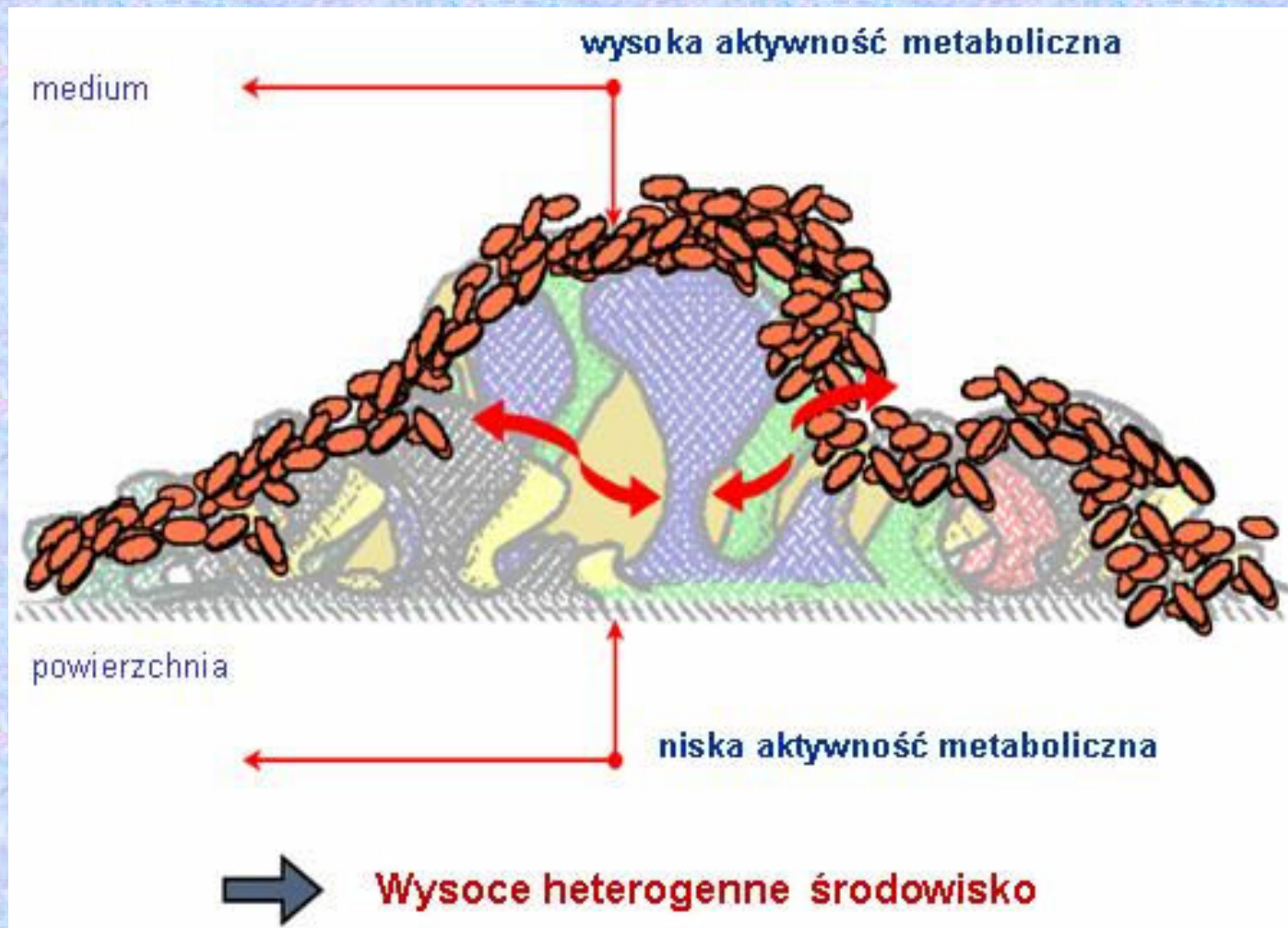
Prof. dr hab. J. Iciek, dr inż. J. Biernasiak, dr inż. I. Błaszczyk

Wymagania prawne w zakresie bezpieczeństwa żywności, tj. rozporządzenie WE 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29.04.2004
„W sprawie higieny środków spożywczych”
i polska ustawa z 25.08.2006
„O bezpieczeństwie żywności i żywienia”
(nowelizowana 08.01.2010),
nakazujące wdrażanie zasad GMP i systemu HACCP,
nie wyróżniają sektora cukrowniczego
spośród pozostałych sektorów branży spożywczej.

