

OTWARTE SEMINARIA IETU

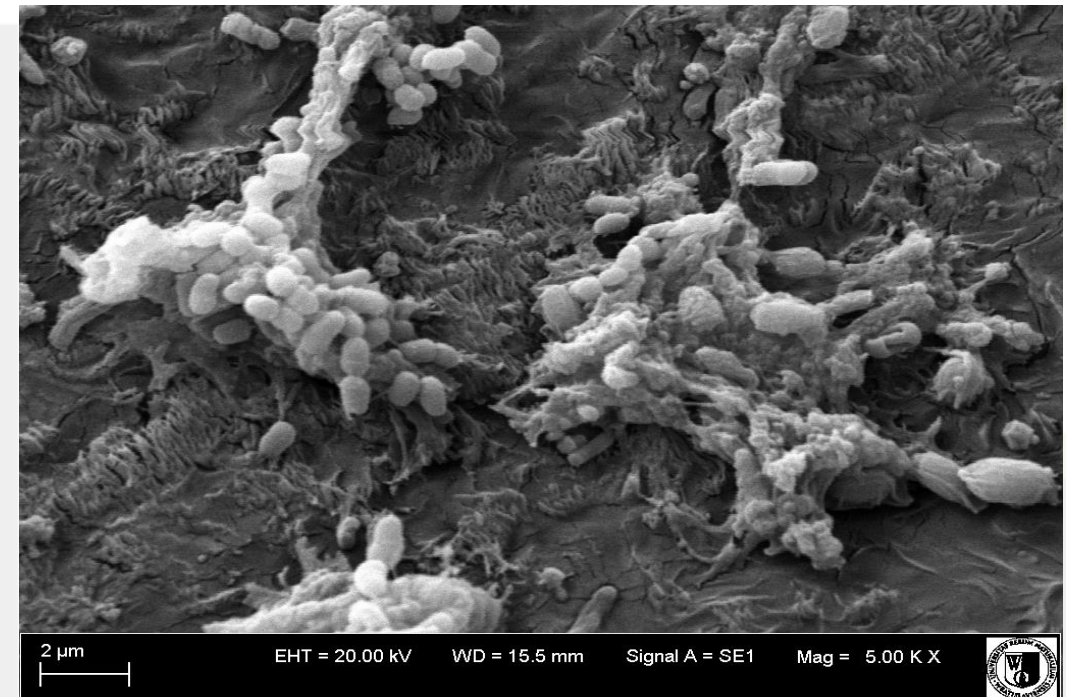
RÓŻNORODNOŚĆ I PROFILE METABOLICZNE BIOFILMU MODELOWEGO DLA SIECI WODOCIĄGOWEJ

Izabela Biedroń

Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych

27.01.2017

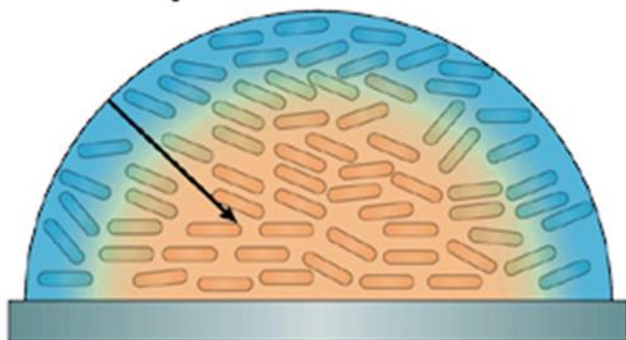
Dynamiczny kompleks zagregowanych drobnoustrojów żyjących w granicach matrycy, powstałej z wydzielanych komórkowo polimerycznych substancji (EPS).



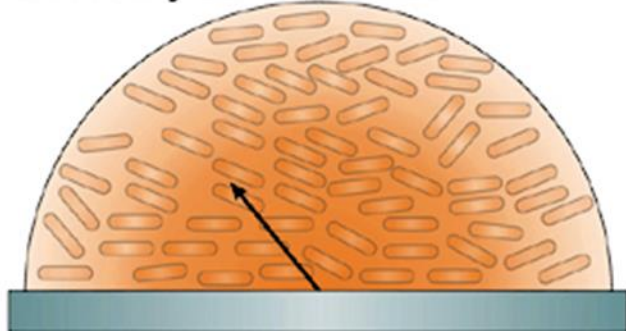
Błona biologiczna na powierzchni wycinka rury z polietylenu. SEM, pow. 3000X

