

# Obvladovanje mikrobne adhezije na kontaktnih površinah

Klemen Bohinc

*Zdravstvena fakulteta  
Univerza v Ljubljani  
Slovenija*

# Namen študije - aplikativni ARRS projekt

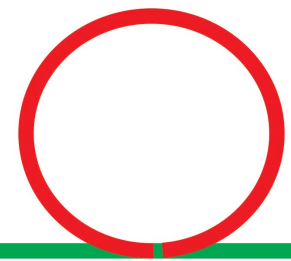
sodelujoči: ZF, BF, VF, IJS, Iskra Pio d.o.o.

- Vpliv **hrapavosti in hidrofobnosti** površin na mikrobno adhezijo in posledično tvorbo biofilmov
- Različne površine **nerjavnega jekla**, ki so **različno obdelane**
- **Poiskati fizikalne, biološke in okoljske parametre**, ki pomagajo kontrolirati prenos patogenih mikroorganizmov preko kontaktnih površin v produkciji hrane in zdravil
- Izbira in optimizacija **metod**, ki dovoljuje identifikacijo izbranih mikroorganizmov na izbranih površinah
- Ambicija projekta je **izbrati relevantne materiale** in precizno okarakterizirati kontaktne površine glede na različne produkcijske obdelave
- Namen študije je poiskati vpliv **okoljskih faktorjev na mikrobno pritrjevanje in tvorbo biofilmov**
- Na koncu projekta bomo uporabili ta metodološki pristop za študij **efektivnosti fizikalne, kemijske in biološke obdelave** (hurdle concept) za **zmanjšanje** mikrobne adhezije

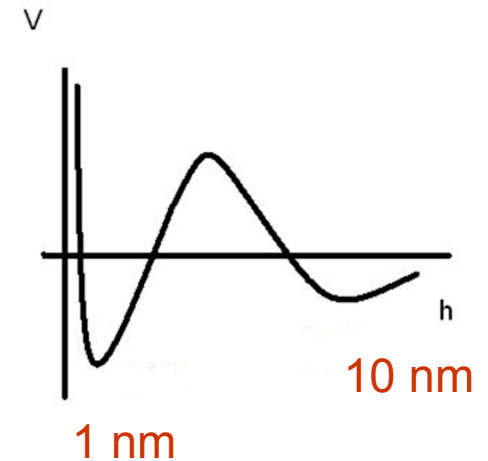
# Vsebina

- Uvod
- Steklene površine, nerjavna jekla z različnimi hrapavostmi  
Hrapavost, mejni kot
- Različne bakterije  
Zeta potencial, hidrofobnost
- Določitev stopnje adhezije  
Optična gostota, SEM
- Vpliv toka tekočine na odstranjevanje bakterij
- Zaključek

# Uvod

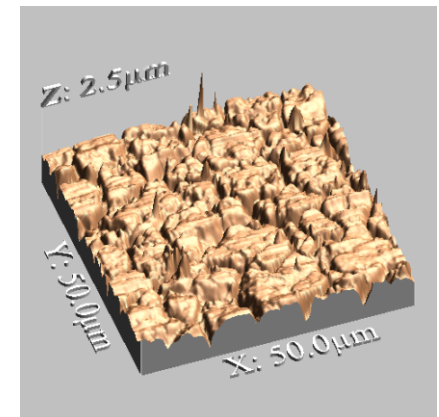


- Interakcije med mikroorganizmi (MO) in kontaktnimi površinami **materialov** so pomembne v biologiji, številnih procesnih tehnologijah, kot sta živilska in farmacevtska proizvodnja ter drugih storitvenih dejavnostih.
- Adhezijski proces temelji na **fizikalnih in kemijskih interakcijah med mikroorganizmi in površino** ter predstavlja prvi korak pri vezavi MO na površino.
- **Ob prisotnosti hranil je** omogočeno razmnoževanje in kolonizacija mikroorganizmov, posledično pa tudi nastajanje biofilmov.



## Trenutno razumevanje **mikrobne adhezije in kolonizacije kontaktnih površin materialov** je omejeno na:

- delno razumevanje različnih **modelnih mikrobni celic različnih rodov in vrst** in njihovih bioloških značilnosti (npr. aktivnih rastočih celic, oblik VBNC, spor),
- **mikrobne morfologije** (oblike, velikosti, tvorbe biofilmov),
- fiziologije in biokemije (npr. izločanje polisaharidov, produktov kislin),
- **lastnosti in površinske kemije** kontaktnih materialov (npr. nerjavečih jekel).



- Dizajniranje opreme in njenih površin v procesnih in storitvenih dejavnostih še vedno ni povsem podrejeno problematiki tvorbe biofilmov (pri starejši opremi, ki je še vedno v uporabi, so odstopanja zelo velika).
- Zaradi navedenega ima ta problem velik posreden in neposreden vpliv na ekonomičnost proizvodnje in nenazadnje na človekovo zdravje in okolje.

- **Med proizvodnjo** (problem na področju živilstva) lahko delavci (in/ali izdelki) poškodujejo kontaktne površine materialov in prenašajo onesnažila - še posebej, če le-te omogočajo adhezijo mikrobnih delcev.
- Ker so kontaktne površine različnih materialov v neposrednem in stalnem **stiku s prehrabnimi in farmacevtskimi proizvodi**, obstaja velika verjetnost, da pride do prenosa kontaminantov s površin na proizvode.

# Bakterije

- **ZF** (mo, ki lahko negativno vplivajo na zdravje glede na okolje delovanja in bivanja človeka): *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*
- **BF** (mo, ki kvarno delujejo na živila in patogene mo): *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*
- **VF** (mo nevarni za živali in se prenašajo v živilsko prehransko verigo): *Listeria monocytogenes*