Biofilmy to złożone, wielokomórkowe
struktury drobnoustrojów,
otoczone warstwą śluzu,
wykazujące adhezję
do powierzchni biologicznych i abiotycznych.

Shi i Zhu, 2009; Czaczyk i Wojciechowska, 2003

Cechy biofilmu:



Rysunek 1. Zróżnicowanie aktywności metabolicznej w obrębie biofilmu
[<http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Buchala05>]

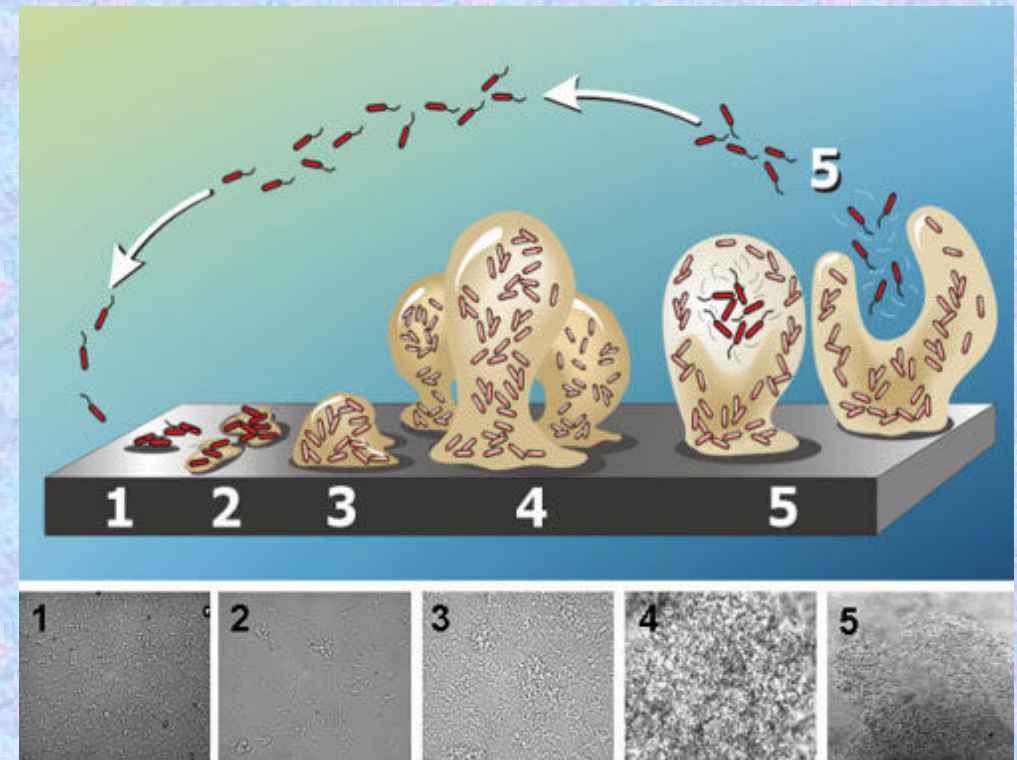
Etapy powstawania biofilmu:

1. Adhezja odwracalna pojedynczych komórek do powierzchni;
2. Adhezja nieodwracalna komórek;
3. Tworzenie mikrokolonii;
4. Różnicowanie się osiadłej populacji bakterii i utworzenie dojrzałej formy biofilmu;
5. Migracja komórek.