Heterogeniczna struktura

Substraty metabolizmu



Produkty metabolizmu



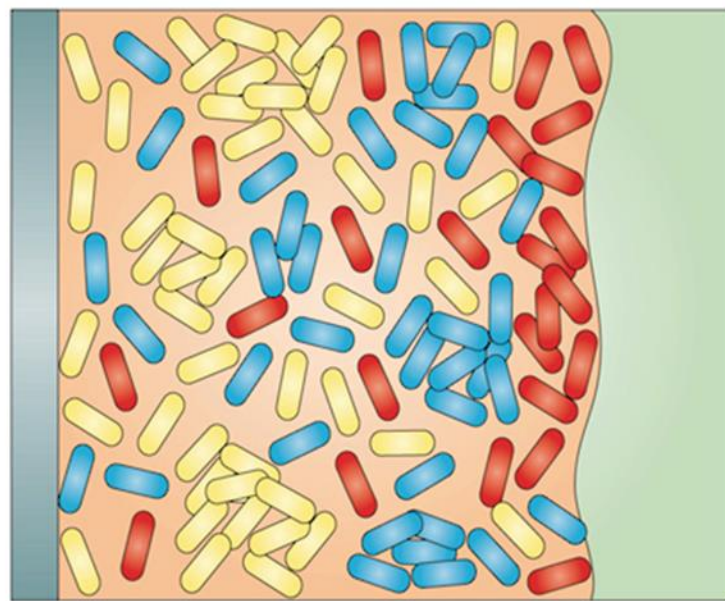
Bakterie redukujące
siarczany



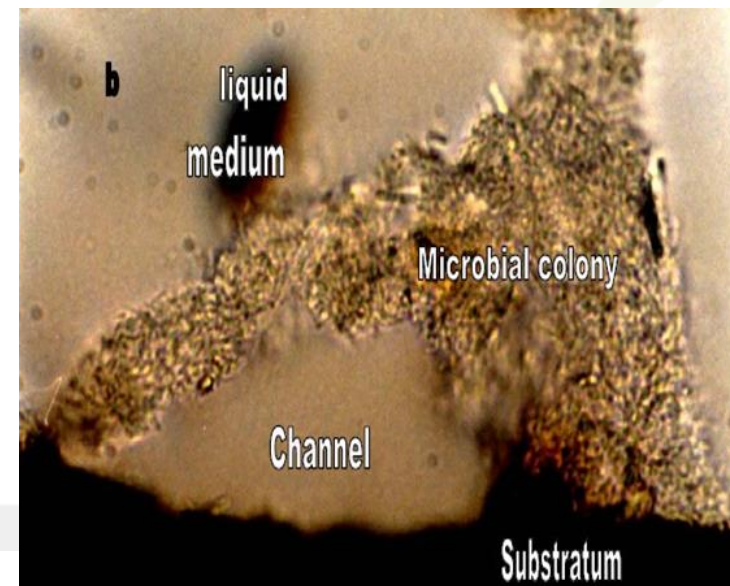
Bakterie utleniające
siarczki



Tlenowe
heterotrofy

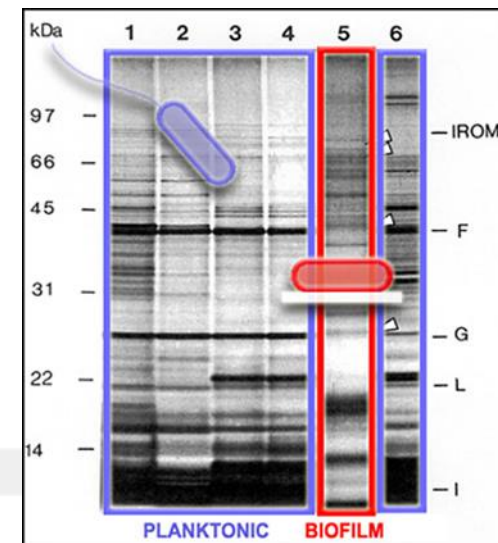


Biofilm

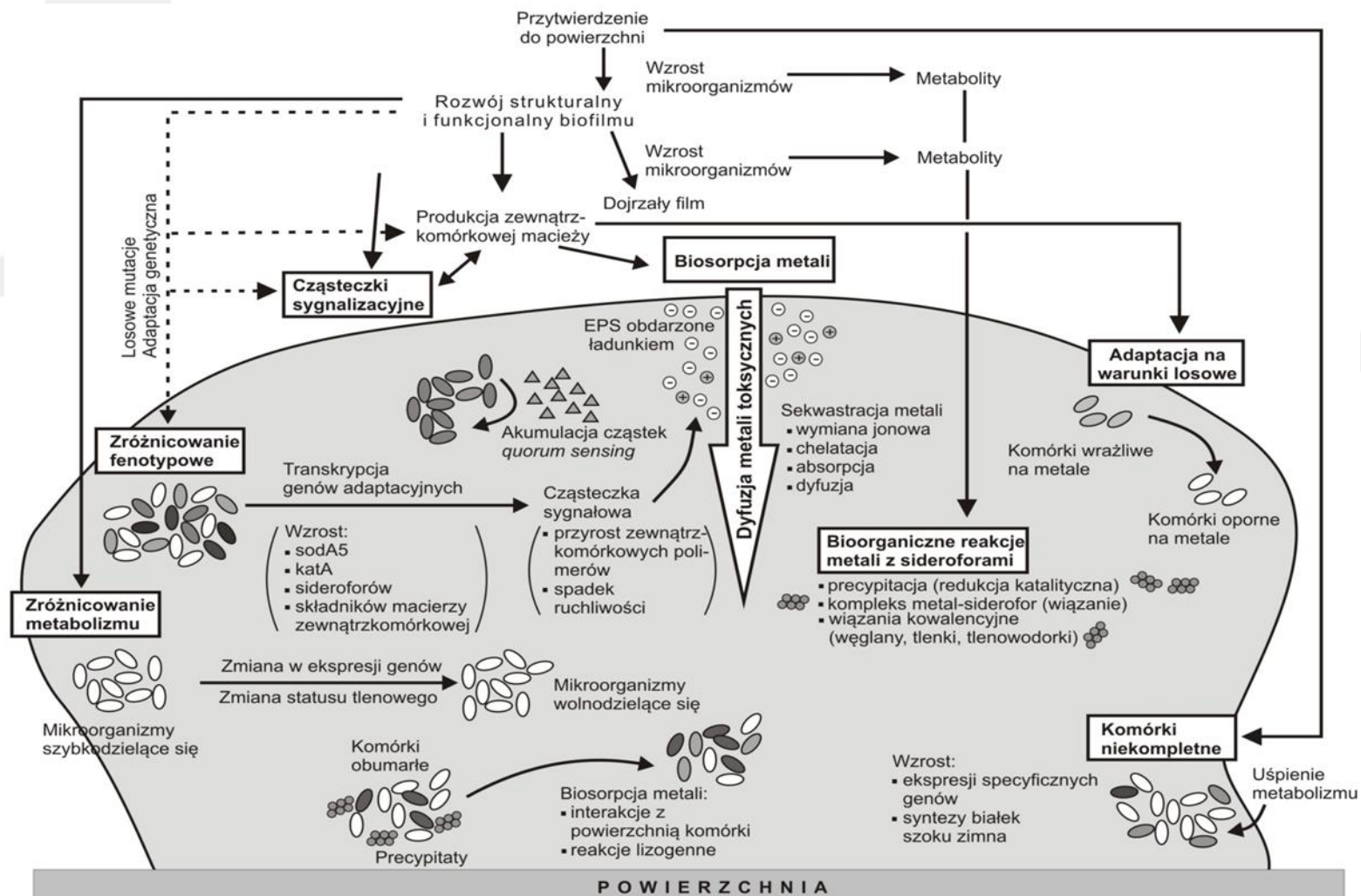


Genetyczna różnorodność

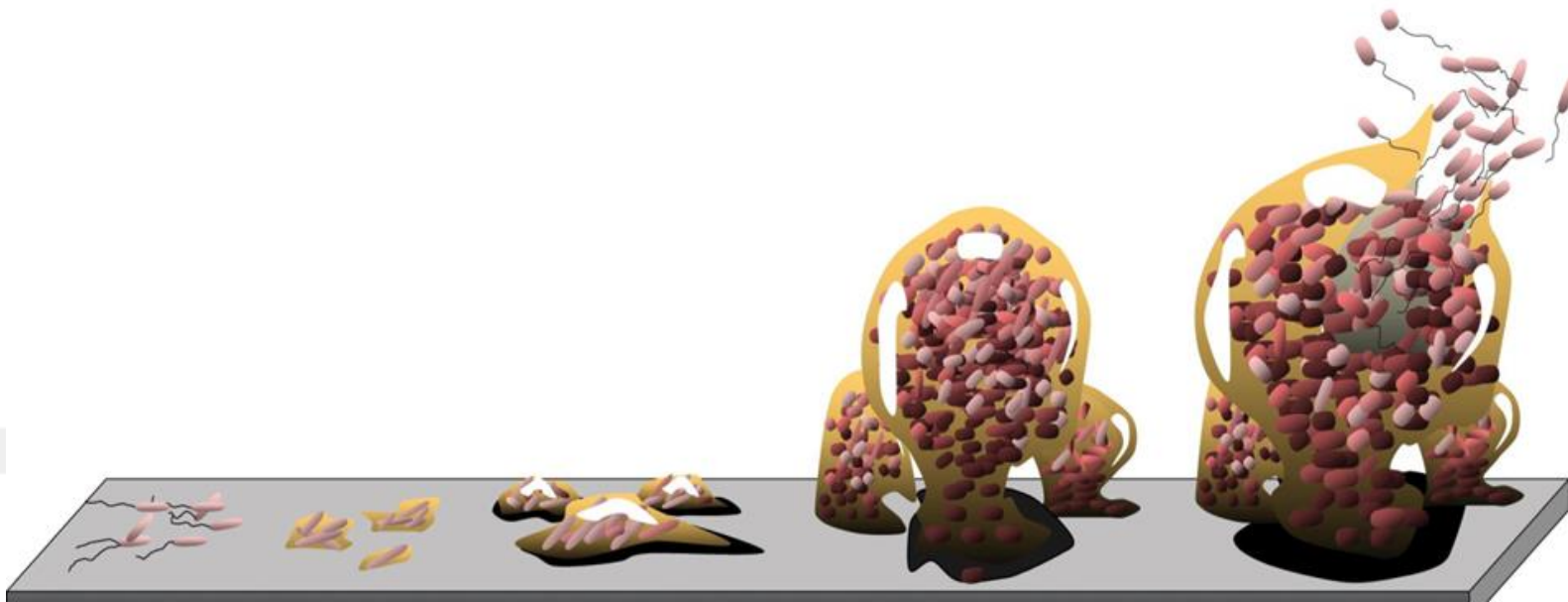
- Bakterie żelazowe: *Gallionella ferruginea*,
Thiobacillus ferrooxidans.
- Bakterie siarkowe: *Thiobacillus*, *Clostridium*.
- Patogeny oportunistyczne: *Aeromonas*,
Pseudomonas, *Legionella*, *Salomonella*,
Escherichia.
- Grzyby: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*.
- Bakterie nitryfikacyjne i denitryfikacyjne.



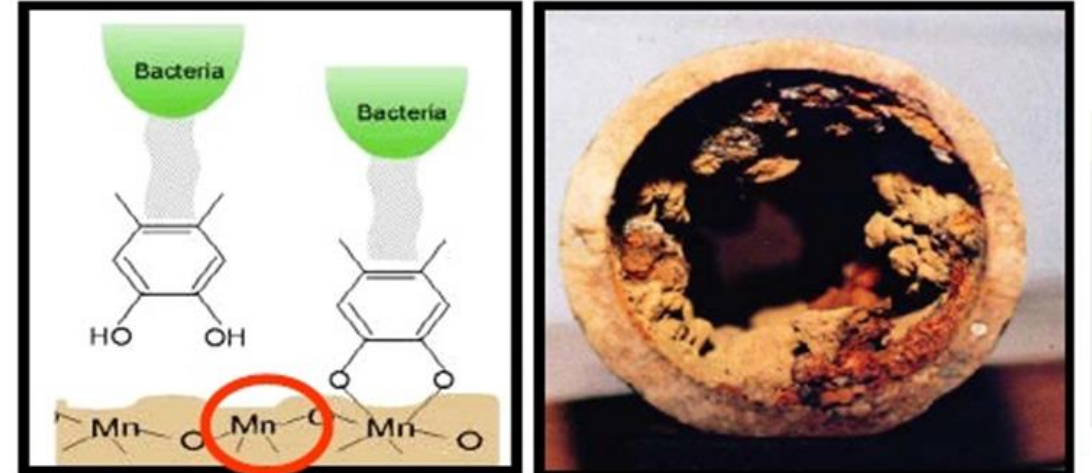
Złożone interakcje między drobnoustrojami



BIOFILM- POWSTANIE DOJRZAŁEJ STRUKTURY



- Biokorozja sieci i urządzeń wodociągowych.
- Pogorszenie jakości wody (smak, zapach).
- Rezerwuar antybiotykoopornych i oportunistycznych patogenów.



○ Jakość wody wodociągowej zależy od:

- Rodzaju materiału i wieku rurociągu;
- Parametrów fizyko- chemicznych;
- Parametrów organoleptycznych;
- Parametrów mikrobiologicznych.





O charakterze fizyczno-chemicznych

- Wpływ materiału instalacji na jakość wody
- Wpływ składu wody na materiał instalacji
- Powstawanie w instalacji stref podciśnienia
- Wpływ czynników zewnętrznych
- Podłączenia instalacji do różnych źródeł wody
- Zbyt mała prędkość przepływu wody
- Zła konserwacja lub eksploatacja instalacji



O charakterze bakteriologicznym

- Zbyt wysoka temperatura wody zimnej
- Zbyt niska temperatura wody ciepłej
- Podłączenie instalacji z dodatkowym źródłem wody, gdzie występują zanieczyszczenia bakteriologiczne

Bakterie:

- Bakterie żelazowe: *Gallionella ferruginea*, *Thiobacillus ferrooxidans*;
- Bakterie siarkowe: *Thiobacillus*, *Clostridium*;
- Patogeny oportunistyczne
- Bakterie nitryfikacyjne i denitryfikacyjne;

Wirusy;

Grzyby:

- *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*;

Formy przetrwalne pasożytów;



E. coli

ZAGROŻENIA EPIDEMIOLOGICZNE

domena *Bacteria* (*Eubacteria*)

- *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio* sp., patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp., *Yersinia* sp., *Listeria* sp., *Legionella* sp., *Aeromonas* sp.,
- inne bakterie heterotroficzne w tym pigmentowe: *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Nocardia* sp.,

domena *Archaea*

- *Cyanobacteria*-cyjanobakterie (sinice),

grzyby mikroskopowe

- *Sporocybe* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp.,

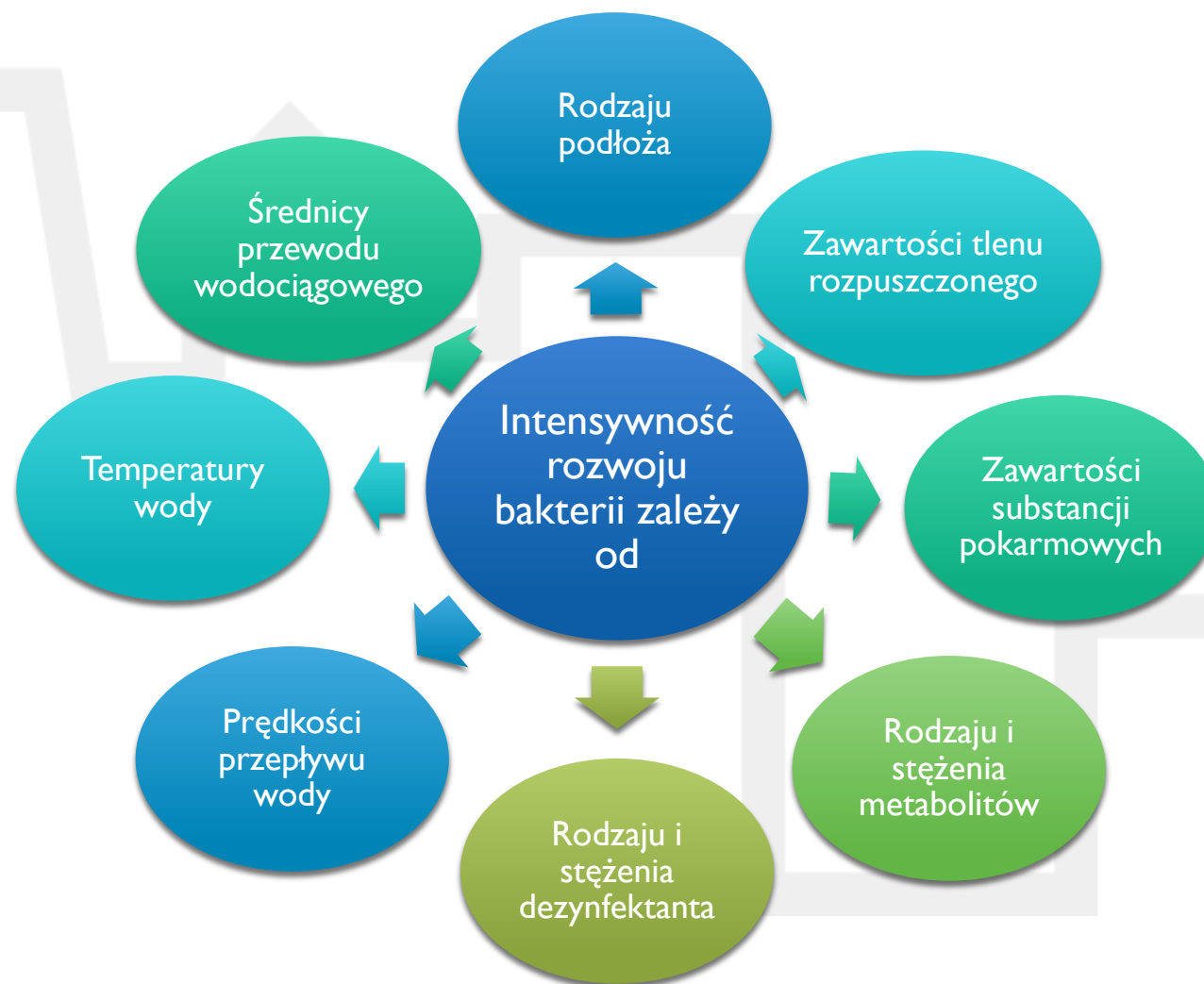
wirusy

- RNA wirusy – *Picornaviride*., *Reoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*,
- DNA wirusy- *Adenoviridae*, enterowirusy,

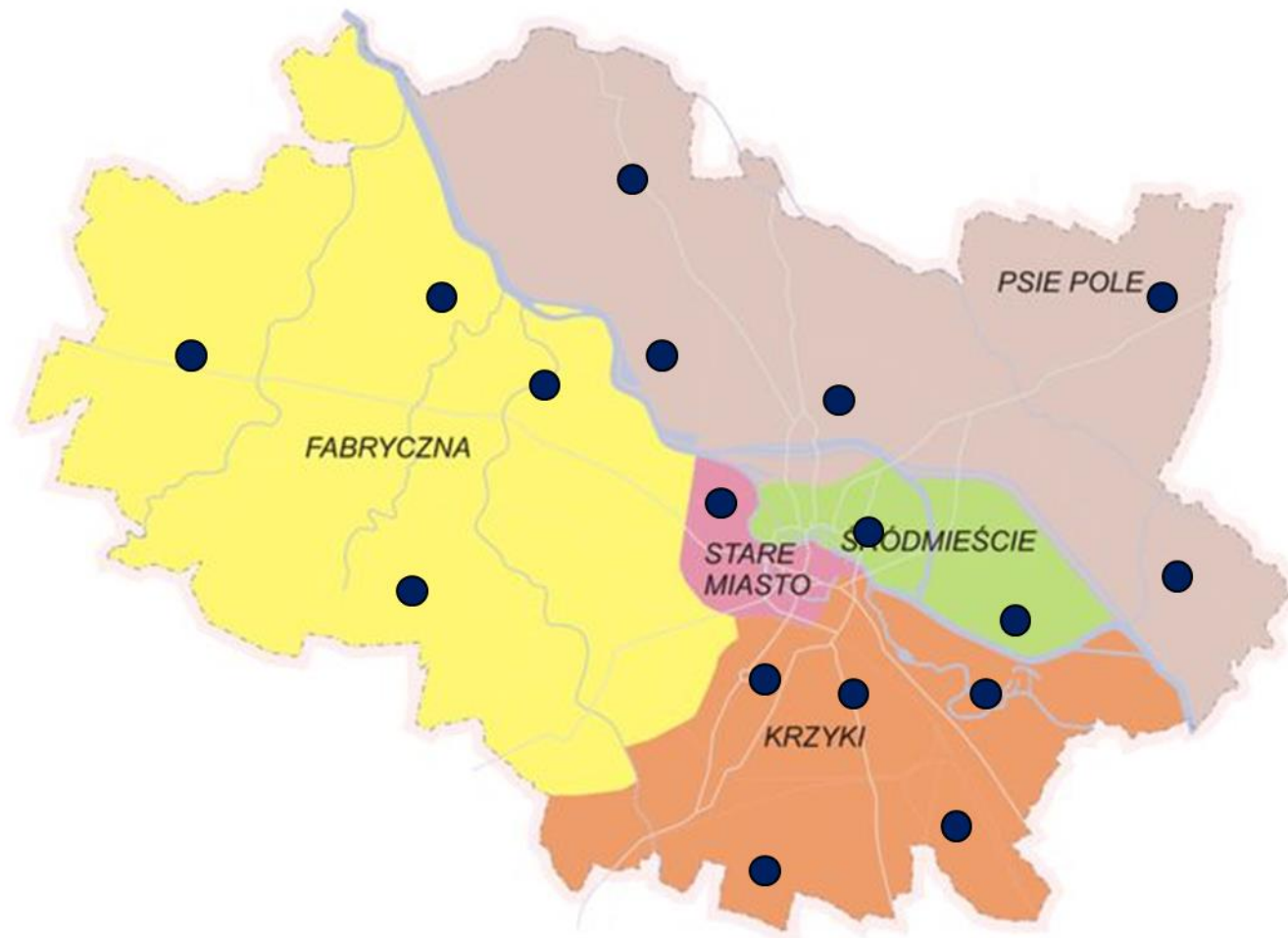
pierwotniaki (*Protista*)