# Bakterije

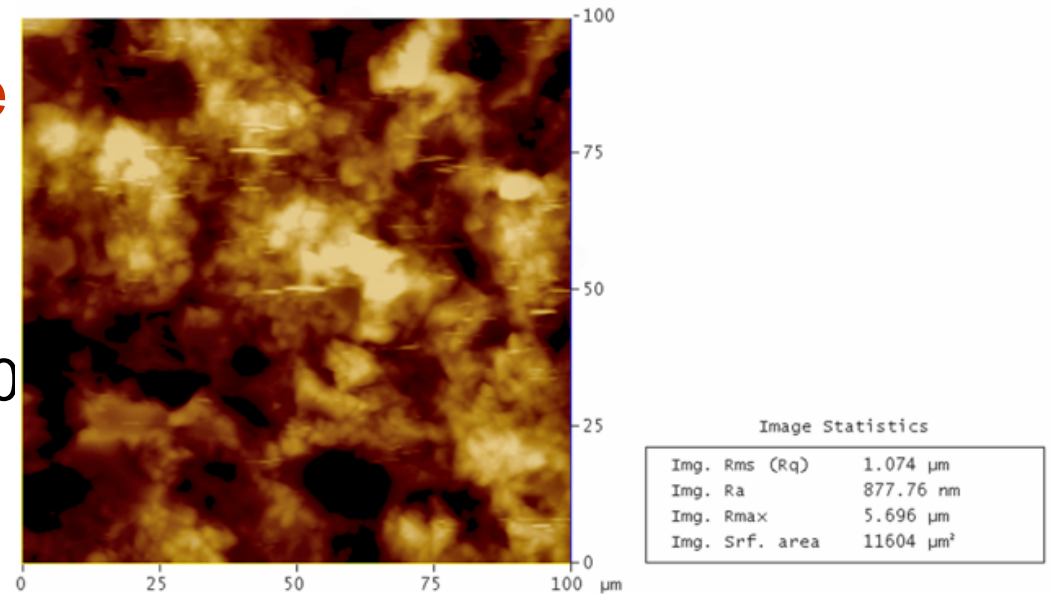
- **Gram-negativne** vsebujejo LPS (lipopolysaccharide)  
*Pseudomonas aeruginosa* (paličaste oblike, dolge 1-5  $\mu\text{m}$ , premer 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ , zunanja površina: zunajcelične polimerne strukture(EPL))  
*Escherichia coli* (paličaste, dolge  $\sim 2.0 \mu\text{m}$ , premer 0.5  $\mu\text{m}$  in diameter)
- **Gram-positivne** LPS ne vsebujejo  
*Staphylococcus aureus* (sferične premera  $\sim 1 \mu\text{m}$ )

# Materiali

- Študija na steklenih ploščicah (TEMPAX borosilikatno steklo), ploščice velike 2 cm x 2 cm
- Steklene površine brušene z različnimi gradacijami P80, P220, P500 and P1000 (velikost brusilnih delcev 18, 30, 68 and 201  $\mu\text{m}$ )
- Študija na nerjavečih površinah (neobdelane, 3D polirane, krtačene, elektropolirane, brušene)
- ploščice velike 1 cm x 1 cm

# Hrapavost površine

- Karakterizacija površinske topografije
- **AFM:** VEECO Dimension 3100 AFM, kontaktni način
- **Mehanski profilometer:** Form Talysurf Series 2 from Taylor Hobson Ltd.

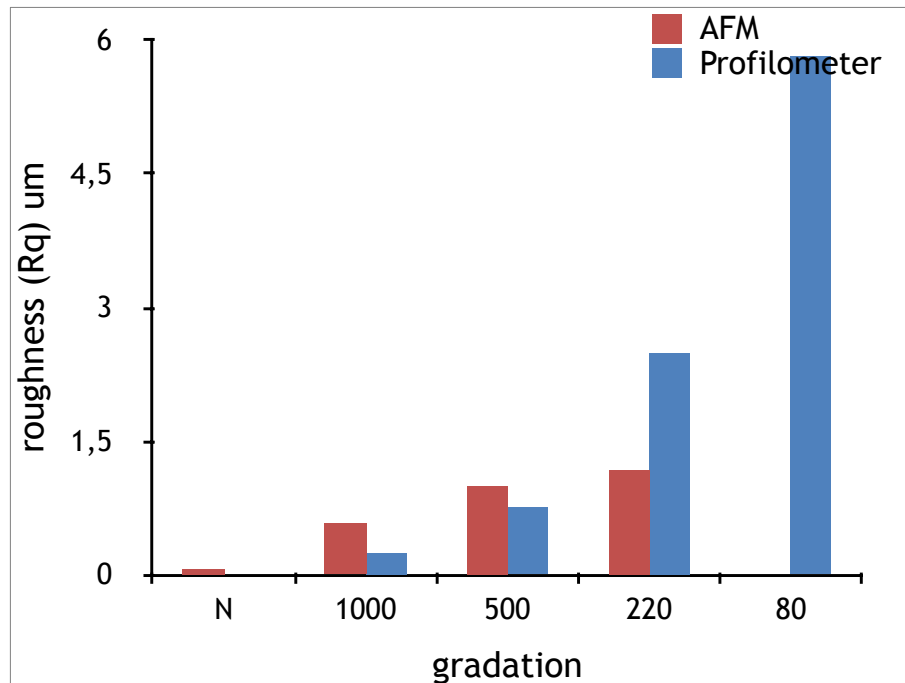


Površina brušena z gradacijo P500

$$Ra = \frac{1}{M N} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N |z_{ij}|$$

$z_{ij}$  višina hrapave površine

# Meritev hrapavosti



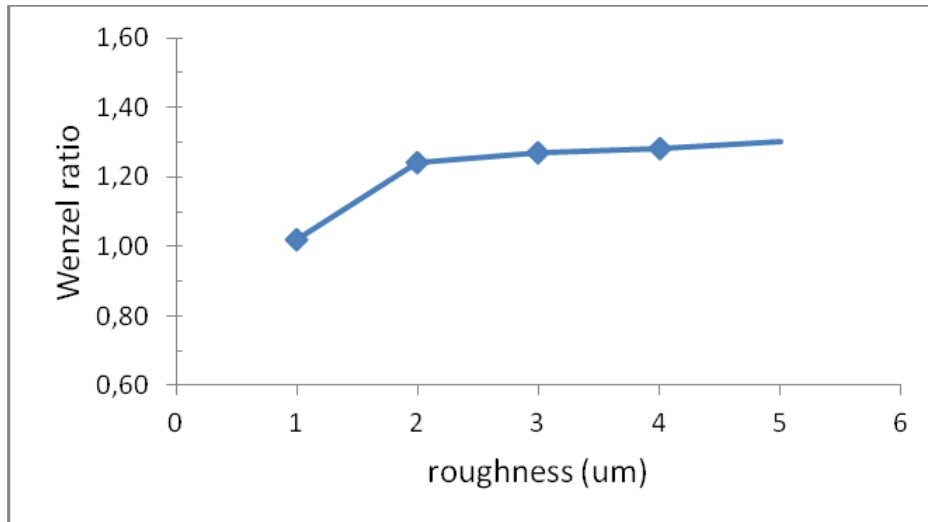
- Pri manjših hrapavostih je AFM bolj občutljiv, izmerjene vrednosti so večje
- Gradacija P80 izmerjena s profilometrom

RMS hrapavost

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{M N} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N z_{ij}^2}$$

MATERIAL	HRAPAVOST[nm]
3C	160,88
3D poliran	25,20
Krtačen	71,90
Brušen	986,00
Elektropoliran	369,00