1. Adhezja odwracalna

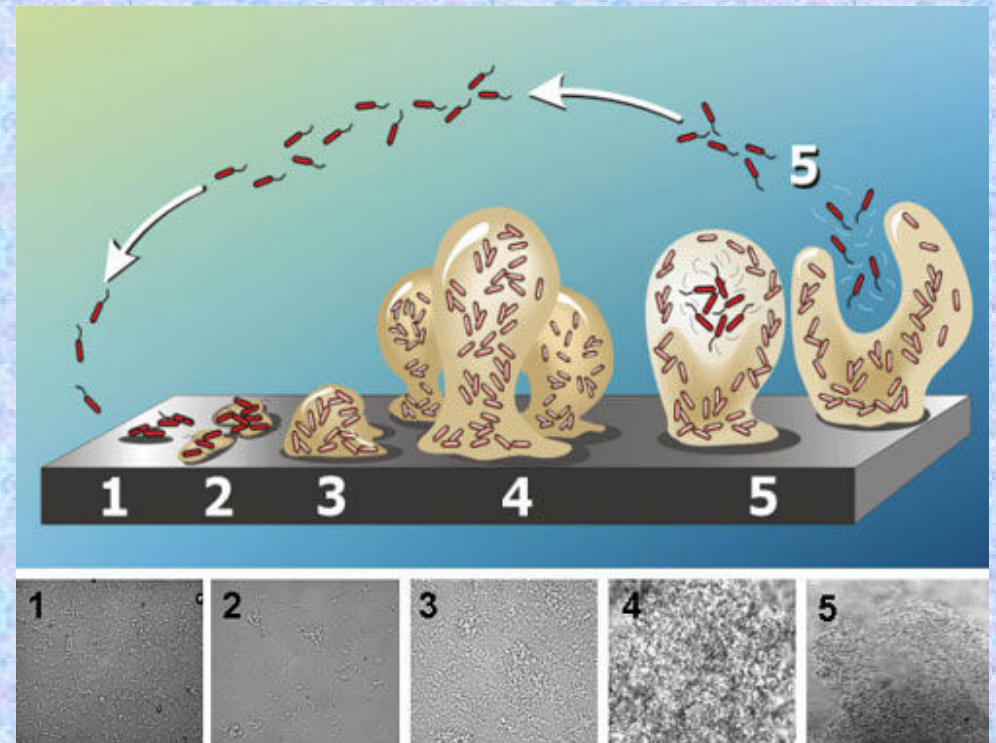
- ✓ Odległość między komórką, a podłożem 150 nm
- ✓ Fizyczne oddziaływania, tj. siły hydrodynamiczne, siły termodynamiczne (ruchy Browna), dyfuzja, grawitacja, siły Van der Waalsa, elektrostatyczny ładunek powierzchni, ruchliwość samych komórek

Rys. 2. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych w warunkach statycznych [<http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>]



2. Adhezja nieodwracalna

- ✓ Odległość między komórką, a podłożem – 3 nm
- ✓ Chemiczne interakcje, tj. wiązania wodorowe oraz tworzenie par i kompleksów jonowych (wiązania kowalencyjne typu węgiel-węgiel)
- ✓ Wzmożona synteza i wydzielanie zewnątrzkomórkowych biopolimerów (EPS – extracellular polymeric substances)