- *Acanthamoeba* spp., *Balantidium coli*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., *Entamoeba histolytica*, *Gardia intestinalis*, *Isospora belli*, *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma gondii*

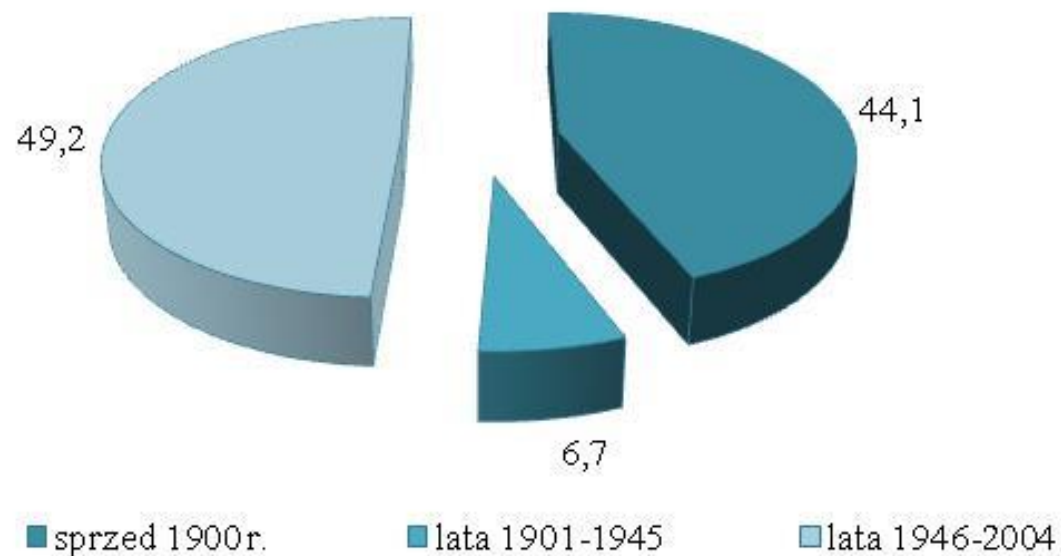
PRZYCZYNY I SKUTKI ROZWOJU OBROSTÓW BIOLOGICZNYCH



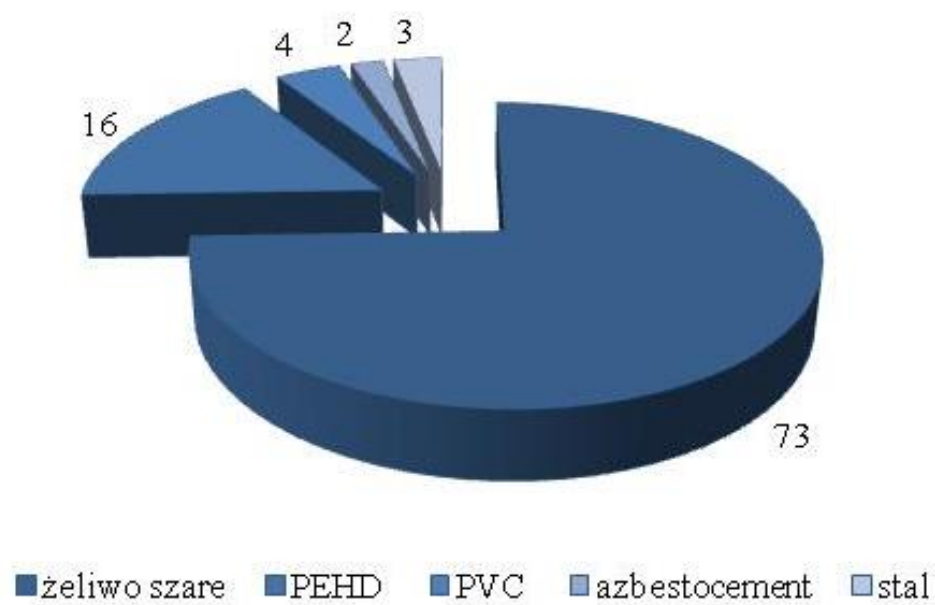
POBÓR PRÓBEK



STRUKTURA PRZEWODÓW WODOCIĄGOWYCH

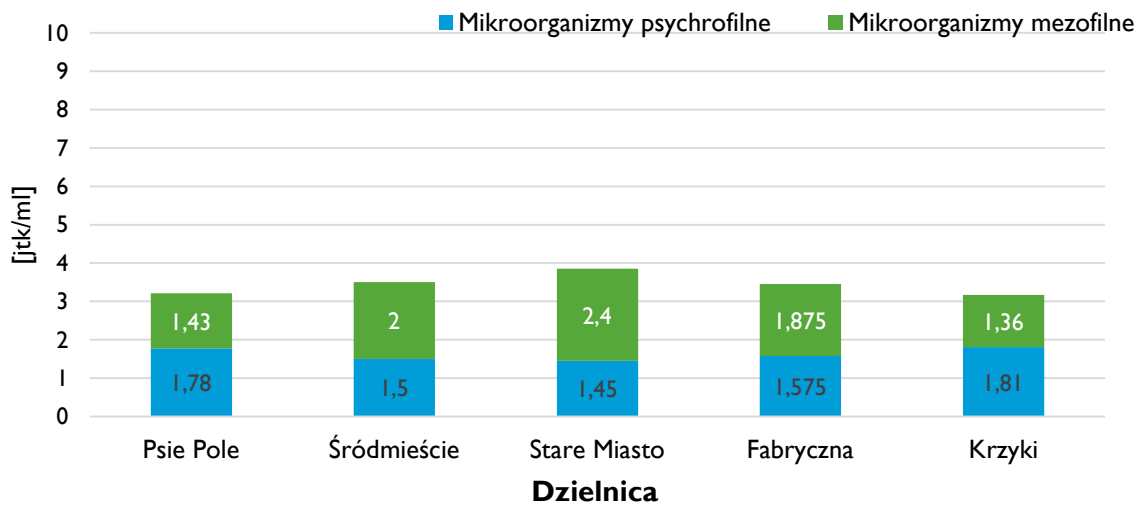


Struktura wiekowa

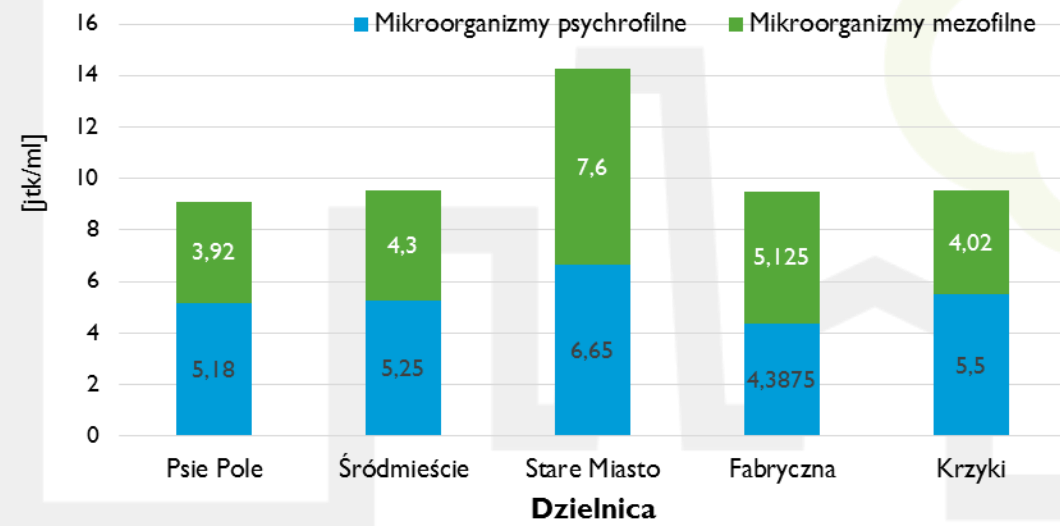


Struktura materiałowa

- Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi:
 - liczba mikroorganizmów planktonicznych psychro- i mezofilnych;
 - mikroorganizmy wskaźnikowe: mikroorganizmy z grupy coli i *E.coli*, paciorkowce kałowe (enterokoki) i *Clostridium*.
- w przypadku podłoża R2A uzyskiwano wyniki od 1,55 do 5,2 razy wyższe niż w przypadku podłoża zalecanego w Rozporządzeniu;

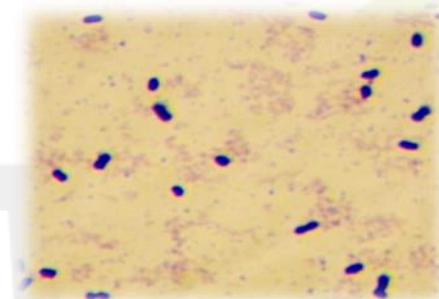
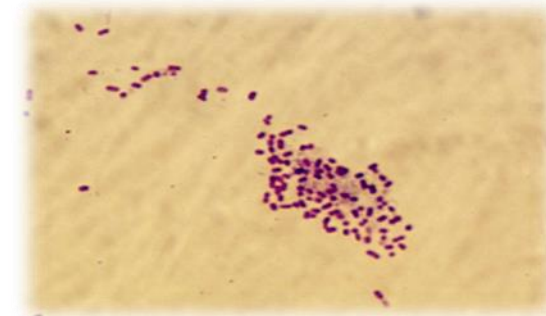
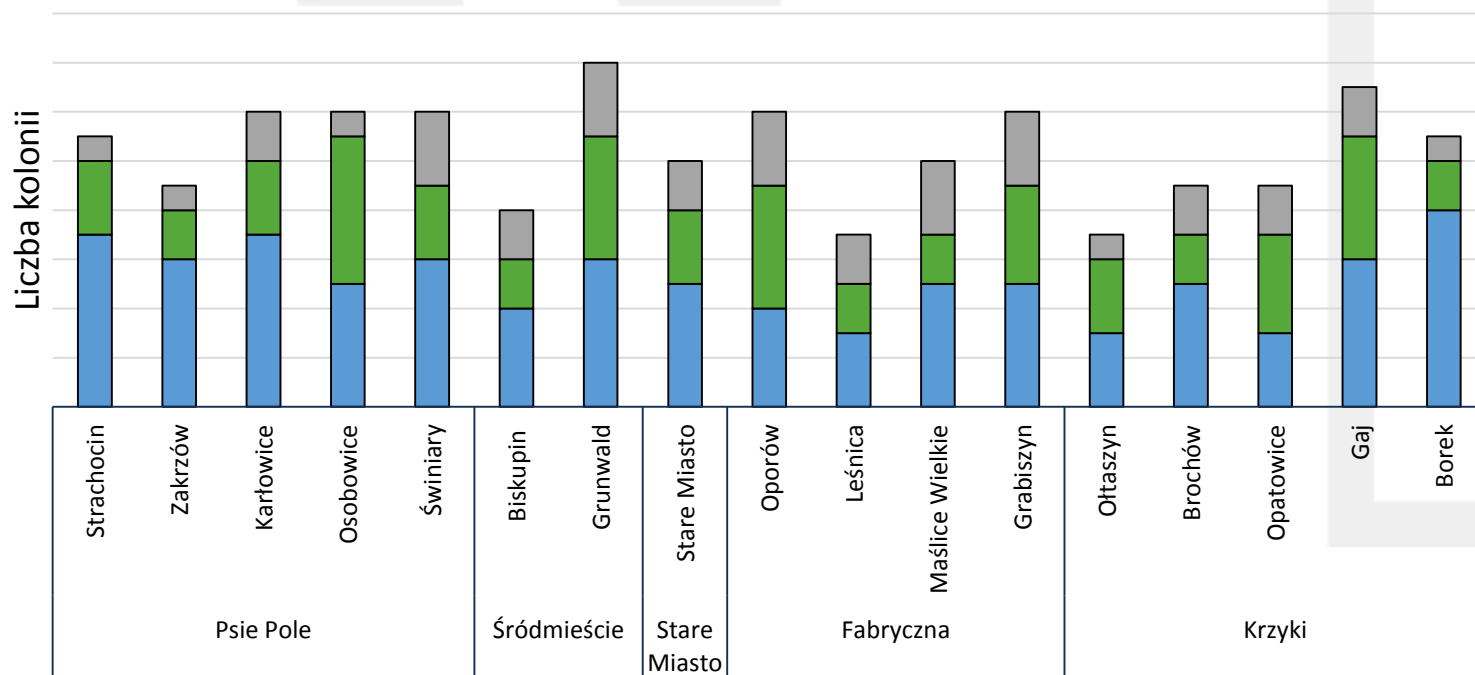


