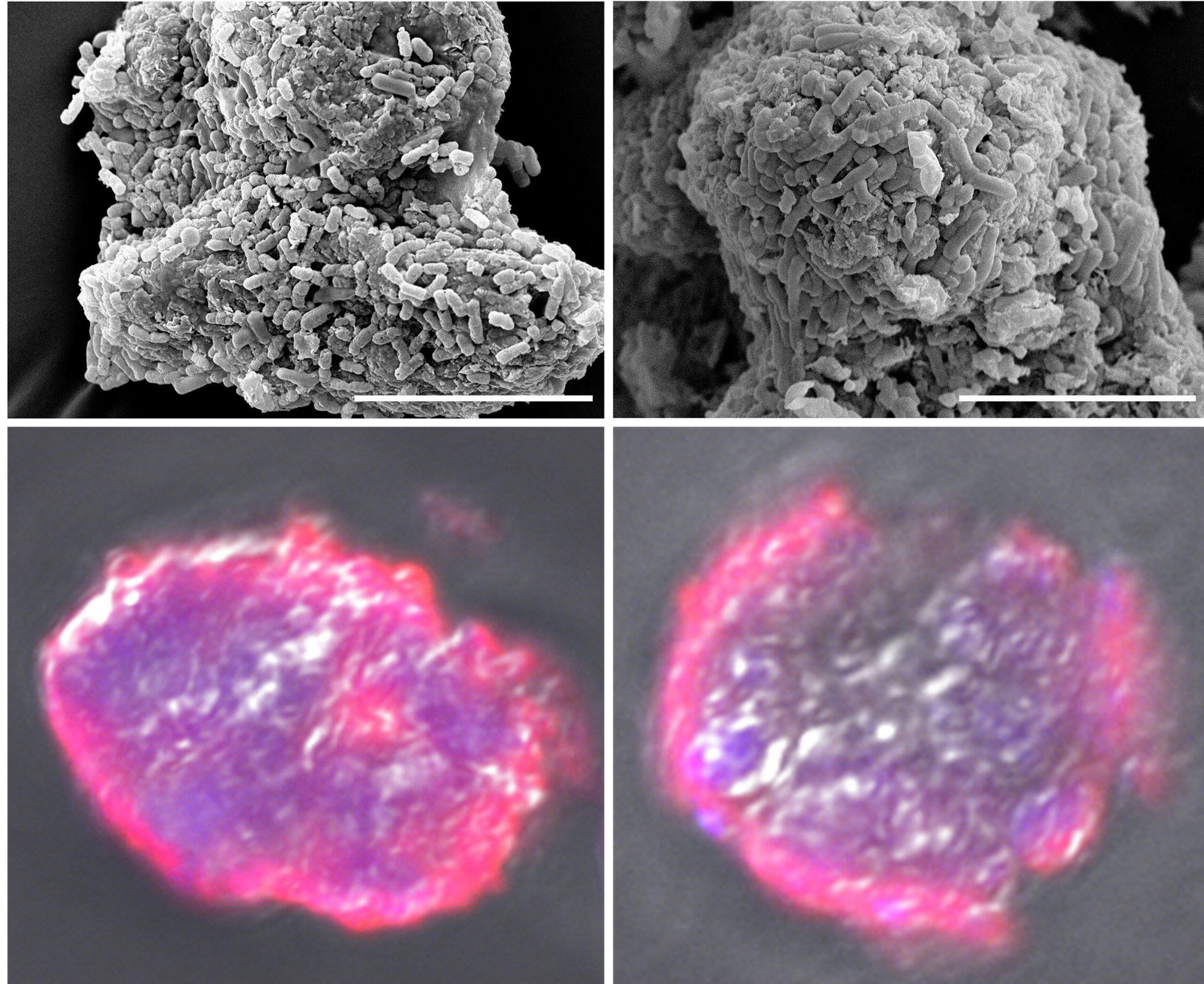




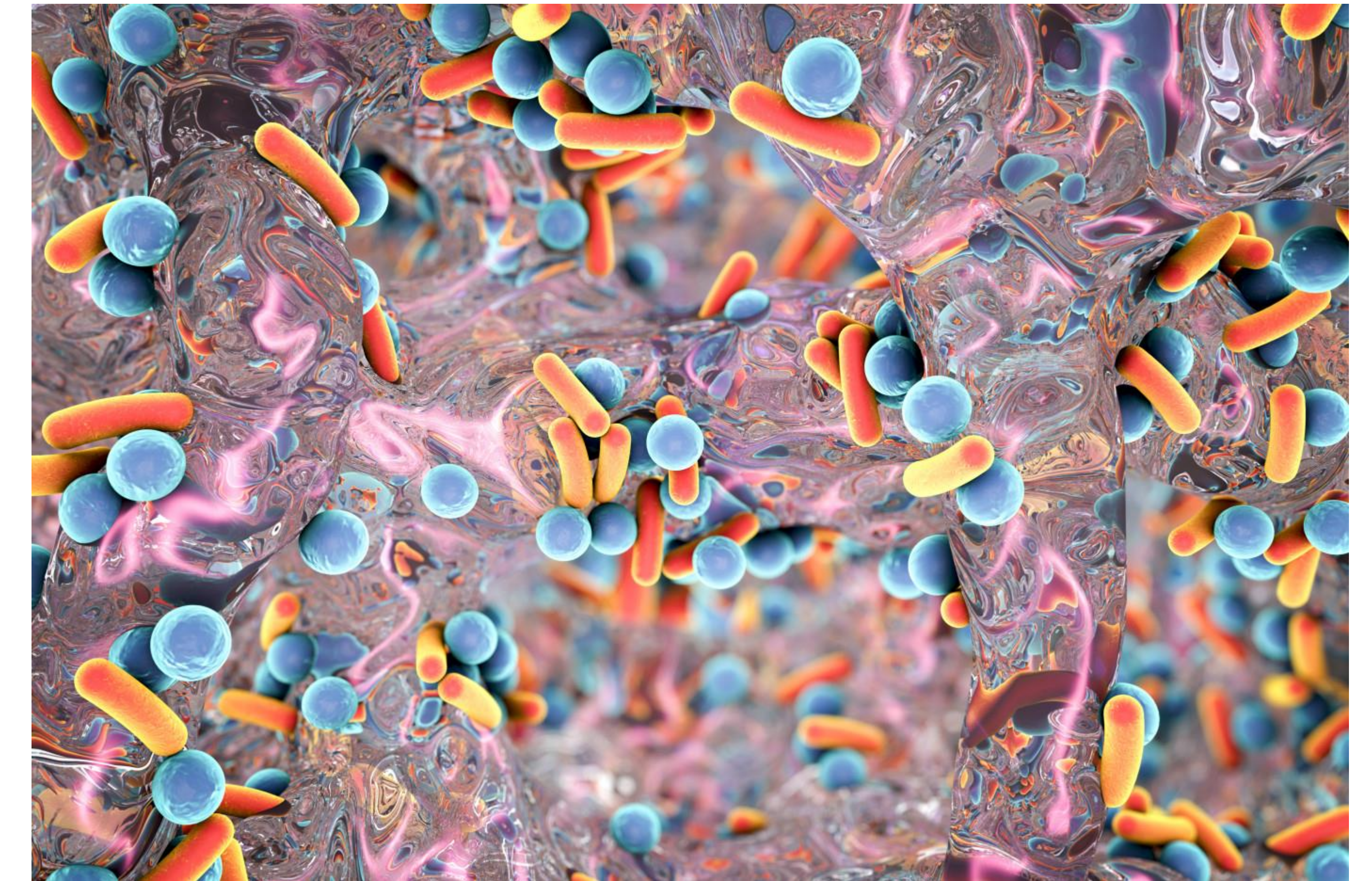
L.acidophilus

B. longum



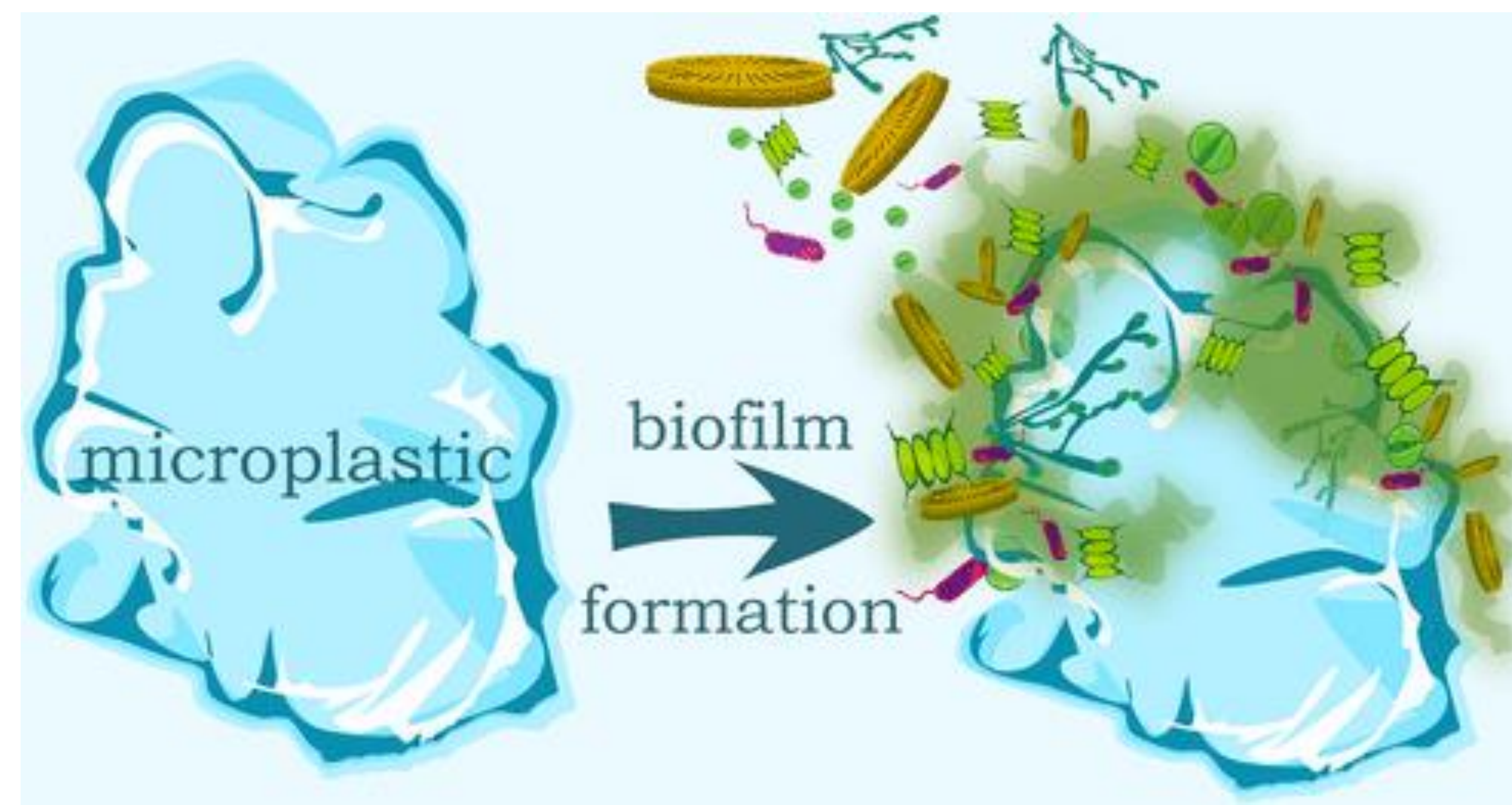
Biofilm és mikroszkópia

Esettanulmány 3



Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért Nemzeti Laboratórium

RRF-2.3.1-21-2022-00007 MATE Genetika és Biotechnológia Intézet Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék



Biofilmek általában 1

A **biofilm** a mikróbák egy felületen összetapadt, egybefüggő bevonatot képező rétegből áll.