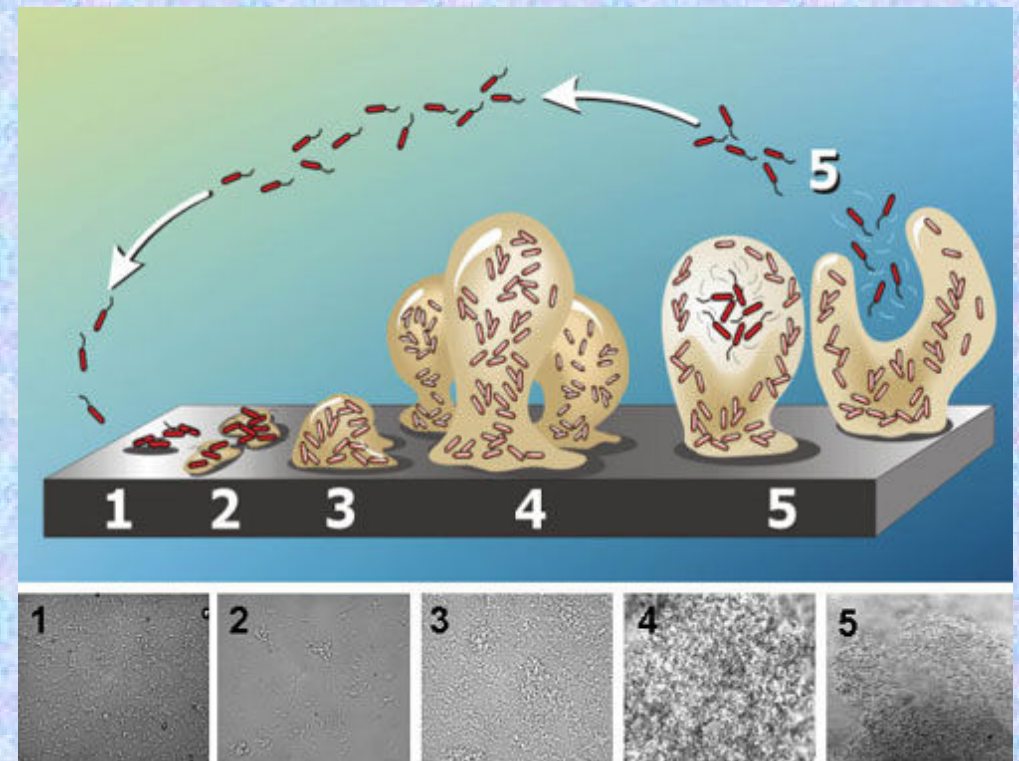


Rys. 2. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych w warunkach statycznych [<http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>]

3. Tworzenie mikrokolonii

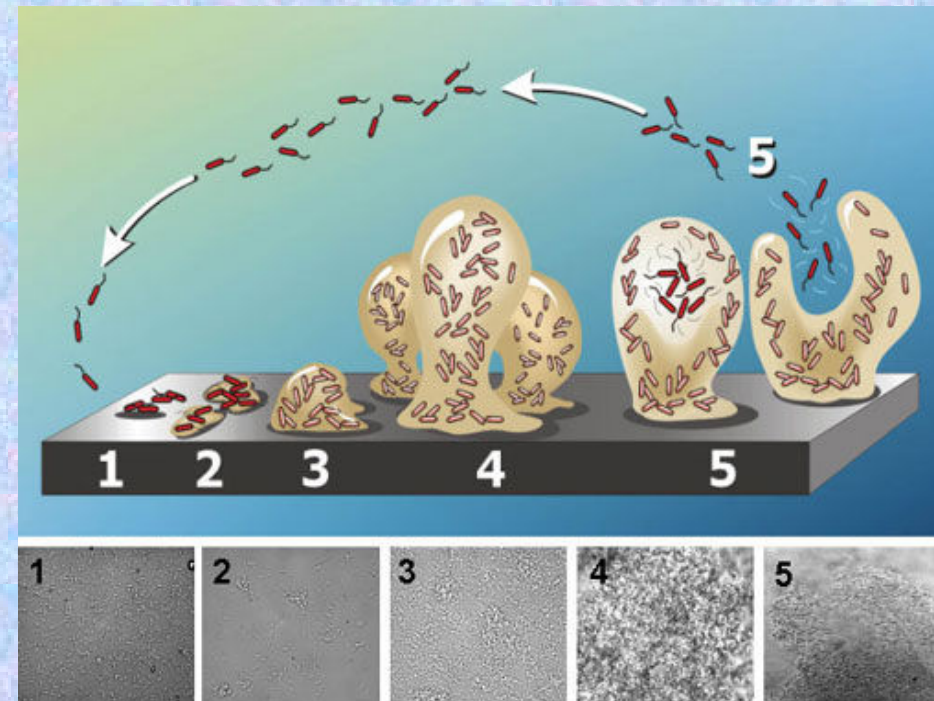
- ✓ Indukcja i supresja poszczególnych genów
- ✓ Ekspresja odpowiednich cech genotypowych
- ✓ Wzmożona synteza i wydzielanie zewnątrzkomórkowych biopolimerów (EPS – extracellular polymeric substances)