Podłoże zgodne z normą



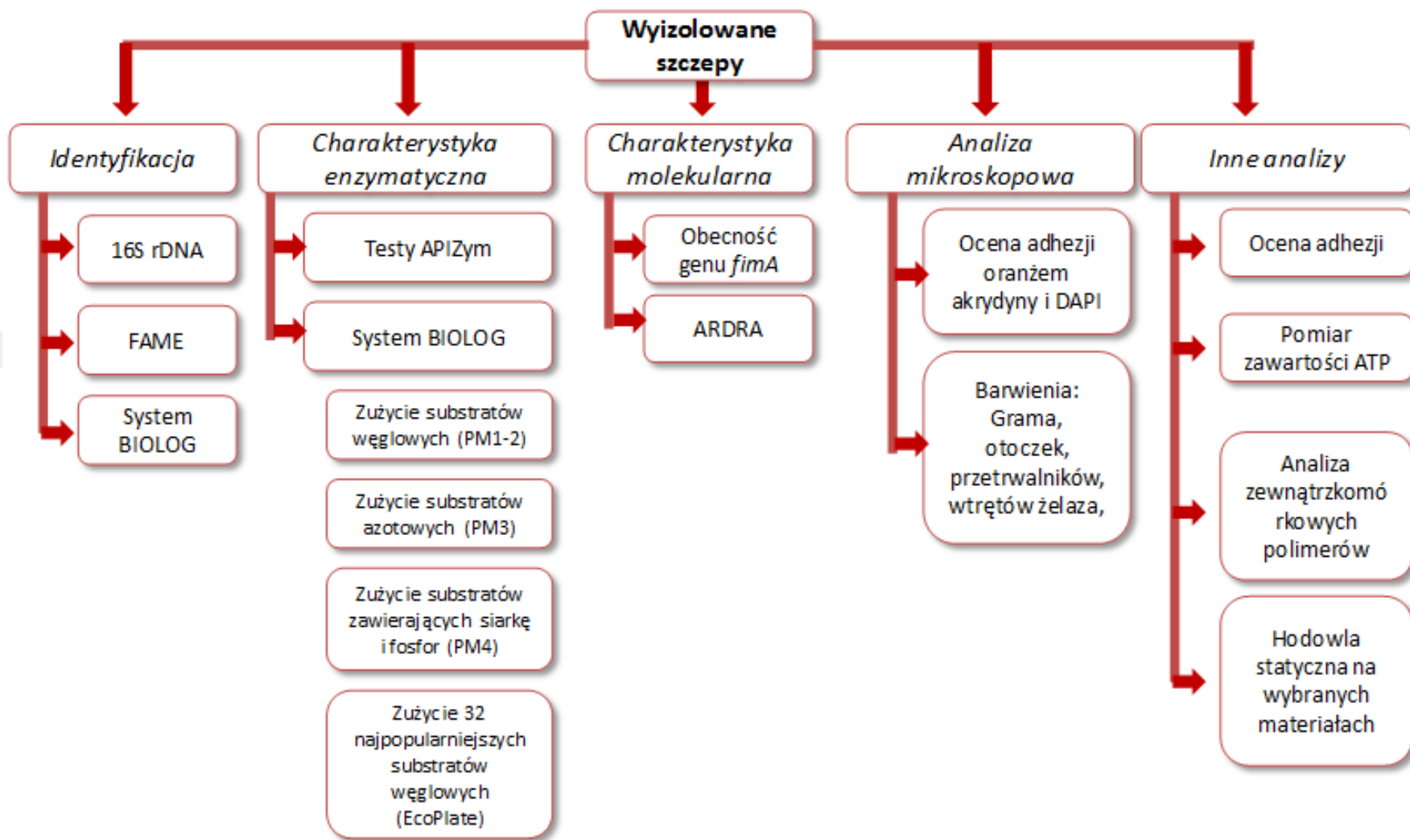
Podłoże R2A

- 2020 szczepów → morfologia kolonii 178 szczepów.
- Podłoża różnicujące
- Barwienie Grama.
- Ocena zdolności do adhezji.
- Oporność na antibiotyki i chemioterapeutyki.
- Testy enzymatyczne.



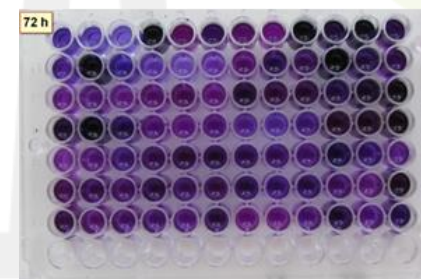
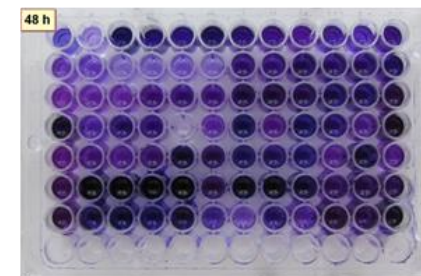
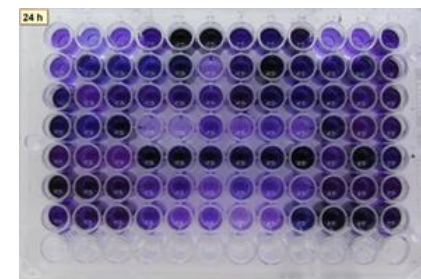
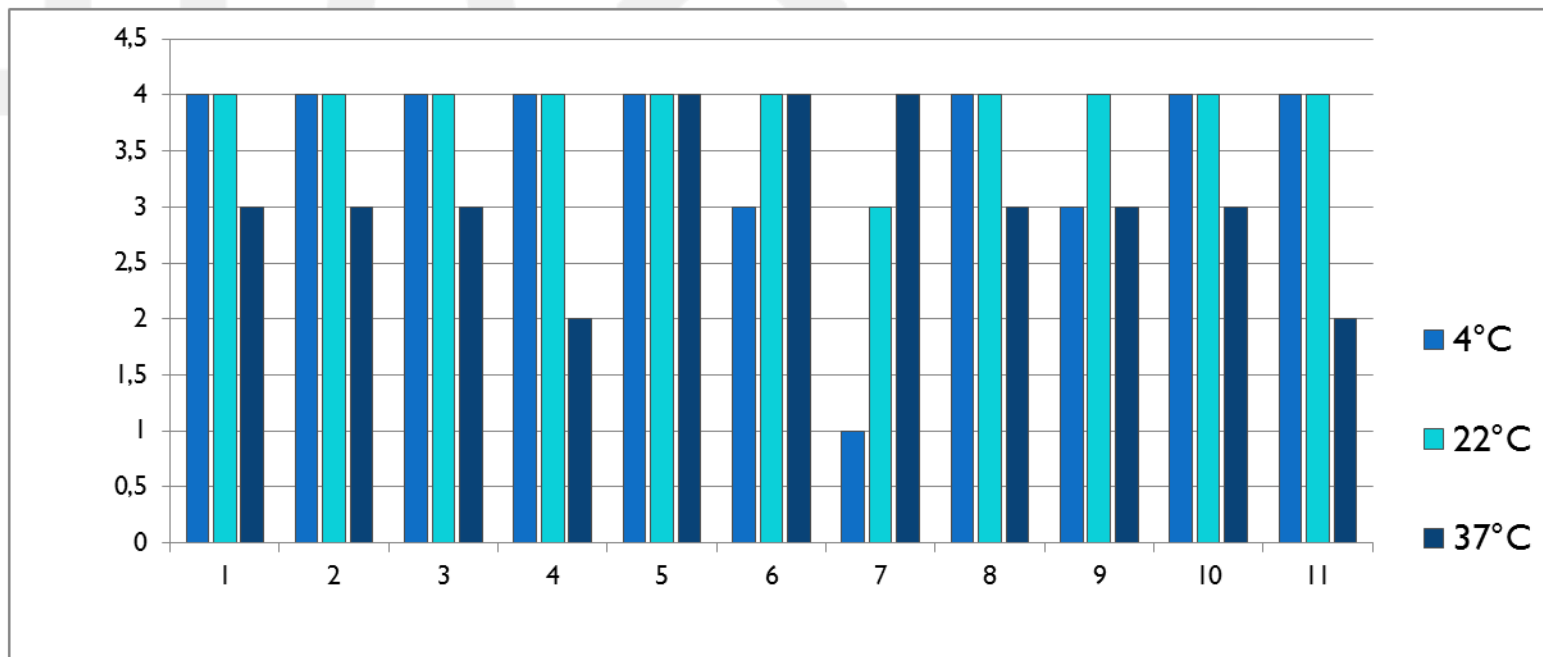
*Bioróżnorodność błony biologicznej
w wybranych punktach*

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW



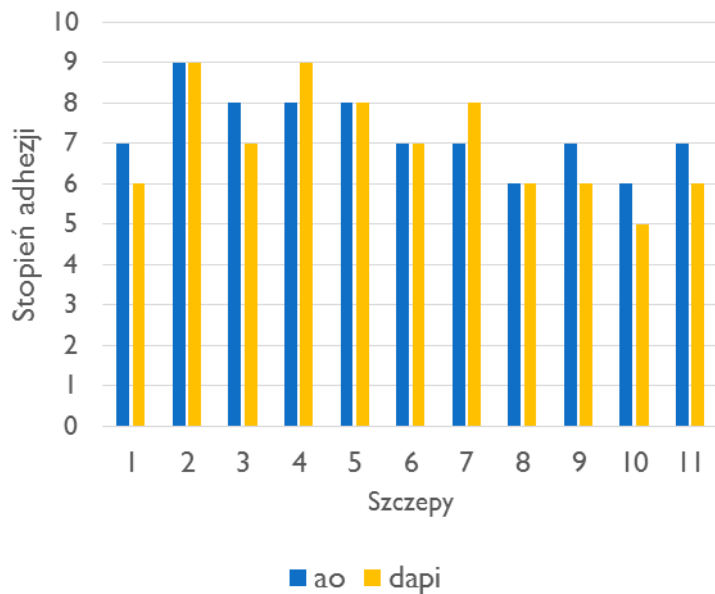
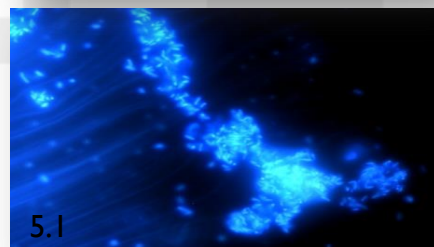
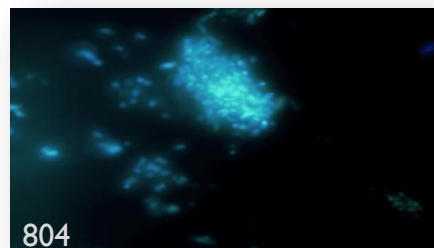
OCENA ADHEZJI

- Metoda kolorymetryczna wg Musk'a,
- Wariant 24-48-72h,
- Wariant 4-22-37°C.



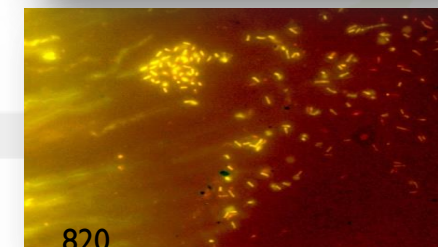
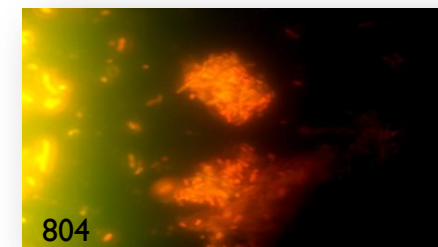
DAPI

- 4',6-diamidyno-2-fenylindol;
- Wiąże się z DNA;
- Absorpcja 358 nm
- Emisja 461 nm;



Oranż akrydyny

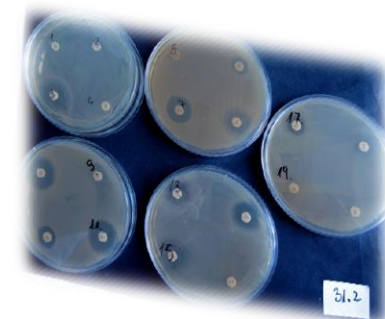
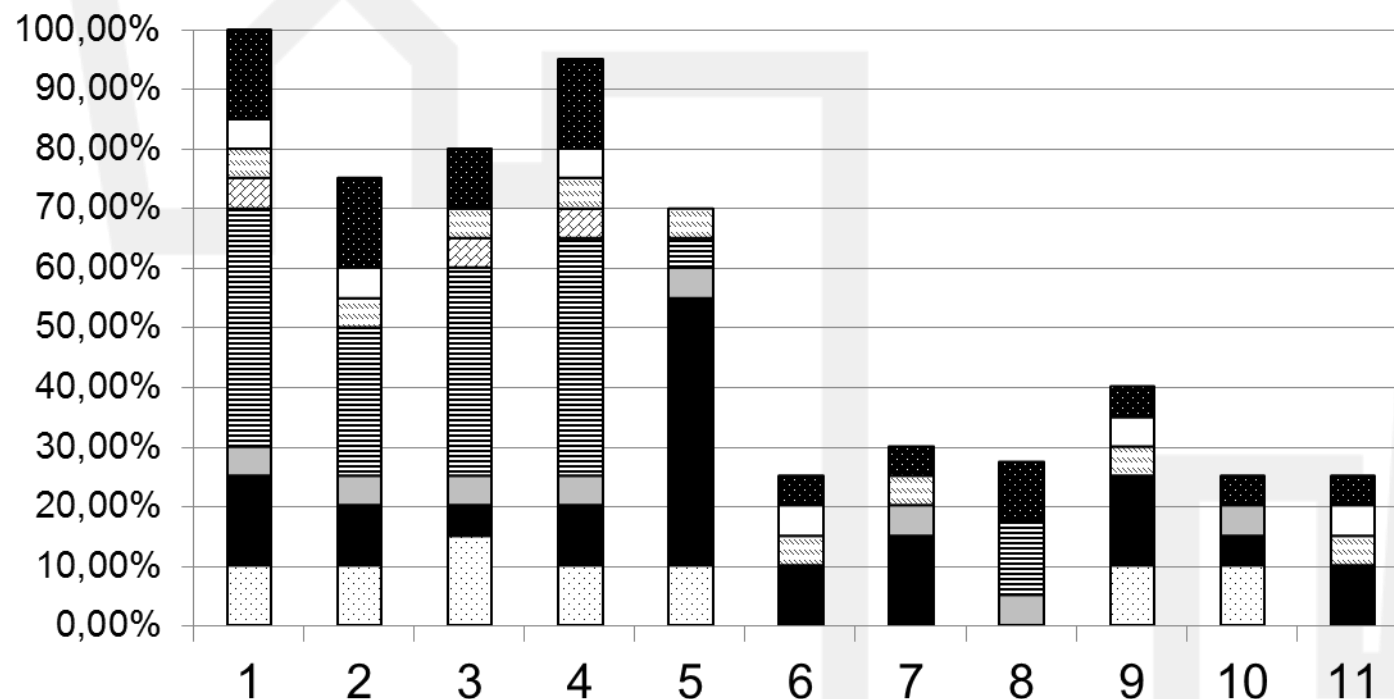
- Wiąże się z DNA i RNA;
- Absorpcja 498 nm;
- Emisja 520nm;



| Stopień | Kryterium |
|---------|--|
| 1 | od 0 do 5 komórek w polu widzenia; |
| 2 | od 5 do 50 komórek w polu widzenia; |
| 3 | tylko pojedyncze komórki, brak mikroskopisk; |
| 4 | pojedyncze komórki + małe mikroskopiska; |
| 5 | duże skupiska, ale nie łączące się + pojedyncze komórki; |
| 6 | łączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki; |
| 7 | ¼ pola widzenia pokryta biofilmem; |
| 8 | ½ pola widzenia pokryta biofilmem; |
| 9 | całe pole widzenia pokryte biofilmem |