# Wenzlovo razmerje



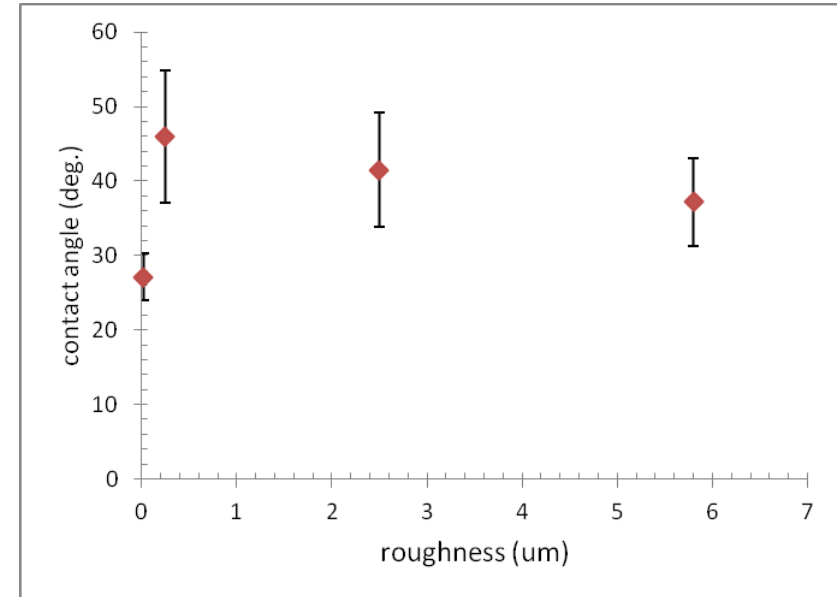
- AFM podatki
- Za majhno hrapavost  $r \sim 1$
- Za veliko hrapavost  $r \sim 1.3$

Wenzlovo razmerje je definirano kot razmerje med pravo in navidezno površino.

Efektivna površina se poveča za 30%.

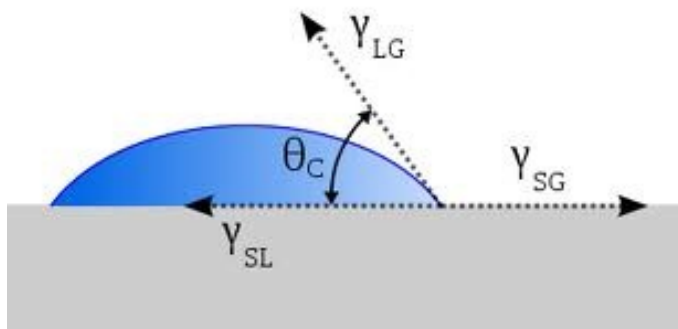
# Mejni kot

- Mejni kot med kapljico vode in površino
- Theta Optical Tensiometer (Attension, Finland)
- S pomočjo digitalne kamere posnamemo profil kapljice na površini
- S pomočjo ustrezne programske opreme odberemo kot med površino in kapljico



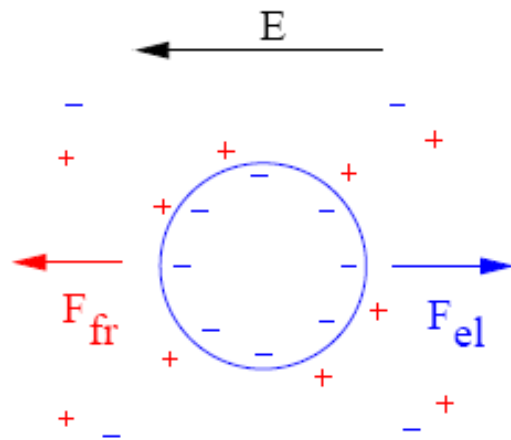
$$\cos\theta_c^* = r \cos\theta_c$$

$r \geq 1$ , hrapavost površine zmanjša mejni kot



MATERIAL	MEJNI KOT [
3C	72,50
3D poliran	91,00
Krtačen	69,00
Brušen	74,00
Elektropoliran	87,43

# Electrophoresis

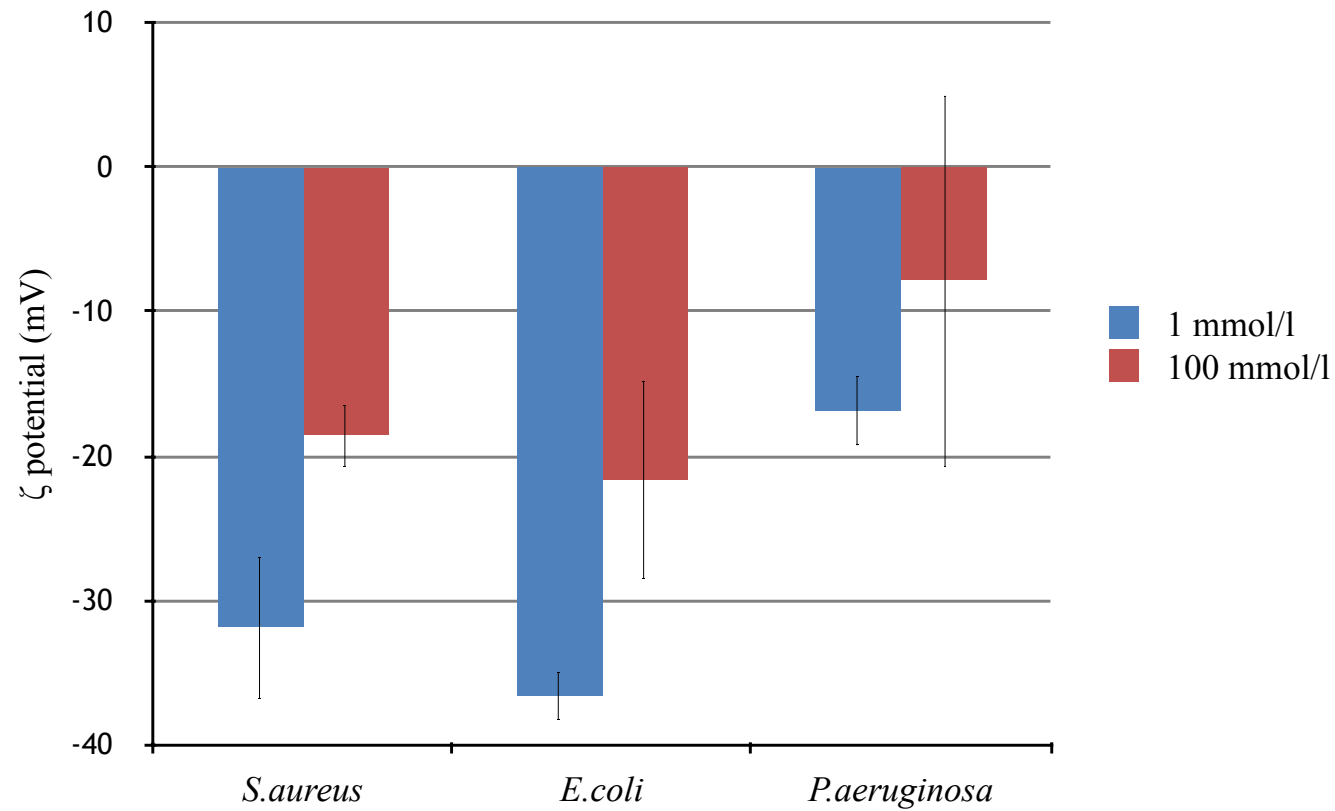


- electric force  $F_{el} = eE$
- friction force  $F_{fr} = 6\pi\eta Rv$

●  $\mu = \frac{v}{E}$  electrophoretic mobility

●  $\zeta = \frac{\eta\mu}{\epsilon\epsilon_0}$  Smoluchowski,  $R \gg l_D$

# Zeta potencial-rezultati





# Hidrofobnosti bakterij

Bacteria	Hydrophobicity
<i>E. coli</i>	23,0 ± 0,3 %
<i>S. aureus</i>	92,5 ± 10,3 %
<i>P. aeruginosa</i>	35,4 ± 3,6 %

hidrofilne

hidrofobne

hidrofilne

- Izmerimo optično gostoto suspenzijo bakterij v fosfatnem pufri (PBS)  
 $A_i = OD_{620}$
- Suspenzijo bakterij zmešamo s ksilenom in izmerimo optično gostoto spodnje vodne faze  
 $A_f = OD_{620}$
- hidrofobnost  $h = (A_i - A_f) / A_i$