Rys. 2. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych w warunkach statycznych [<http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>]



4. Dojrzewanie biofilmu

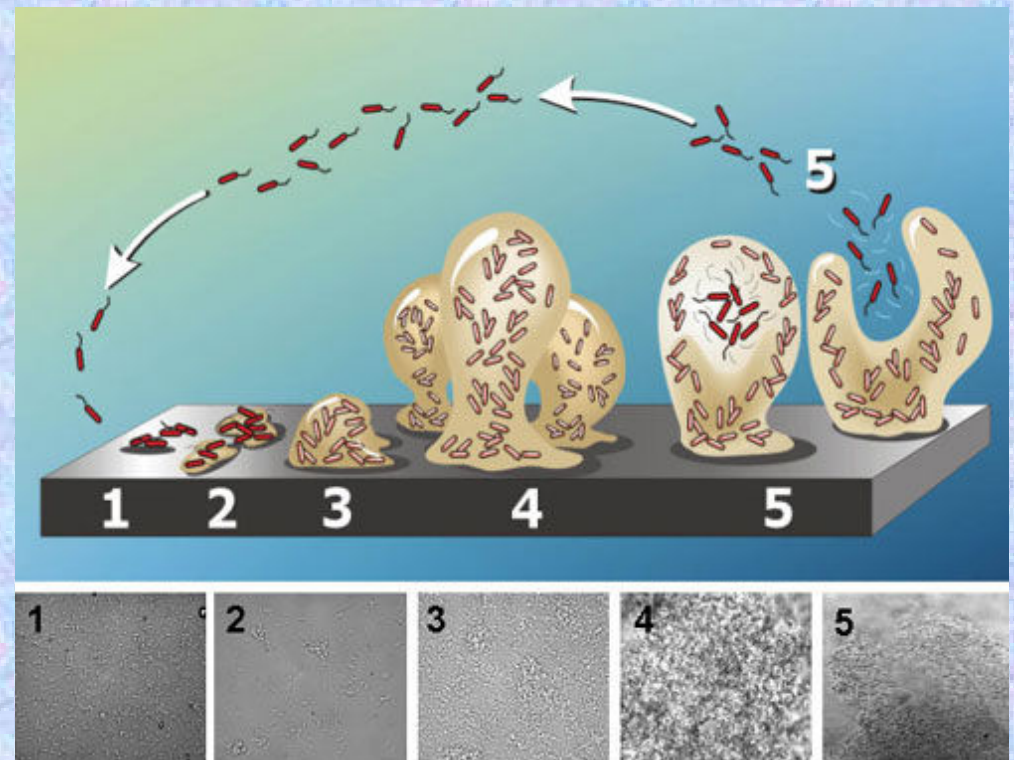
- ✓ Intensywne namnażanie się komórek
- ✓ Wytwarzanie glikokaliksu, tj. otoczki składającej się z reszt polisacharydowych glikolipidów i glikoproteidów wchodzących w skład błon komórkowych
- ✓ Adsorbcja substancji mineralnych, związków organicznych oraz komórek innych drobnoustrojów do struktury glikokaliksu



Rys. 2. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych w warunkach statycznych [<http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>]

5. Migracja komórek

- ✓ Osiągnięcie przez błonę biologiczną, tzw. krytycznej grubości
- ✓ Migracja komórek z peryferycznych części dojrzałego biofilmu do otaczającego środowiska
- ✓ Proces kolonizacji nowych miejsc/płaszczyzn



Rys. 2. Formowanie biofilmu na powierzchniach stałych w warunkach statycznych [<http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>]

Czynniki warunkujące tworzenie biofilmów:

1. Wydzielanie przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowych biopolimerów (EPS – extracellular polymeric substances);
2. Hydrofobowość/hydrofilowość płaszczyzn i komórek;
3. Rodzaj i charakter powierzchni;
4. Czynniki środowiskowe;
5. Obecność innych mikroorganizmów.