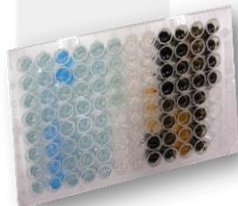
ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ

- Penicyliny;
- Cefalosporyny;
- Chinolony;
- Aminoglikozydy;
- Tetracykliny;
- Sulfonamidy;
- Ryfampicyny;
- Inne
 - chloramfenikol,
 - nirofurantoina,
 - nowobiocyna.

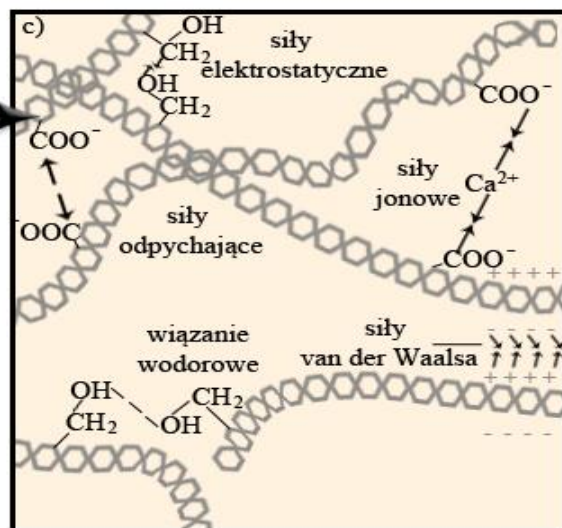
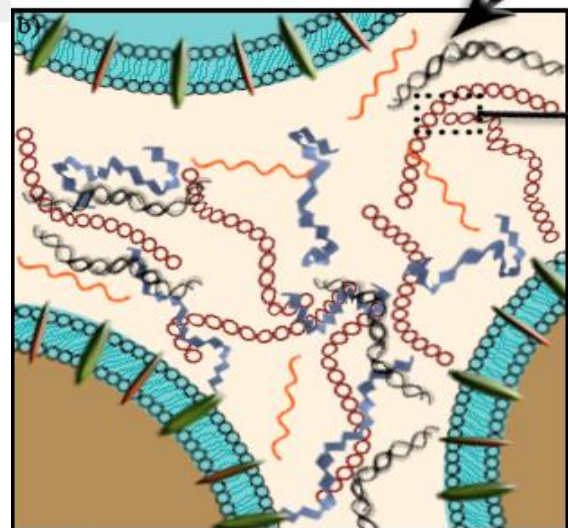


- inne
- rifampicyny
- ▨ sulfonamidy
- ▩ tetracykliny
- ▧ aminoglikozydy
- chinony
- cefalosporyny
- ▤ penicyliny

BIOFILM- SKŁAD ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH BIOPOLIMERÓW



a)



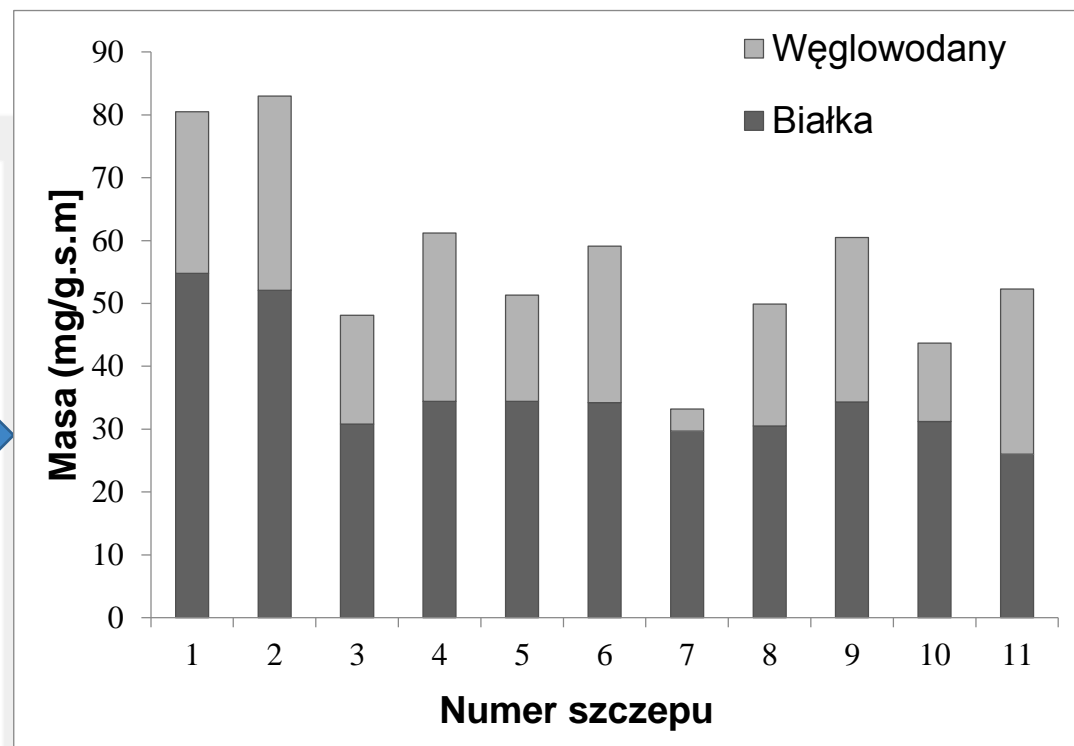
Bakterie błony biologicznej

Kwasy tłuszczowe

Polisacharydy

Białka

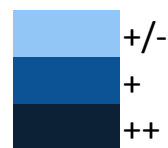
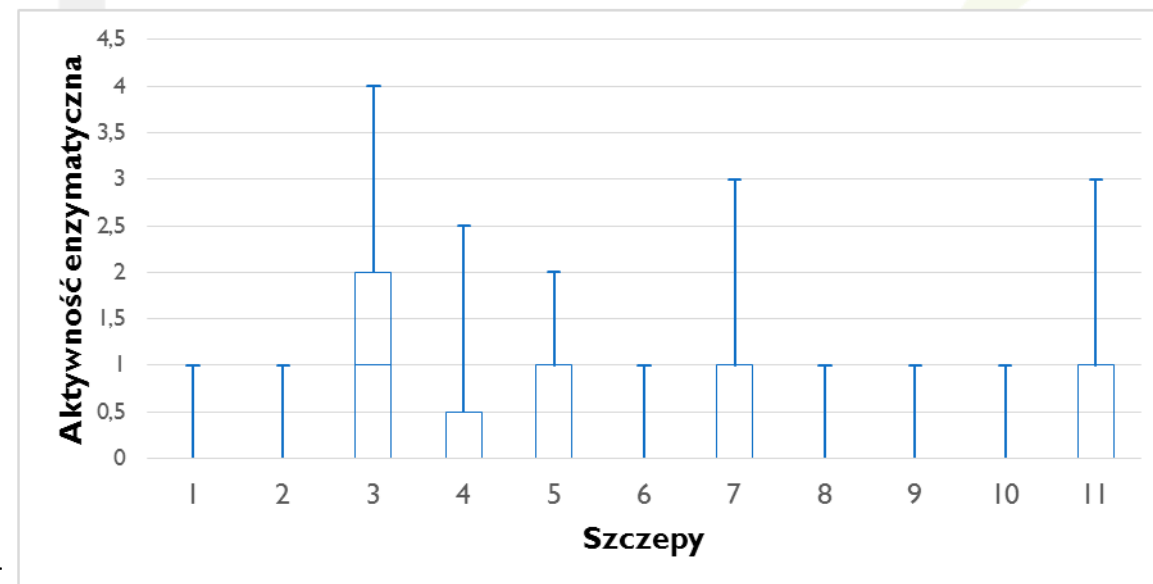
Kwasy nukleinowe



CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH SZCZEPÓW

| Enzymy | Szczepy | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Kontrola | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fosfataza zasadowa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Esteraza C-4 | + | - | + | +/- | + | - | - | - | - | - | + |
| Lipaza esterazowa C-8 | - | - | - | - | - | - | ++ | - | - | - | - |
| Lipaza C-10 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Arylamidaza leucynowa | + | * | ++ | ++ | +/- | - | + | - | - | - | ++ |
| Arylamidaza walinowa | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arylamidaza cysteinowa | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Trypsyna | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| alfa- chymotrypsyna | - | - | ++ | + | + | - | +/- | - | - | - | + |
| Kwaśna fosfataza | - | - | - | +/- | + | + | - | - | - | + | + |
| fosfohydrolaza naftolowa AS-BI, | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | + |
| alfa-galaktozydaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| beta- ga;aktozydaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| beta- glukuronidaza | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| alfa- glukozydaza | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | - |
| beta- glukozydaza | - | - | ++ | - | - | + | - | - | - | - | - |
| N-acetylo- beta-glukozominidaza | - | - | - | +/- | - | - | - | +/- | +/- | - | - |
| alfa- mannozydaza | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| alfa- fukozydaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

Wykres rozkładu rozproszenia aktywności enzymatycznej w temperaturze 22°C.



CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH SZCZEPÓW

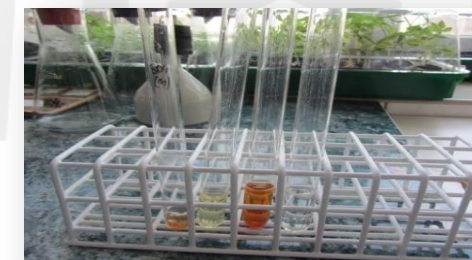
| | Szczepy | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| <i>otoczki</i> | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>przetrwalniki</i> | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>obecność czerwonego pigmentu</i> | - | - | +/- | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>utlenianie żelaza</i> | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>utlenianie manganu</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>utlenianie NH₄⁺</i> | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| <i>utlenianie NO₂⁻</i> | + | + | - | - | + | + | - | + | + | + | - |
| <i>Barwienie Grama</i> | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | - |
| <i>Morfologia komórki</i> | pateczka | pateczka | pateczka | pateczka | ziarniak | dwoinka | ziarniak | laseczka | ziarniak | ziarniak | pateczka |



871

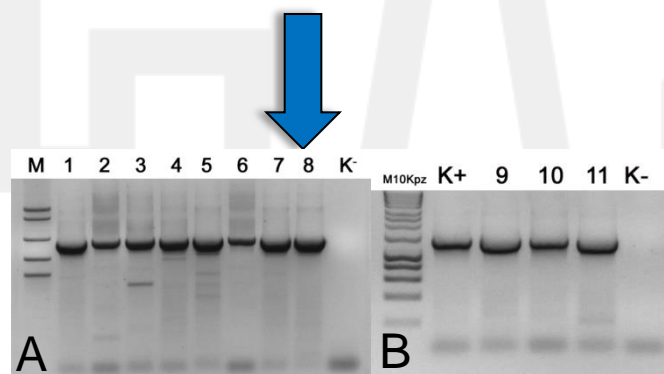


804



804

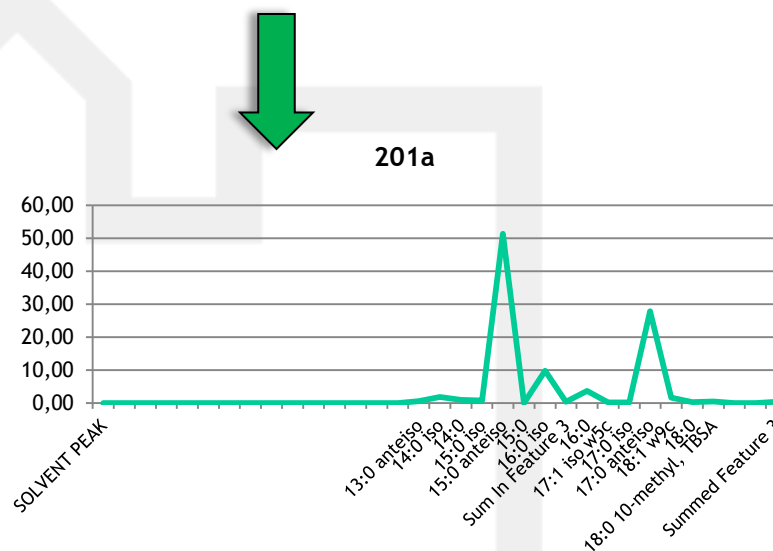
16S rDNA



a) M – marker wielkości DNA B (750 pz, 1000 pz, 1500 pz, 2500 pz, 3500 pz). Szczepy: 1-2.1; 2-301a; 3-301b; 4-5.1; 5-107; 6-739; 7-201a; 8-804; K- kontrola negatywna reakcji PCR