# Monitoring adhezije

Inkubacija bakterij na površinah v šestih mikrotiterskih ploščicah

Izplakovanje nevezanih bakterij iz površin s PBS

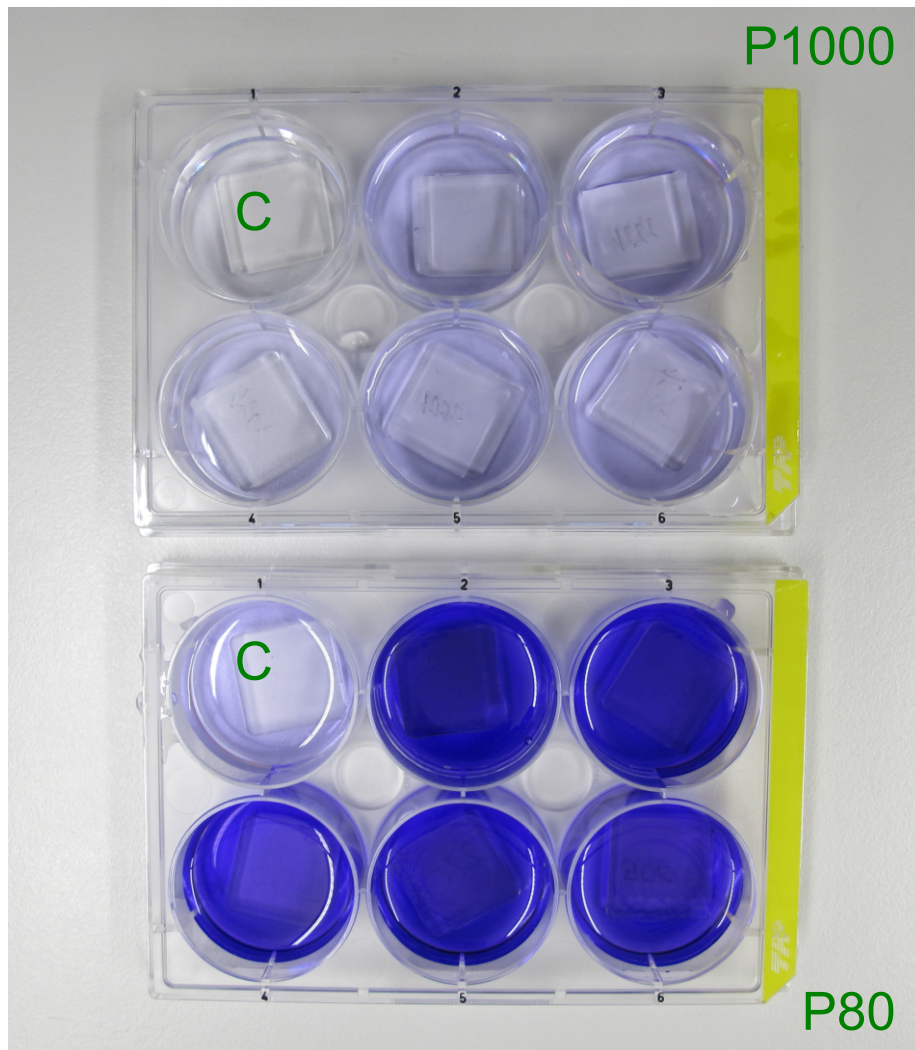
Barvanje bakterij z 0.1 % (w/v) kristal vijoličnim

Izplakovanje odvečnega kristal vijoličnega

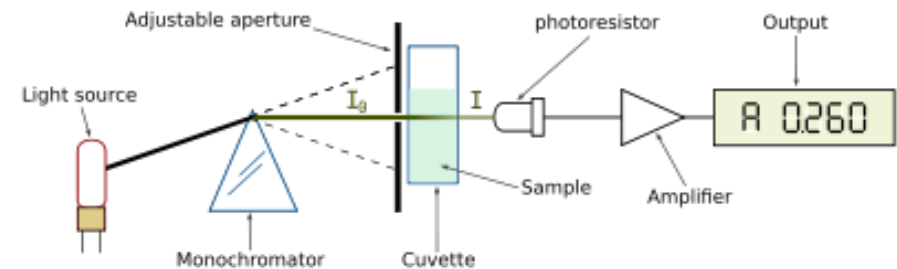
Remobilizacija kristal vijoličnega v 96 % etanolu

Meritev absorbance v raztopini pri 620 nm ( $OD_{620}$ )