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE BIOPOLIMERY

białka, polisacharydy, kwasy nukleinowe, fosfolipidy

Polisacharydy

Białka

niska koncentracja składników odżywczych w środowisku wzrostu

- ✓ akumulacja na powierzchni komórki w postaci śluzu lub wydzielanie do podłoża
- ✓ wypełnianie pustych przestrzeni między komórkami mikroorganizmów
- ✓ zabezpieczanie komórek przed destrukcyjnym działaniem osmotycznych i oksydatywnych czynników, w tym środków dezynfekcyjnych
- ✓ uwolnienie do roztworu – utworzenie warstwy kondycjonującej
- ✓ wzrost koncentracji białek – I etap adhezji
- ✓ sekrecja białek *in situ* – nasilenie adhezji stabilne „zakotwiczenie” komórek do powierzchni docelowej
- ✓ adsorbcja na powierzchni związków toksycznych i zapobieganie ich dyfuzji do cytoplazmy

Hydrofobowość/hydrofilowość

1. Płaszczyzny docelowe

Płaszczyzny wysoce hydrofobowe lub wykazujące dodatni ładunek powierzchniowy są z reguły lepiej zasiedlane przez mikroorganizmy niż płaszczyzny o hydrofilowym charakterze i naładowane ujemnie.

Zależność ta determinowana jest obecnością wolnych grup funkcyjnych (głównie COO^- , OH^- , NH_2^- oraz O^{2-}) w strukturze zewnętrznych membran drobnoustrojów.

Hydrofobowe powierzchnie abiotyczne:

- ✓ Polichlorek winylu (PCV)
- ✓ Polietylen tetaftalenu (PET)
- ✓ Hydrofobowe regiony powierzchni stali nierdzewnej

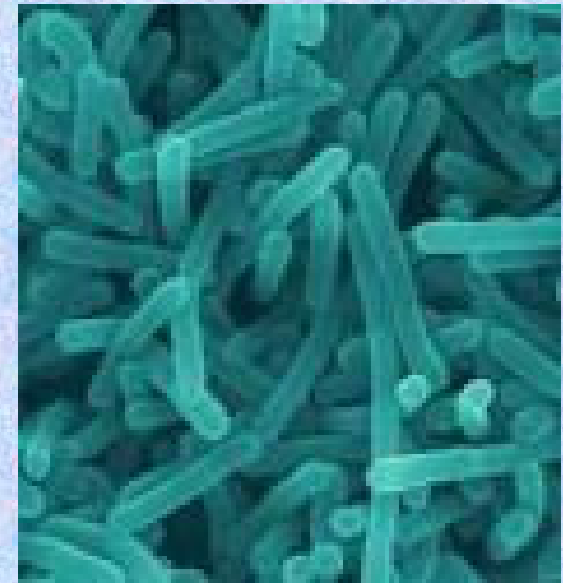
Hydrofobowość/hydrofilowość

2. Ściana komórkowa drobnoustrojów

Powierzchnia większości bakterii naładowana jest ujemnie, a wiele struktur powierzchniowych, białek czy lipidów, podnosi jej hydrofobowość. Silne właściwości hydrofobowe powierzchni wpływają na autoagregację komórek bakteryjnych i oznaczają wyższy stopień przywieralności do hydrofilnych powierzchni.