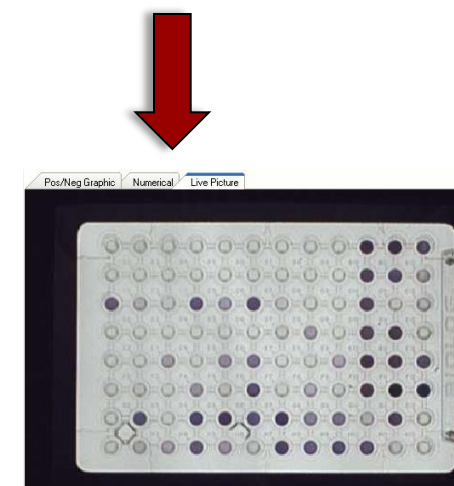
b) M – marker wielkości DNA M10Kpz (200 pz, 400 pz, 600 pz, 800 pz, 1000 pz, 1500 pz, 2000 pz, 2500pz, 3000 pz, 4000, 5000 pz, 6000 pz, 8000pz, 10000 pz). Szczepy: 9- 7311; 10-871; 11-820;

FAME



| Sim Index | Identification |
|-----------|--|
| 0,664332 | Microbacterium-lacticum-GC subgroup B |
| 0,563795 | Curtobacterium-flaccumfaciens-betae/oortii |
| 0,543828 | Clavibacter-michiganensis-insidiosum |
| 0,47074 | Clavibacter-michiganensis-michiganensis/C. sepedonicum |
| 0,458241 | Nesterenkonia-halobia |

BIOLOG



Average Maximum Positive (Graphic with 55/45 Cutoff)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| B | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| C | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| D | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| E | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| F | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| G | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

TGCAAGTCGACGGCAGCGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGC CGCGGAGTGGCG AACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACGCGA AAGCGTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAGGGGGATCTTAGGA CCTCTCACTATTGGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC CTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCCAGCCACTGGG ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACA ATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCTGTGCGATGAAGCCTTCGGGT TGTAAGCACTTTTGCAGGGAAGAAAAGTTTCGGATAATACCGGAACTGATG ACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA CGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGG TTCGAAAGAAAAGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGAAGTCA

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW

Zdolność ruchu

| | Szczepy | | | | | | | | | | |
|-----|---------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | 11. |
| 12h | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 1 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 20 mm | 20 mm | 10 mm |
| 24h | 3 mm | 1 mm | 6 mm | 0 mm | 1 mm | 0 mm | 1 mm | 0 mm | 30 mm | 40 mm | 40 mm |

Antybioza

| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | 11. |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. | | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 1 mm | 0 mm | 1 mm |
| 2. | 4 mm | | 2 mm | 1 mm | 1 mm | 2 mm | 0 mm | 0 mm | 2 mm | 3 mm | 2 mm |
| 3. | 3 mm | 3 mm | | 4 mm | 5 mm | 1 mm | 2 mm | 4 mm | 2 mm | 5 mm | 2 mm |
| 4. | 2 mm | 1 mm | 1 mm | | | 2 mm | 0 mm | 0 mm | 1 mm | 1 mm | 1 mm |
| 5. | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | | 0 mm | 0 mm | 2 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm |
| 6. | 0 mm | 2 mm | 0 mm | 0 mm | 1 mm | | 0 mm | 0 mm | 1 mm | 1 mm | 1 mm |
| 7. | 2 mm | 3 mm | 2 mm | 1 mm | 2 mm | 2 mm | | 1 mm | 2 mm | 5 mm | 1 mm |
| 8. | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | | 0 mm | 0 mm | 0 mm |
| 9. | 3 mm | 3 mm | 2 mm | 3 mm | 2 mm | 2 mm | 2 mm | 2 mm | | 3 mm | 2 mm |
| 10. | 4 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | 0 mm | | 0 mm |
| 11. | 4 mm | 2 mm | 0 mm | 1 mm | 1 mm | 4 mm | 2 mm | 4 mm | 4 mm | 7 mm | |

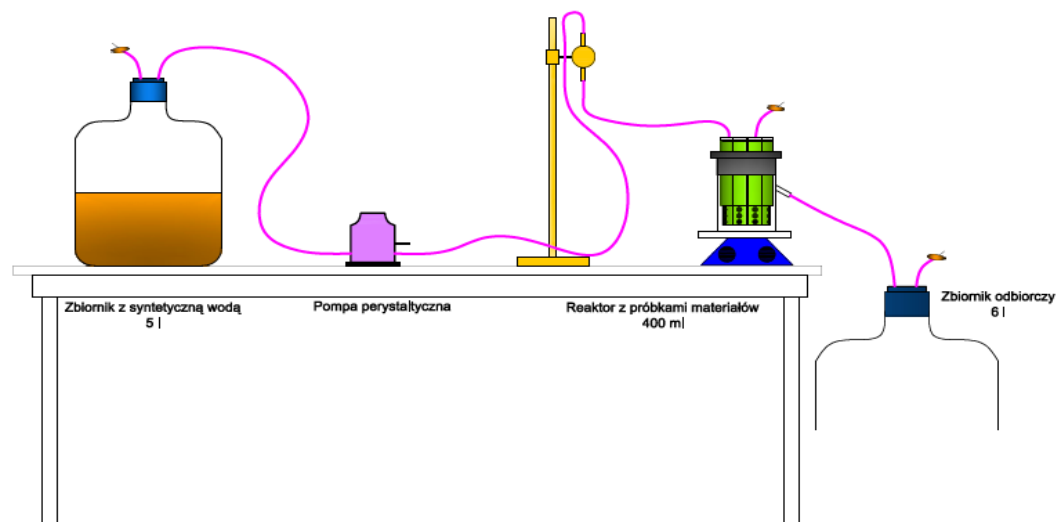
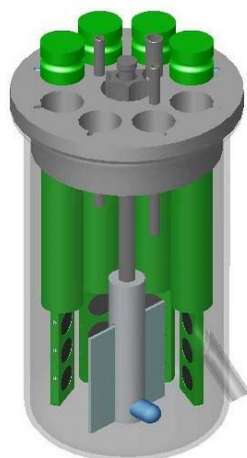


820

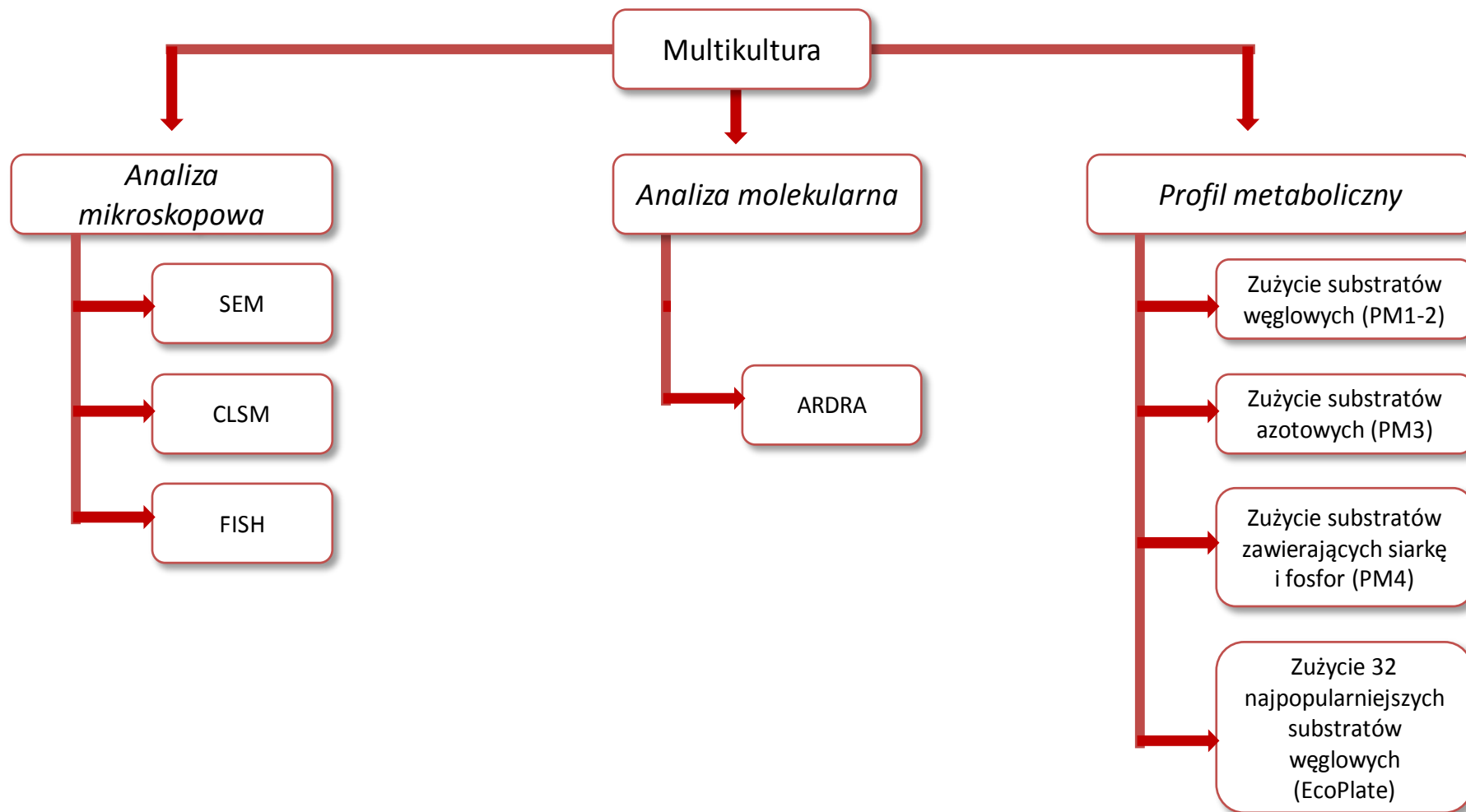


■ Materiały:

- Polietylen
- Stal nierdzewna
- Polipropylen
- Polichlorek winylu
- Miedź
- Żeliwo

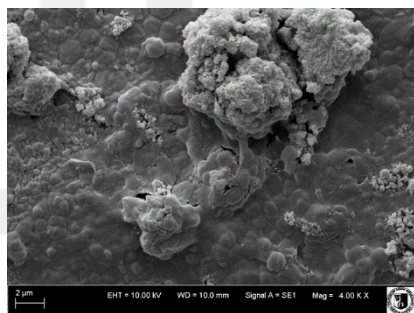


ANALIZA BIOFILMU

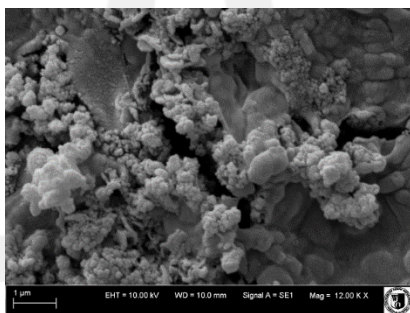


ANALIZA STRUKTURY BŁONY BIOLOGICZNEJ SEM (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) CLSM (CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE)