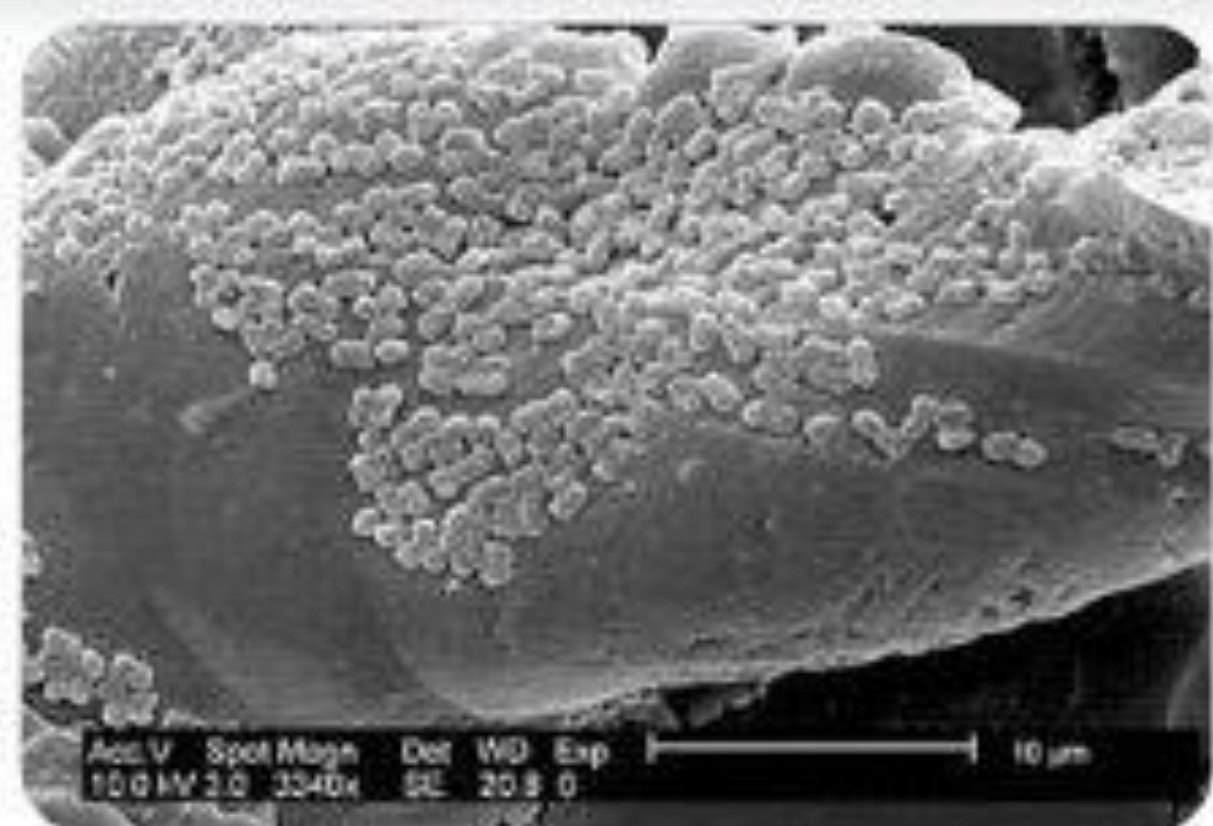
- A biofilmek előfordulnak élő és élettelen felszínen, természetes, ipari vagy kórházi környezetben.
- **Általában különböző mikroorganizmusok alkotják**
- A biofilmben élő mikroorganizmusok fiziológiájukban, fenotípusukban, anyagcseréjükben különbözhetnek szabadon élő fajtársaiktól – expressziós különbségek, gének szabályozása változik meg
- **A sejtek gyakran az általuk termelt, nyálkának is nevezett extracelluláris polimer anyagokba (extracellular polymeric substance, EPS) ágyazódva helyezkednek el**
- Az EPS fehérjékből, poliszacharidokból, gyakran DNS-ből áll.