Właściwości powierzchniowe bakterii są procesem dynamicznym, zależnym od warunków hodowli

- ✓ *korzystne warunki środowiska - hydrofilowość*
- ✓ *niekorzystne warunki środowiska - hydrofobowość*



Rys. 3. *Listeria monocytogenes*

Rodzaj i charakter powierzchni

Hipoteza 1

Wraz ze wzrostem chropowatości powierzchni zwiększa się adhezja drobnoustrojów

Hipoteza 2

Brak korelacji pomiędzy nieregularnościami powierzchni, a zdolnością bakterii do adhezji – wielkość komórek mikroorganizmów

Hipoteza 3

Tworzenie biofilmów determinowane jest hydrodynamiką całego układu, tj. w środowiskach nienarażonych na stresy hydrodynamiczne nie ma różnic w adhezji w zależności od porowatości

Rodzaj i charakter powierzchni

W większości badań wykazano jednak, że porowatość, obecność na powierzchni zarysowań i skaz sprzyja tworzeniu się biofilmów, tj. adhezji komórek o szczególnie małych rozmiarach.

Materiały, na których najczęściej stwierdza się obecność biofilmów:

- ✓ Drewno
- ✓ Szkła
- ✓ Stal nierdzewna i inne metale
- ✓ Tworzywa sztuczne: polipropylen, polistyren, teflon, silikon, guma

Czynniki środowiskowe

1. Składniki odżywcze

✓ Źródła cukru

Determinacja powstawania mikrokolonii komórek na powierzchniach i nadanie biofilmom trójwymiarowej struktury.

✓ Źródła węgla

Determinacja syntezy pozakomórkowych substancji, scalających mikrokolonie biofilmu i stabilizujących mechaniczną strukturę błon biologicznych.

✓ Źródła azotu

Synteza zewnątrzkomórkowych białek kształtujących hydrofobowy charakter powierzchni komórek i powierzchni abiotycznej.

Czynniki środowiskowe

1. Składniki odżywcze

✓ **Jony metali**

Wpływ na funkcje odżywcze, transportowe i enzymatyczne w komórkach mikroorganizmów, co może w sposób pośredni wpływać na tworzenie biofilmu lub kształtować jego strukturę i właściwości.

✓ **Składniki mineralne**

Udział w procesie biosyntezy egzopolisacharydów, jak również wzmocnienie struktury glikokaliksu.

Czynniki środowiskowe

2. Odczyn podłoża hodowlanego

Wysokie pH (>10) lub niskie pH (<2-3) – skuteczne inhibitory wzrostu komórek i syntezy substancji EPS u większości bakterii saprofitycznych i patogennych.

3. Temperatura

W niskich temperaturach powierzchnia mikroorganizmów wykazuje wysoce hydrofobowy charakter, co związane jest z syntezą przez komórki specyficznych białek szoku termicznego (*ang. cold shock protein*), co sprzyja procesom adhezji.

Obecność innych mikroorganizmów

Niektóre mikroorganizmy nie przyczepiają się do powierzchni jeżeli występują w monokulturach, ale w hodowlach mieszanych obserwuje się znaczącą ich adhezję.

Obecność w środowisku populacji mieszanych może przyspieszać proces adhezji, jak również powodować przyczepianie się komórek patogennych, które same nie posiadają takich uzdolnień

Biofilmy – zagrożenie w wielu gałęziach gospodarki

1. Praktyka medyczna

✓ **Zakażenia u pacjentów**

przyrządy, wykonane z materiałów syntetycznych, tj. cewniki, dreny, protezy stawowe, soczewki kontaktowe, zespolenia naczyniowe

✓ **Rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych**

adhezja bakterii chorobotwórczych do powierzchni stałych

✓ **Powstawanie płytki nazębnej, próchnicy i paradontozy**

adhezja drobnoustrojów do powierzchni zębów

2. Przemysł spożywczy



Produkt

- ✓ Zmiany organoleptyczne
- ✓ Przyczyna psucia
- ✓ Rezerwuar bakterii chorobotwórczych



Ekonomia

- ✓ Ograniczenie przepływu mediów
- ✓ Utrudniona wymiana ciepła
- ✓ Wzrost tarcia na elementach ruchomych
- ✓ Awaria urządzeń

2. Przemysł spożywczy

W skali przemysłowej tematyka dotycząca tworzenia i skutków obecności biofilmu została szczegółowo opisana w przemyśle mleczarskim, mięsnym i rybnym.