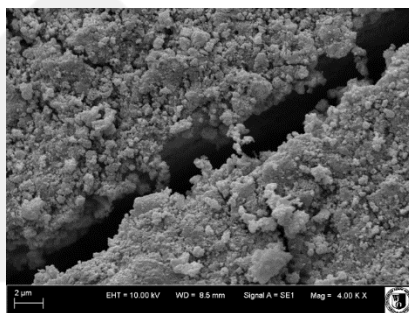
Stal nierdzewna



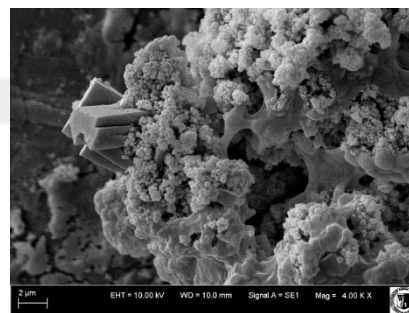
Miedź



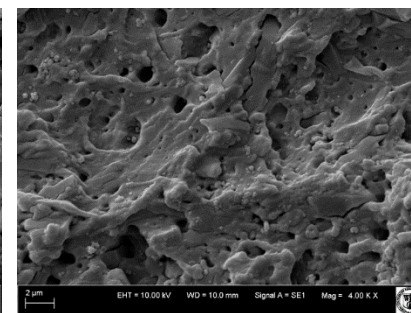
Żeliwo



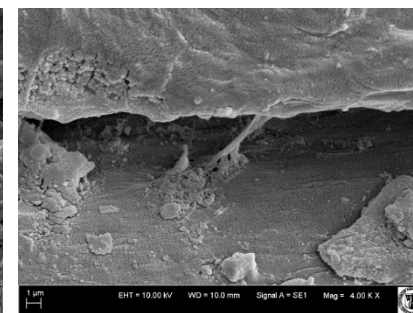
Polipropylen



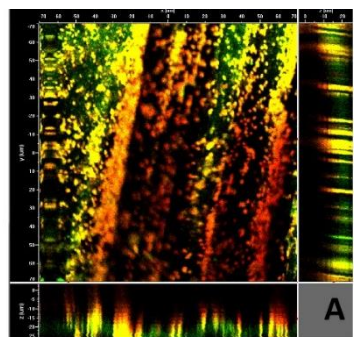
Polichlorek winylu



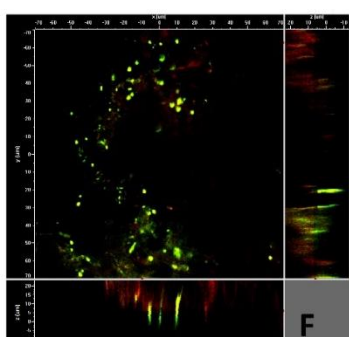
Polietylen



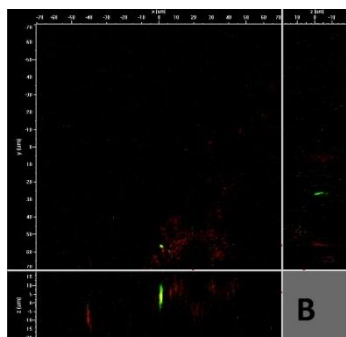
Wysokość 15 μm



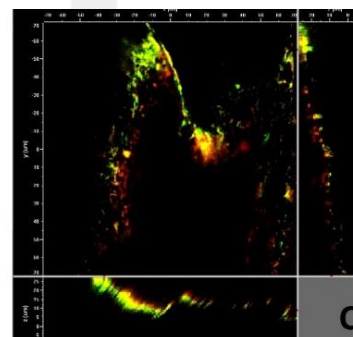
Wysokość 30 μm



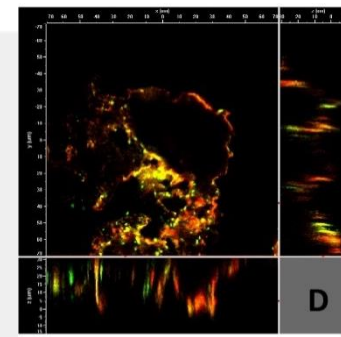
Wysokość 25 μm



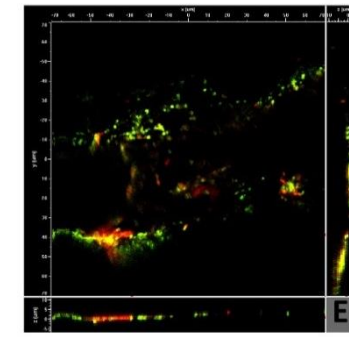
Wysokość 25 μm



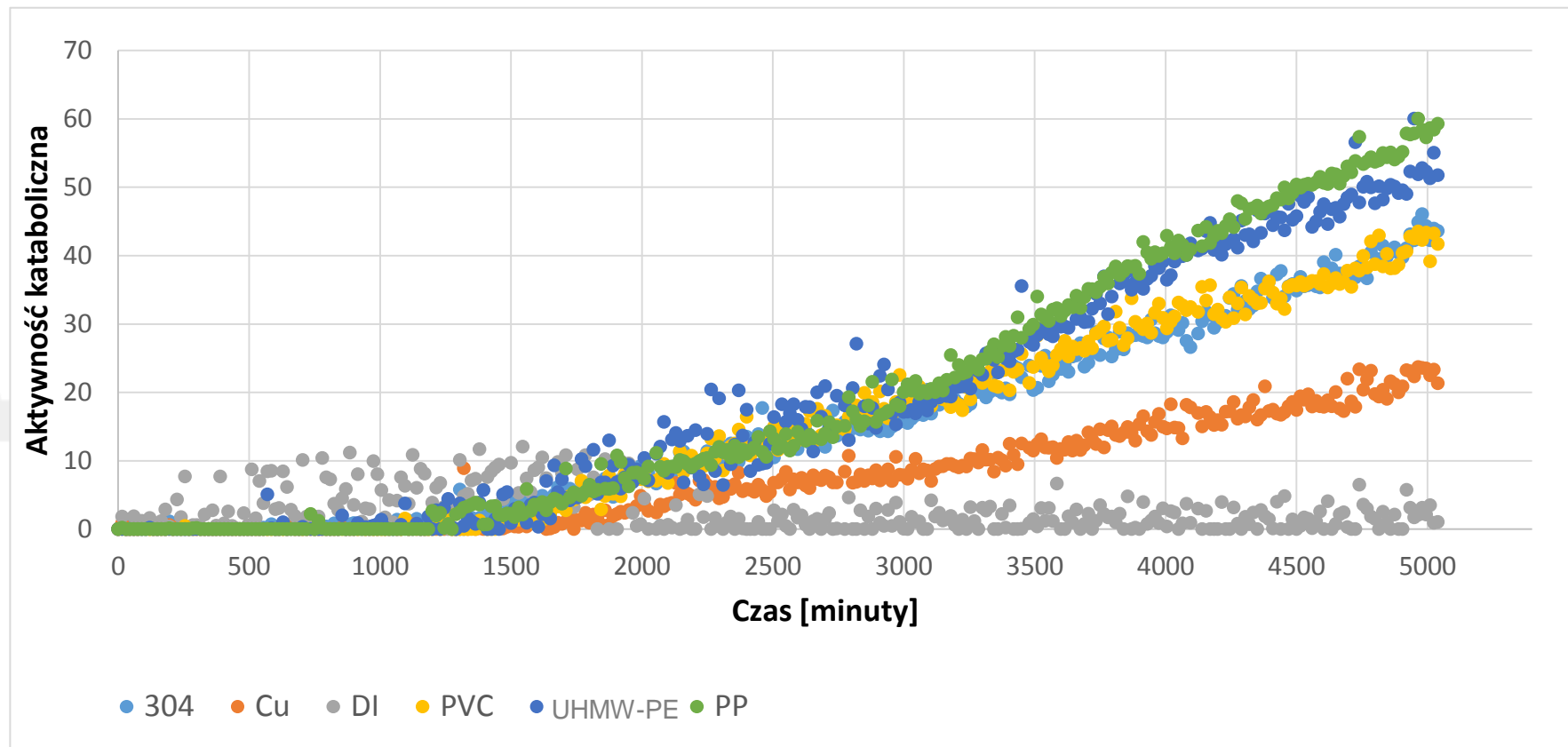
Wysokość 30 μm



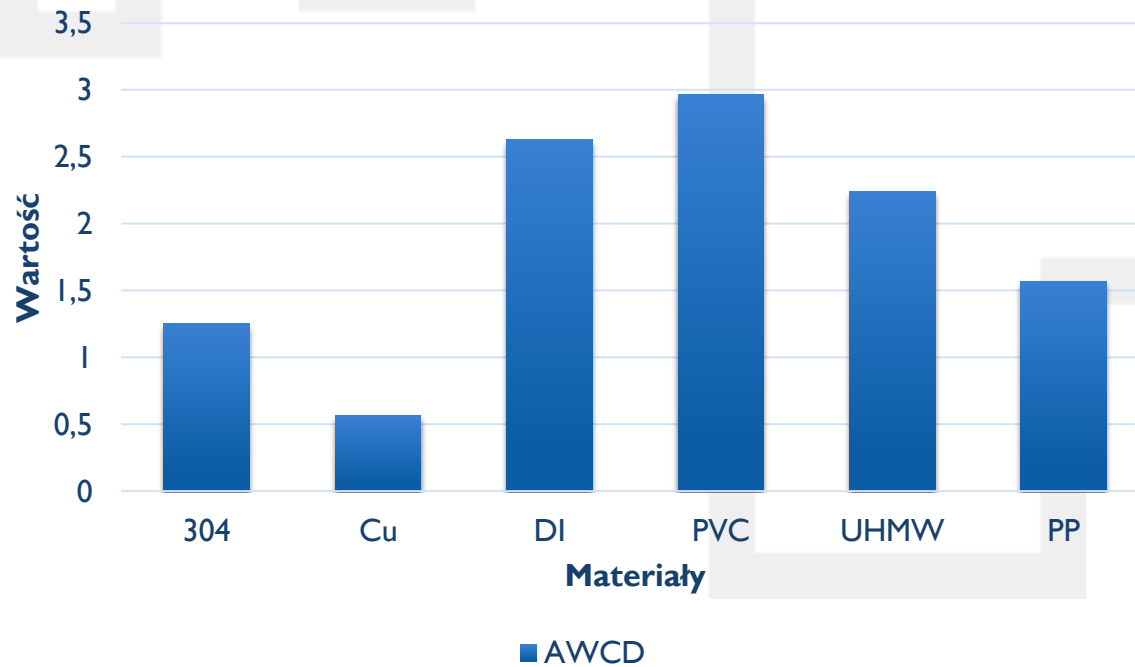
Wysokość 4 μm



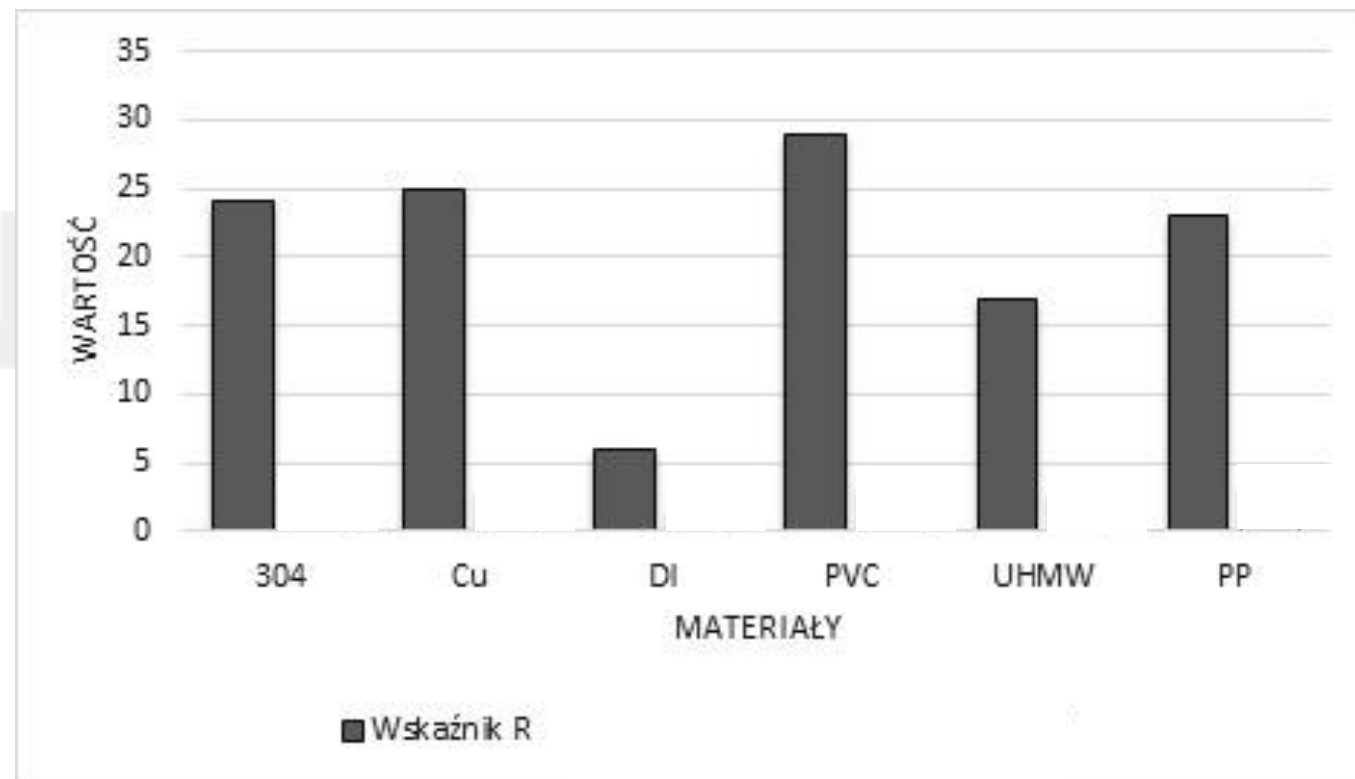
| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Aminy i amidy | Fenyletyloamina |
| | Putrescyna |
| Aminokwasy | L-arginina |
| | L-asparagina |
| | L-feniloalanina |
| | L-seryna |
| | L-treonina |
| Węglowodany | Kwas glicylo L-glutaminowy |
| | Pirogronian metylu |
| | D-celbioza |
| | α-D-laktoza |
| | β-metylo-D-glukozyd |
| | D-ksyloza |
| | Erytrol |
| | D-mannitol |
| | N-acetylo-D-glukozoamina |
| | fosforan 1-glukozy |
| | Fosforan D,L-α-glicerolu |
| | Kwas D-glukozaminowy |
| Kwasy karboksylowe i ketonowe | γ-lakton kwasu D-galaktonowego |
| | Kwas D-galakturonowy |
| | Kwas 2-hydroksybenzoesowy |
| | Kwas 4-hydroksybenzoesowy |
| | Kwas γ-hydroksymasłowy |
| | Kwas itakonowy |
| | Kwas α-oksomasłowy |
| | Kwas D-jabłkowy |
| Polimery | Tween 40 |
| | Tween 80 |
| | α-cyklodekstryna |
| | Glikogen |



- **Średnia absorbcja** (AWCD - *Average Well Colour Development*) dla każdego obiektu doświadczalnego została wyliczona na podstawie absorbcji dla 31 substratów, pomniejszonych o wartość absorbcji dla czystej wody $AWCD = \sum ODi/31$, wartość AWCD jest miarą aktywności mikroorganizmów biofilmu.