26

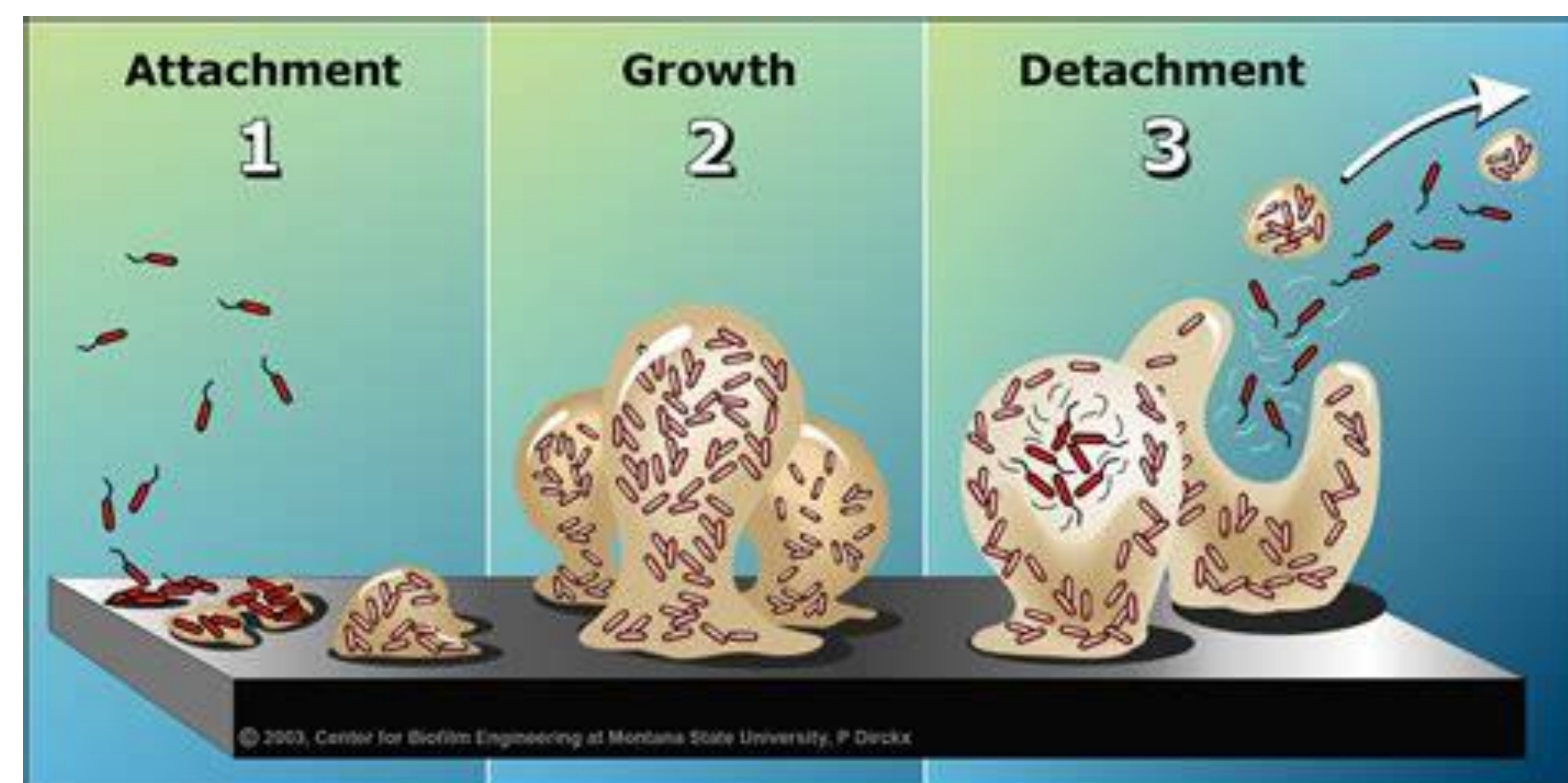


Biofilm in mouth



Biofilm in gut

Biofilmek általában 2



A biofilm kialakulása és fejlődése

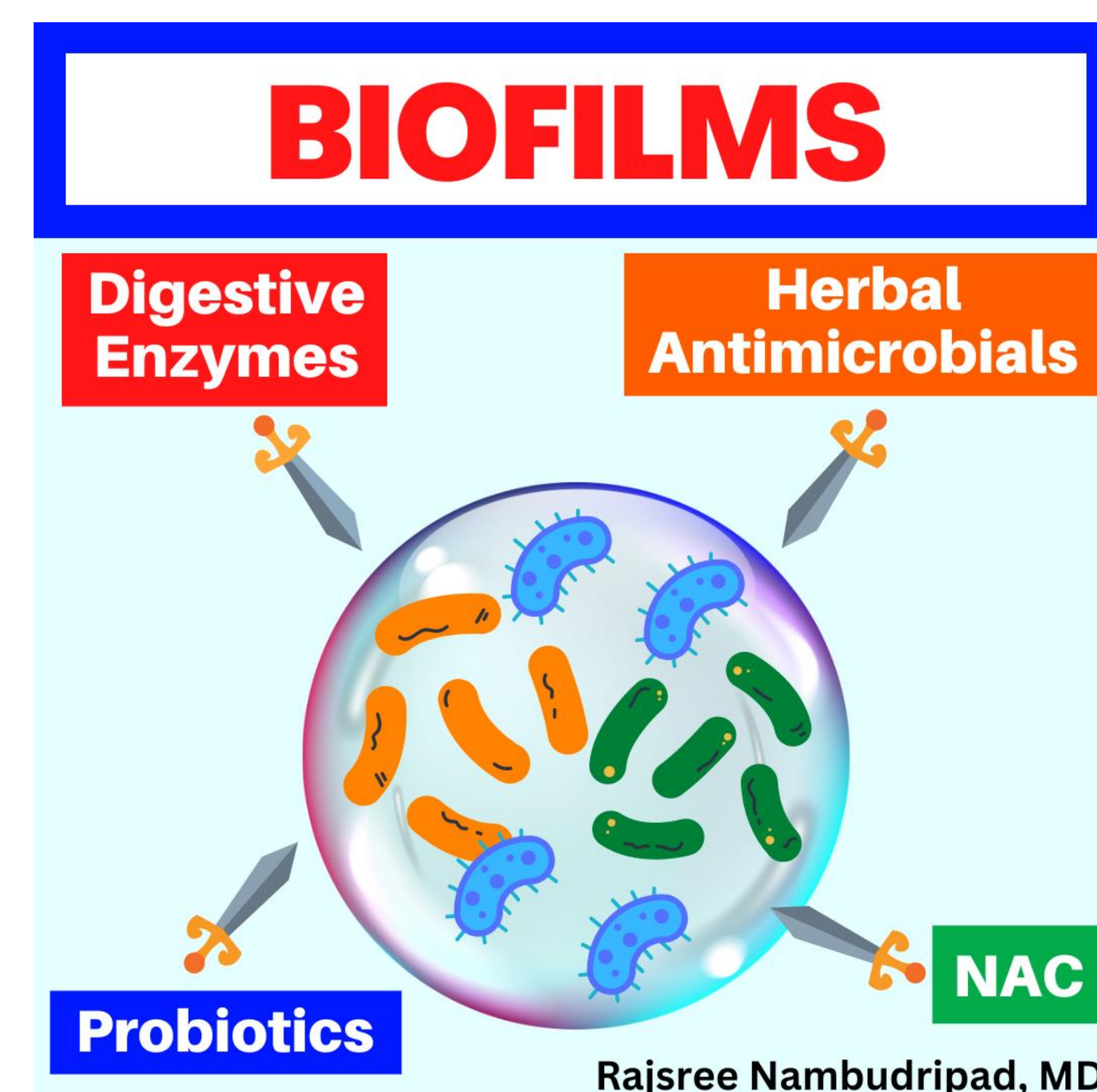
Az extracelluláris mátrix

A biofilmet a sejtek által termelt polimereket tartalmazó extracelluláris mátrix (exopoliszacharid, EPS) tartja össze és védi a külső behatásoktól.

- A mátrix a sejteket védi, egyben lehetővé teszi köztük a biokémiai jelzésekkel történő kapcsolattartást.
- Egyes biofilmek vízcsatornákat tartalmaznak, melyek segítik a tápanyagok és a jelző molekulák továbbítását.