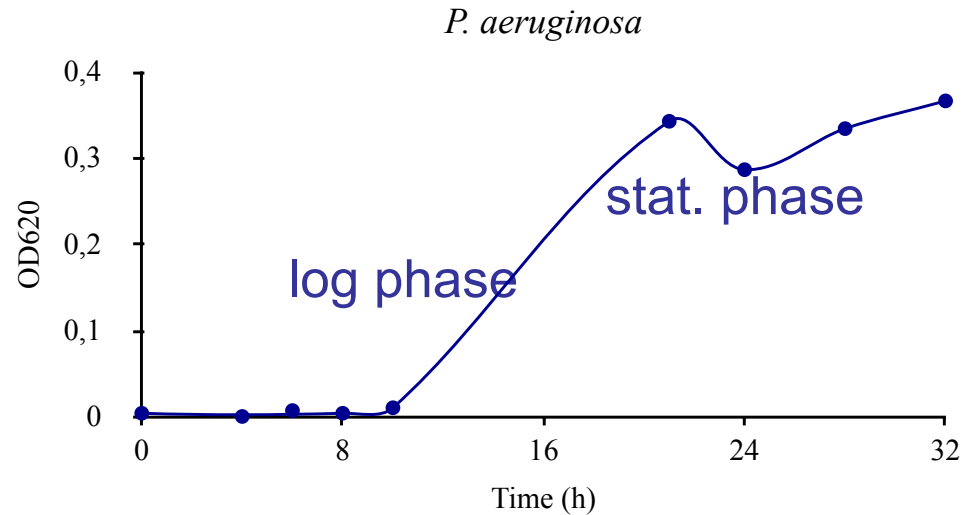
# Meritev adhezije



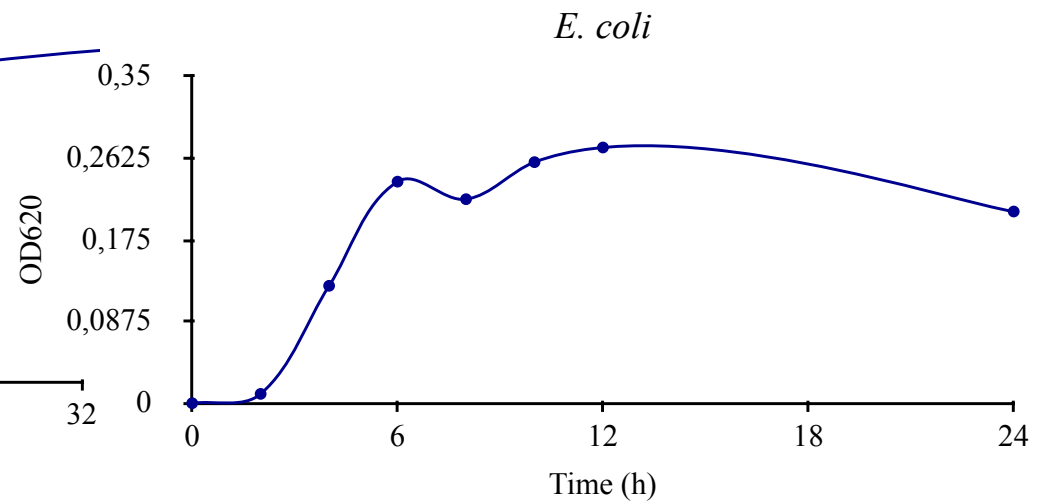
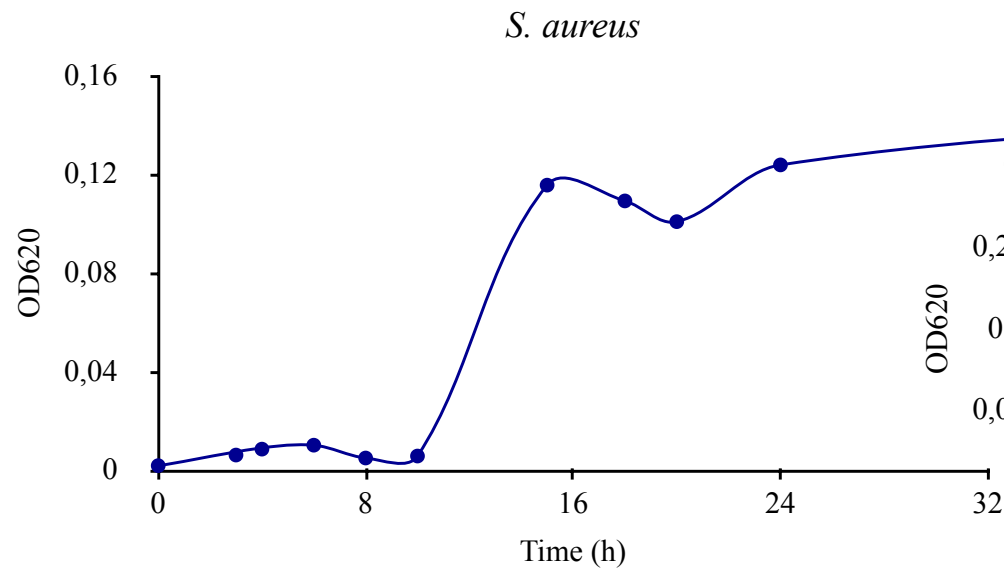
- 6 mikrotiterskih ploščic
- Slike dveh različnih steklenih površin koloniziranih s bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*
- *Suspenzija obarvana s kristal vijoličnim*
- C-kontrola brez bakterij
- Optična gostota izmerjena s spektrofotometrom
- Beer-Lambertov zakon



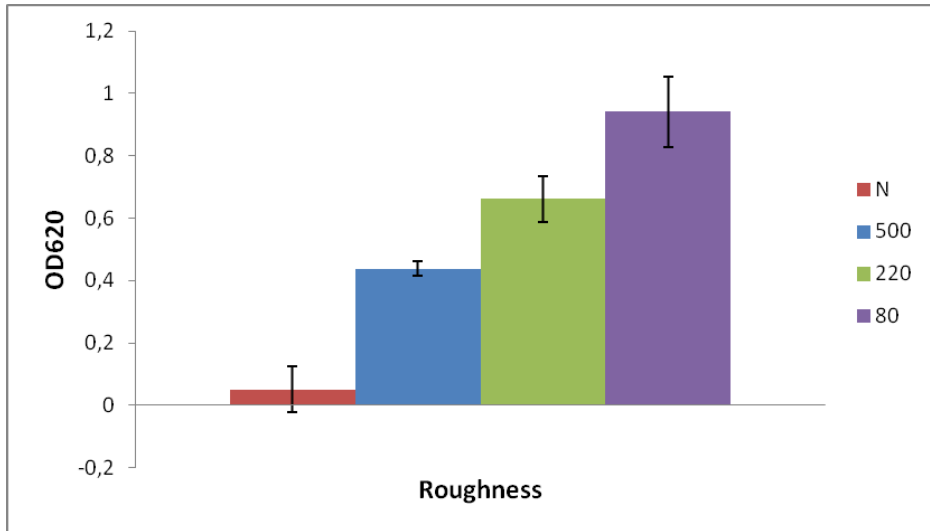
# Rastna krivulja



- *Preudomonas aeruginosa*
- Po 18 urah inkubacije so bakterije v območju eksponentne rasti
- Rast do približno  $1,6 \times 10^9$  CFU/ml



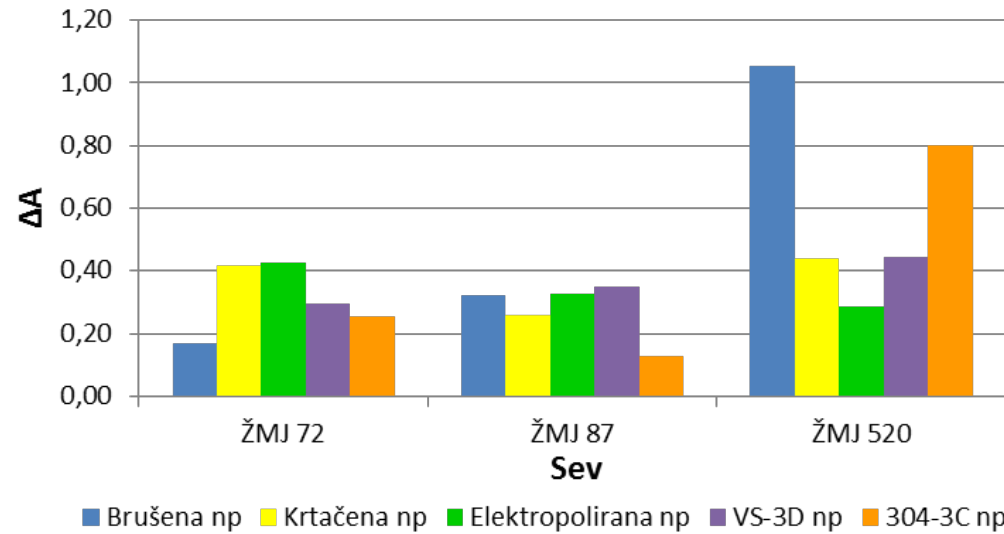
# Adhezija-rezultati



*Pseudomonas aeruginosa*  
**ATCC 27853**

- Izmerjene absorbance adheriranih celic
- Adhezija bakterij narašča z naraščajočo hrapavostjo površine
- Adhezija je odvisna od vrste bakterije