Biofilm realnym zagrożeniem dla jakości, w tym bezpieczeństwa produktów finalnych

- ✓ **Gunduz G.T., Tuncel G.:** Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie Van Leeuwenhoek 2006**, 89, 329-336

Badania prowadzone w skali przemysłowej podczas produkcji lodów wykazały, że w skład biofilmu mogą wchodzić zarówno bakterie gramdodatnie z rodzaju *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp. i *Pediococcus* sp., jak i gramujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*, tj.: *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*.

2. Przemysł spożywczy

- ✓ **Sharma M. and Anand S.K.:** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control 2002**, 13, 469-477

Biofilm obecny w aparaturze stosowanej w przemyśle mleczarskim może być zróżnicowany gatunkowo i zawierać *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella* sp. i *Staphylococcus aureus*.

- ✓ **Giffel M.C., Beumer R.R., Granum P.E., Rombouts F.M.:** Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology 1997**, 34, 307-318

Adhezja spor *Bacillus cereus* do powierzchni stali nierdzewnej wymiennika ciepła stosowanego w przemyśle mleczarskim, namnażanie i tworzenie biofilmu.

Oporność biofilmów na czynniki antymikrobiologiczne:

1. Wytwarzanie ochronnej warstwy śluzu;
2. Zmniejszenie aktywności metabolicznej;
3. Zmiany zachodzące na poziomie molekularnym;
4. Procesy chemicznego komunikowania;
5. Zespoły związków białkowych.

Czaczyk i Myszka, 2007; Szczotko, 2007; Latasa i wsp., 2006

1. Wytwarzanie ochronnej warstwy śluzu

- ✓ obniżenie tempa dyfuzji biocydów
- ✓ utrudnienie dotarcia składników toksycznych do głębszych warstw błony biologicznej
- ✓ ochrona przed:
 - promieniowaniem UV
 - zmianami wartości pH środowiska
 - fagocytozą
 - szokiem osmotycznym

2. Zmniejszenie aktywności metabolicznej

W głębszych warstwach biofilmu komórki mają mniejszy dostęp do składników odżywczych i tlenu, więc aby przetrwać w tych warunkach muszą się dostosować, poprzez zmianę swojej fizjologii i zmniejszenie tempa wzrostu, przechodząc w stan zbliżony do anabiozy. Wykazują wówczas zmniejszoną wrażliwość na działanie substancji toksycznych

3. Zmiany zachodzące na poziomie molekularnym

- ✓ Mechanizm konstytutywny – ekspresja odpowiednich genów
- ✓ Mechanizm indukcyjny – inicjowany obecnością czynnika antymikrobiologicznego
- ✓ Aktywacja genów, których produkty ekspresji (np. enzymy) neutralizują działanie bójcze cząstek antybiotyków oraz substancji dezynfekujących

Biofilmy w przemyśle cukrowniczym:

- ✓ W literaturze światowej brak jest informacji na temat biofilmów w przemyśle cukrowniczym
- ✓ Dane literaturowe dotyczą głównie oceny mikrobiologicznej końcowego produktu oraz oceny higieny środowiska produkcji i pracowników

Biofilmy w przemyśle cukrowniczym – aspekt naukowy

1. Zdefiniowanie miejsc tworzenia się biofilmu w instalacjach przemysłu cukrowniczego;
2. Zdefiniowanie składu mikrobiologicznego biofilmu
3. Zdefiniowanie składu chemicznego matrycy biofilmu, tj. m.in. białka pozakomórkowe, a aspekty fizykochemiczne cukru (np. podatność cukru na tworzenie floka)
4. Badanie oporności temperaturowej drobnoustrojów wchodzących w skład biofilmu;
5. Badanie wrażliwości biofilmów na stosowane dezynfektanty.