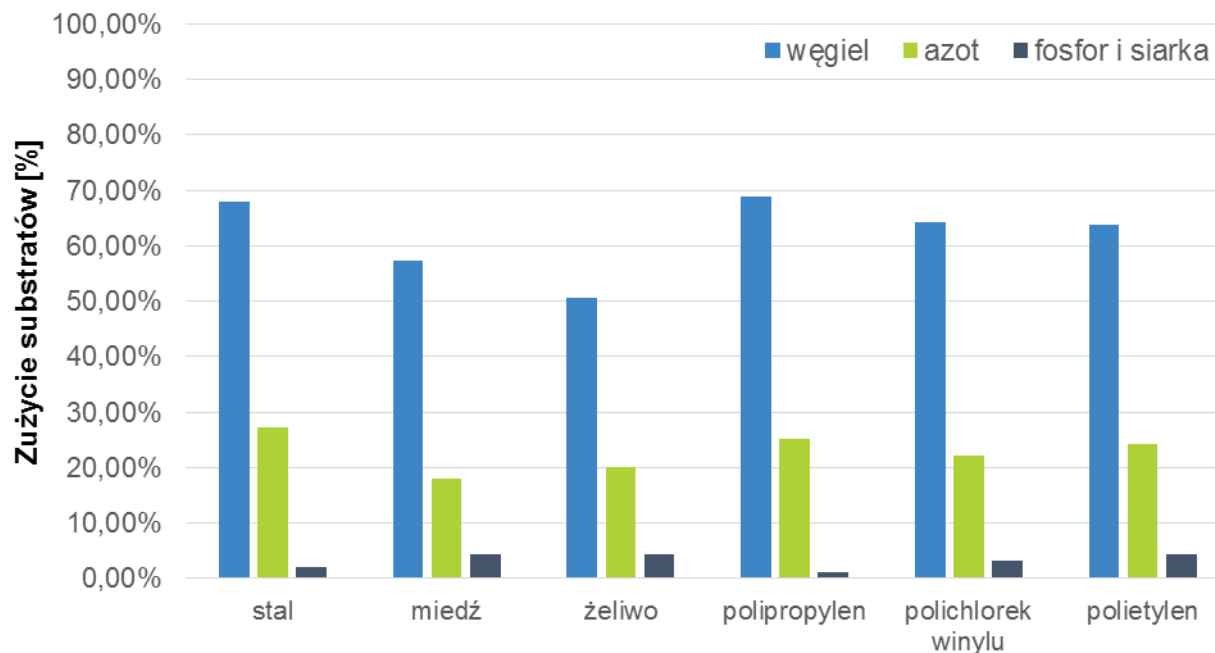
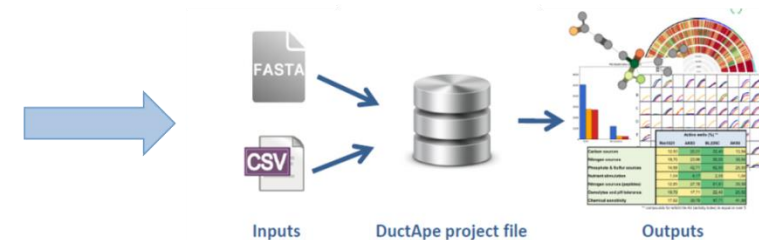
Wskaźnik różnorodności funkcjonalnej R- został obliczony na podstawie liczby zużytych substratów węglowych, przyjmując jako pozytywną odpowiedź mikroorganizmów dla poszczególnych substratów WCD (*well colour development*) $> 0,25$. Różnorodność funkcjonalna uznana jest za jeden z najbardziej odpowiednich wskaźników różnorodności, ponieważ funkcja ekosystemu zależy od cech funkcjonalnych gatunków, a zmniejszenie różnorodności funkcjonalnej ma niekorzystny wpływ na stabilność i funkcjonowanie ekosystemu.



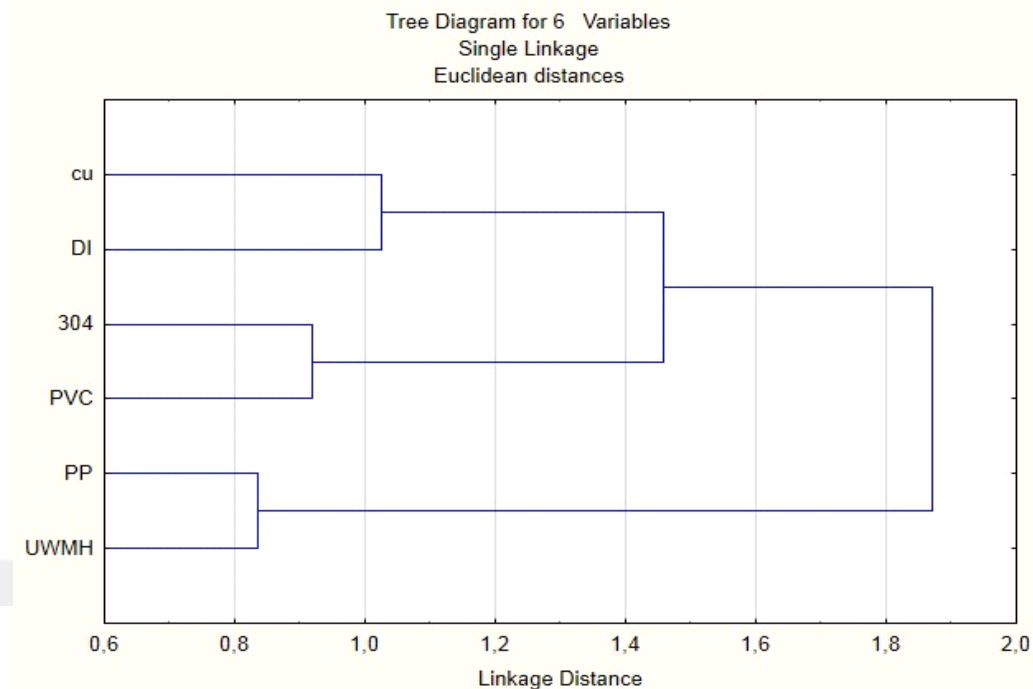
ANALIZA AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ



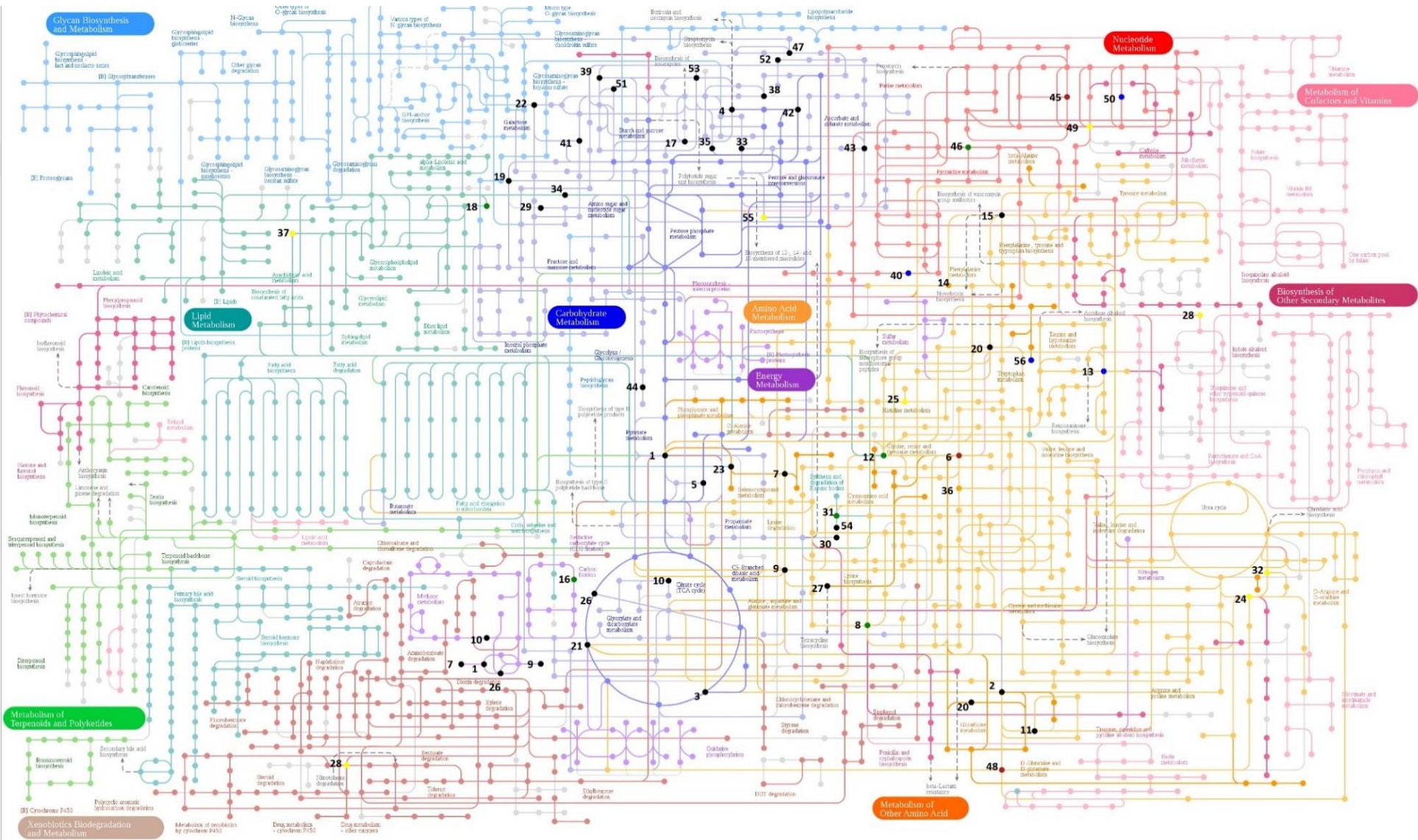
- Porównanie aktywności metabolicznej mikroorganizmów tworzących biofilm na badanych materiałach.
- Analiza 190 substratów węglowych, 95 źródeł azotu, 94 źródeł fosforu i siarki.



Błona biologiczna na badanych materiałach

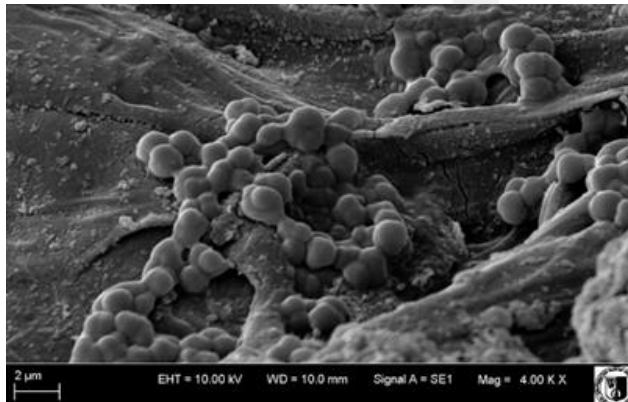


MAPA SZLAKÓW METABOLICZNYCH Z NANIESIONYMI SUBSTRATAMI WSPÓLNYMI DLA WSZYSTKICH GRUP MIKROORGANIZMÓW BŁONY BIOLOGICZNEJ I UNIKALNYMI DLA KAŻDEJ GRUPY



- **Wyizolowane oraz oznaczone szczepy mogą służyć jako wskaźniki obecności błony biologicznej w danej sieci wodociągowej.**
- **Metody identyfikacji oparte na analizie sekwencji kwasów nukleinowych okazały się najskuteczniejsze w przypadku określenia przynależności do rodzaju mikroorganizmów zmienionych pod wpływem stresu środowiskowego (selekcja, procesy technologiczne: koagulacja, chlorowanie, ozonowanie).**
- Mieszana kultura drobnoustrojów charakteryzuje się większą różnorodnością enzymatyczną, co znacznie ułatwia wykorzystywanie komponentów rurociągów przez bakterie, jako źródło węgla i energii;
- **Rutynowe analizy wody w żaden sposób nie dostarczają informacji o rzeczywistych warunkach mikrobiologicznych panujących w sieci wodociągowej;**

- Mechanizm powstania obrostów biologicznych, bioróżnorodność na różnych materiałach powoduje, że **żaden zabieg technologiczny** ani materiał wykorzystywany do budowy sieci **nie jest w stanie zapobiec tworzeniu się biofilmu**;
- Analiza mikrobiologiczna wody w wybranych punktach z zastosowaniem podłoża R2A wskazywała od 1,5- 5,2 x większą liczbę mikroorganizmów psychro- i mezofilnych niż na agarze odżywczym, co sugeruje na konieczność wykorzystania podłoża R2A w celu otrzymania bardziej wiarygodnych wyników jakości mikrobiologicznej wody.
- Analizy wykonane za pomocą systemu BIOLOG OmniLog mogą służyć do oceny dostępności substratów pokarmowych dla drobnoustrojów z materiałów wykorzystywanych do budowy instalacji np. wodociągowych, a więc również do testowania ich przydatności.



Dziękuję za uwagę

Izabela Biedroń

Zakład Badań i Rozwoju

Tel. 32 254 60 31 wew. 119

E-mail: izabiedron@ietu.katowice.pl