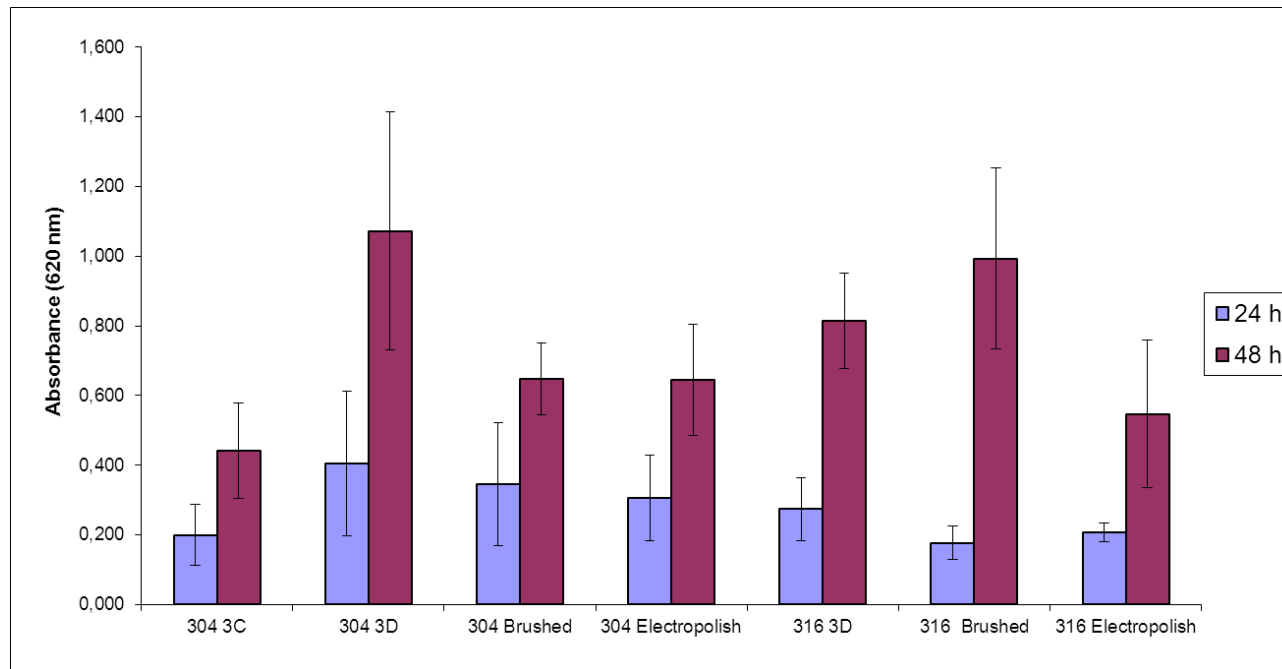
# Adhezija-rezultati



ŽMJ72 *Staph. aureus*

ŽMJ87 *P. aeruginosa*

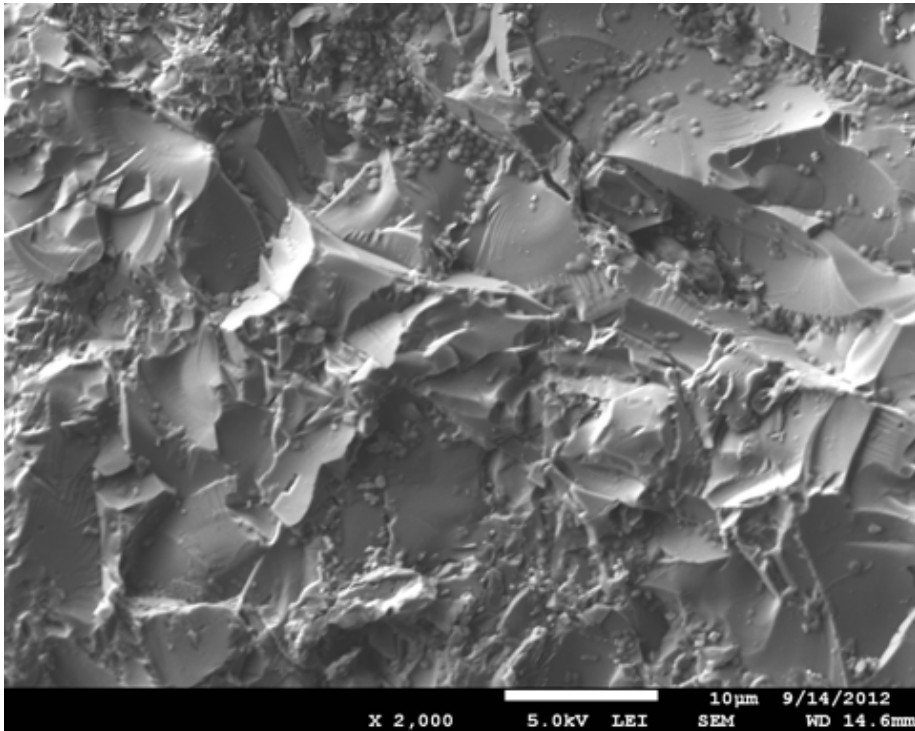
ŽMJ 520 *L. monocytogenes*



*Pseudomonas  
aeruginosa*

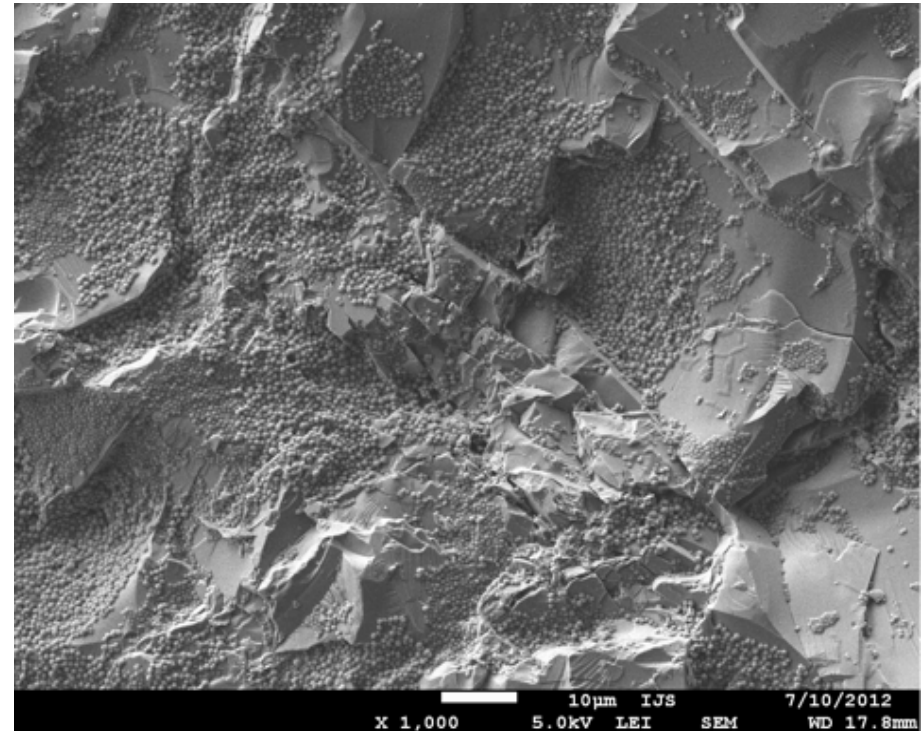
# SEM

*S. aureus*, površine brušene z gradacijo P220



Začetek (čas  $t=0$ )

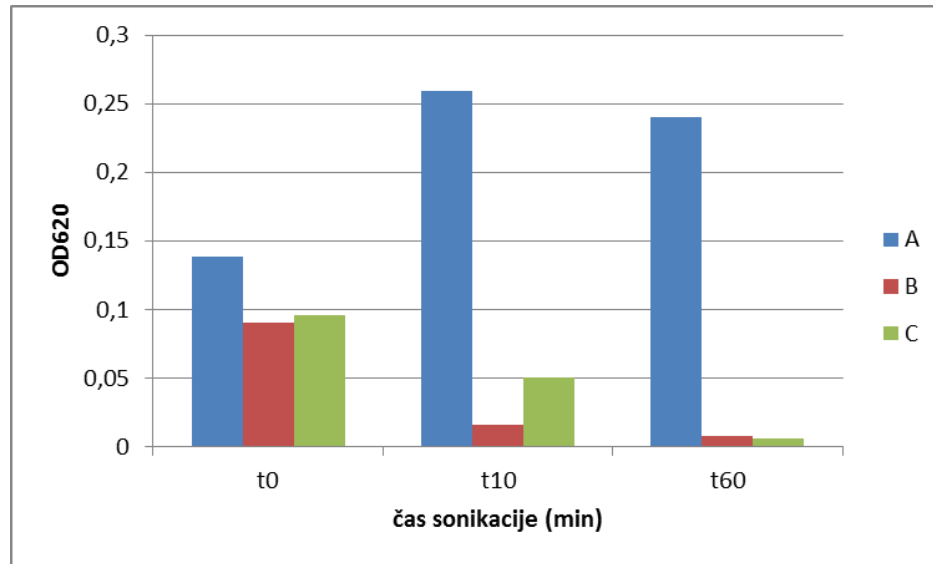
Večina bakterij se nabere v razpokah in režah. Ravni deli površine niso pokriti.



po osmih urah

Poleg rež so z mikroorganizmi pokriti tudi ravni deli površine.

# Odstranjevanje z UZ



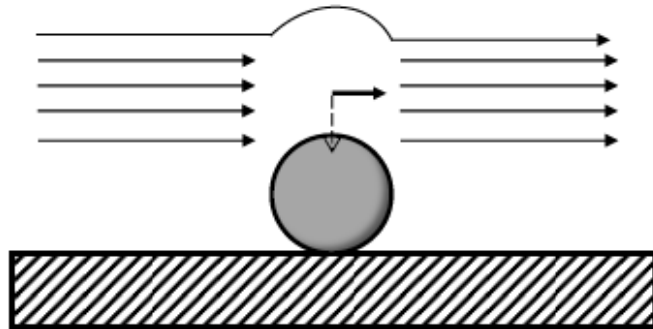
- Delna odcepitev bakterij s površine
- **Vendar bakterije še ostanejo na površini**
- Preostale bakterije odstranimo z UV svetlobo

- **A: 30 W**
  - **B, C: 300 W**
- 40 kHz

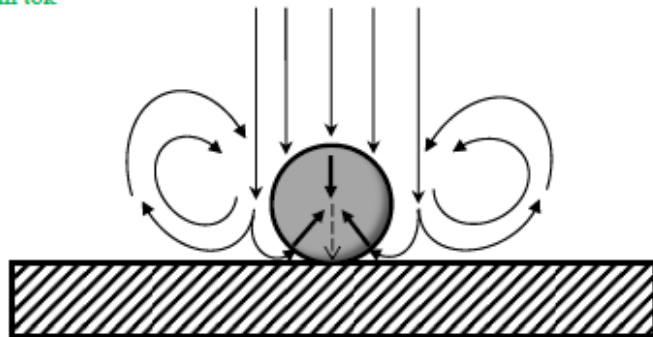


# Vpliv strižnih sil na odstranjevanje mo

Laminarni tok



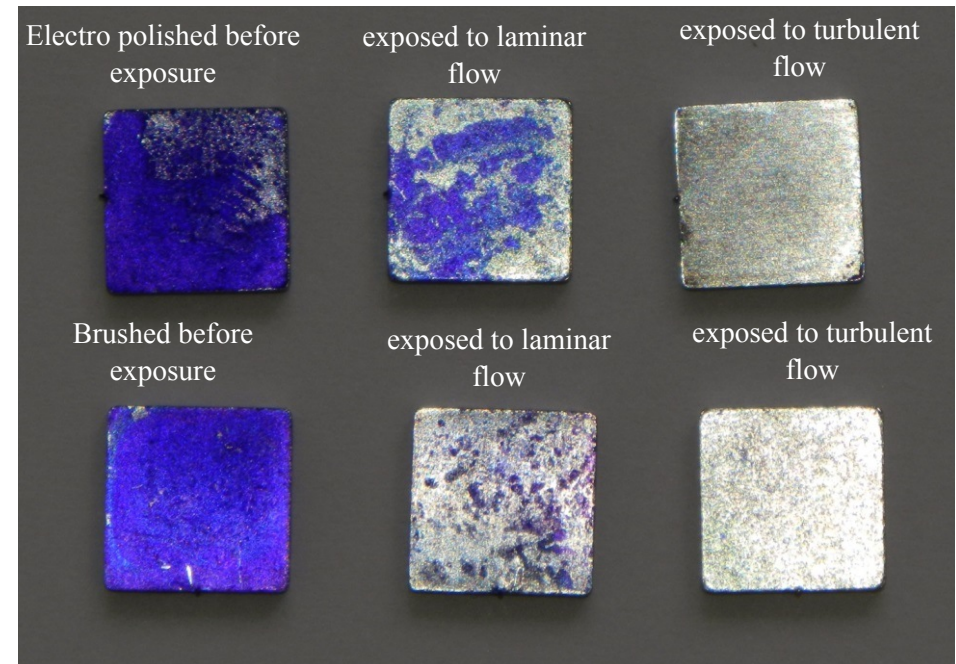
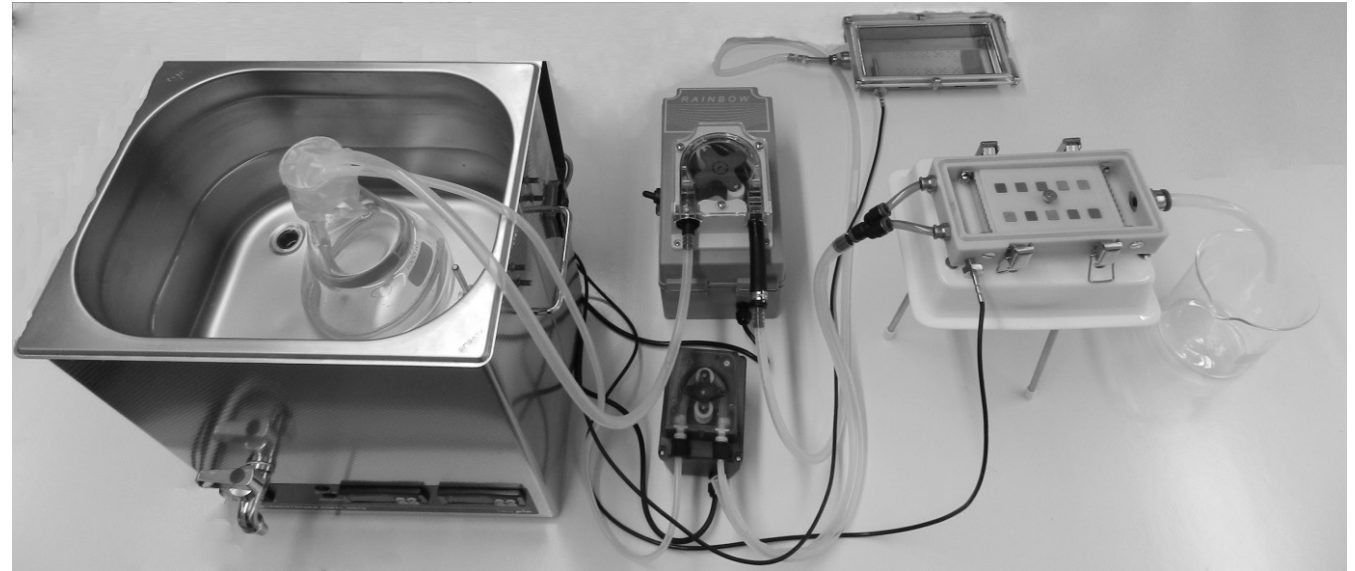
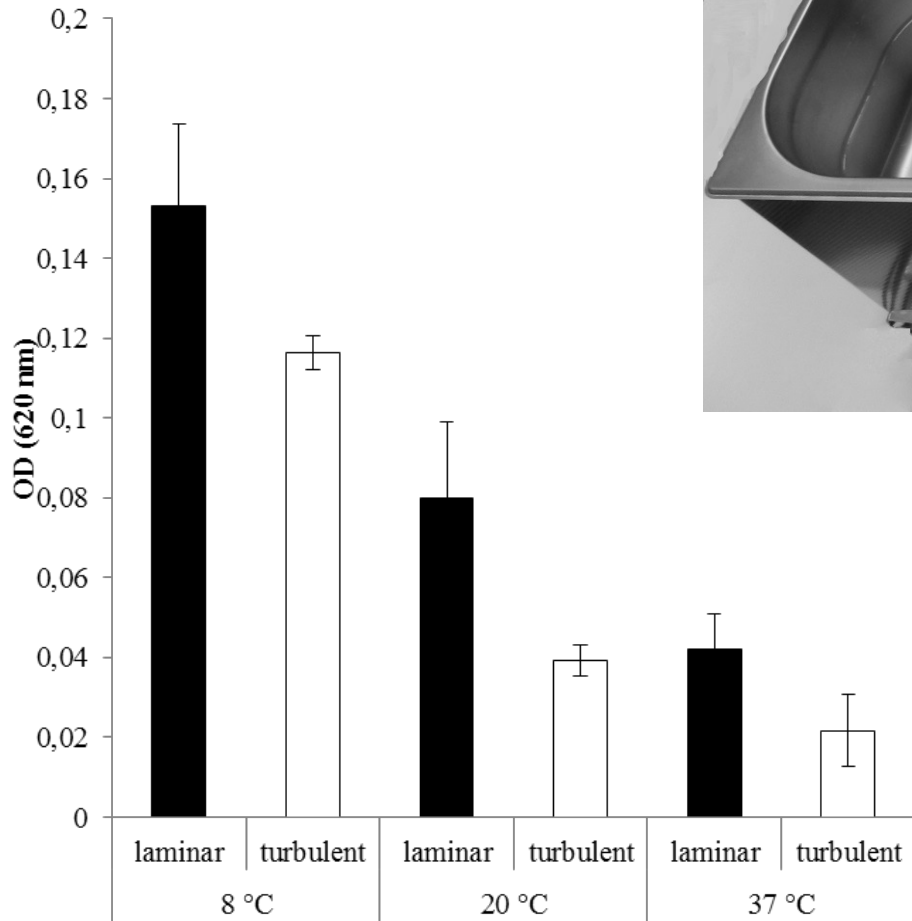
Turbolentni tok



legenda: --> adhezija bakterije  
-> tok tekočine  
-> strižne sile

- *E. Coli*
- vpliv laminarnega in turbulentnega toka
- vpliv temperature
- vpliv hrapavosti površine

# Vpliv toka tekočine na odstranjevanje mo



# Zaključek

- Rezultati kažejo, da **stopnja adheriranih bakterij narašča z naraščajočo hrapavostjo površin**
- Razlog je kombinacija relativno povečane površine in naraščajoče število defektov v sami površini
- **Stopnja adhezije je bakterijsko specifična**
- Relativno povečanje stopnje adhezije je odvisno od zeta potenciala bakterij
- **Turbolentni tok tekočine bolje odstranjuje bakterije kot laminarni tok**

# Načrtovani eksperimenti

- Vpliv temperature na adhezijo
- Vpliv koncentracije glukoze na adhezijo
- Pritrjevanje bakterij iz laminarnega oz. turbulentnega toka na površine
- Vpliv dezinfekcijskih sredstev in čistil na adhezijo

# Zahvala

- **Zdravstvena fakulteta, UL** (K. Godič Torkar, M. Jevšnik, R. Fink, M. Oder, D. Nipič)
- **Biotehniška fakulteta, UL** (P. Raspor, B. Jeršek, S. Smole Možina, A. Klančnik, M. Kurinčič, K. Bezek)
- **Veterinarska fakulteta, UL** (A. Kirbiš, S. Pintarič, S. Vadnjal, M. Biasizzo)
- **Inštitut Jožef Stefan, UL** (G. Dražič)
- **Iskra Pio, d.o.o., Šentjernej**