A mikrobák több körülménytől függően alakítanak ki biofilmet:

- a specifikus vagy nonspecifikus kötődési helyek megléte egy felületen,
- a tápanyagbőség
- a gátló hatásúnál kisebb koncentrációjú antibiotikumoknak, tisztítószernek és az immun rendszernek való kisebb kitettség
- **Hálózatosodás, már meglévő biofilmhez való csatlakozási lehetőség**



Biofilmek általában 3

A biofilmek kialakulásának okai:

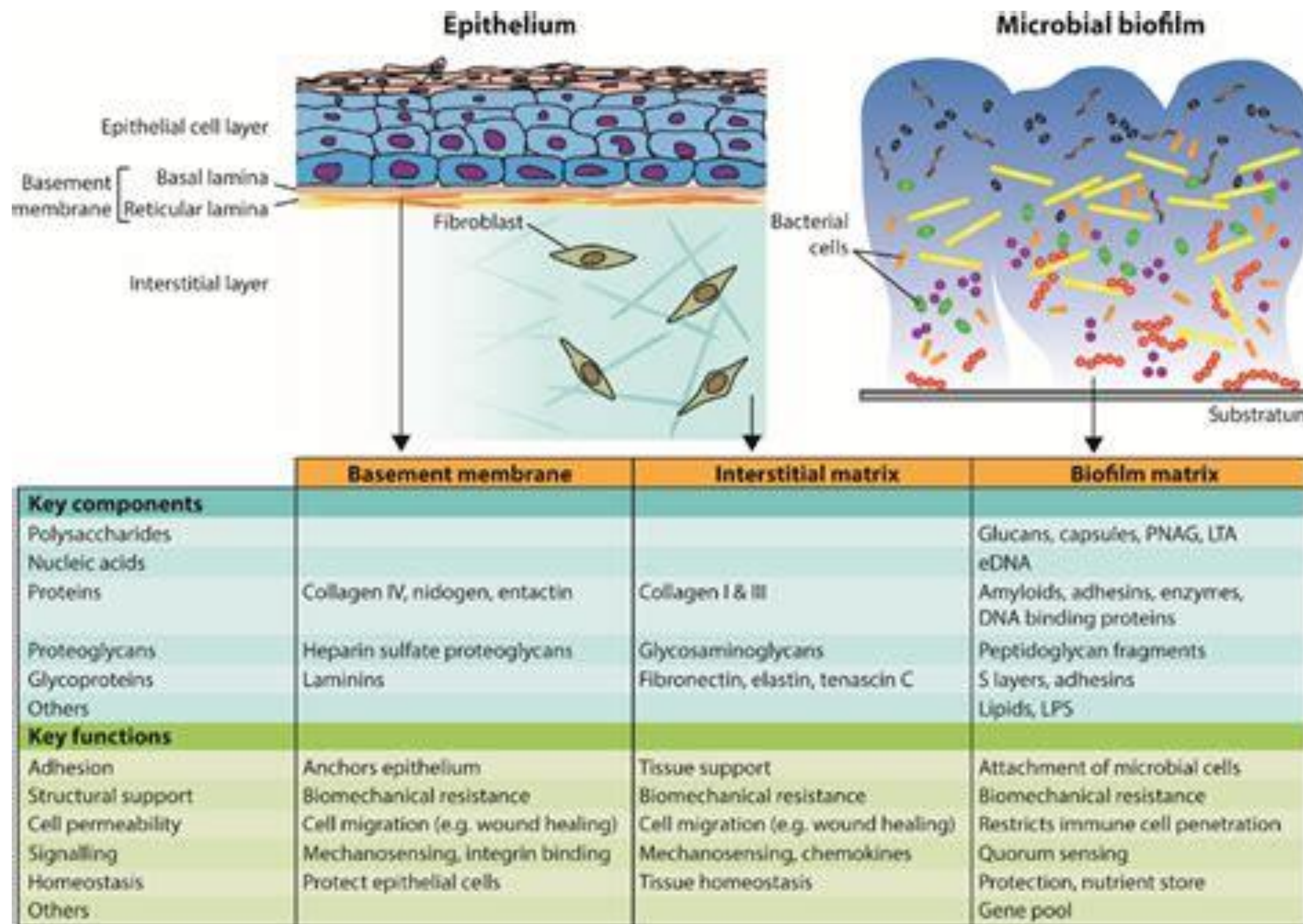
1. Védekezés: A biofilmben élő szervezetek kevésbé érzékenyek környezetük változásaira (időszakos tápanyaghiány, PH változások, antimikrobiális ágensek).

2. Kedvező körülmények kihasználása: A biofilmek révén a mikrobák le tudnak horgonyozni a számukra kedvező mikroélőhelyeken.

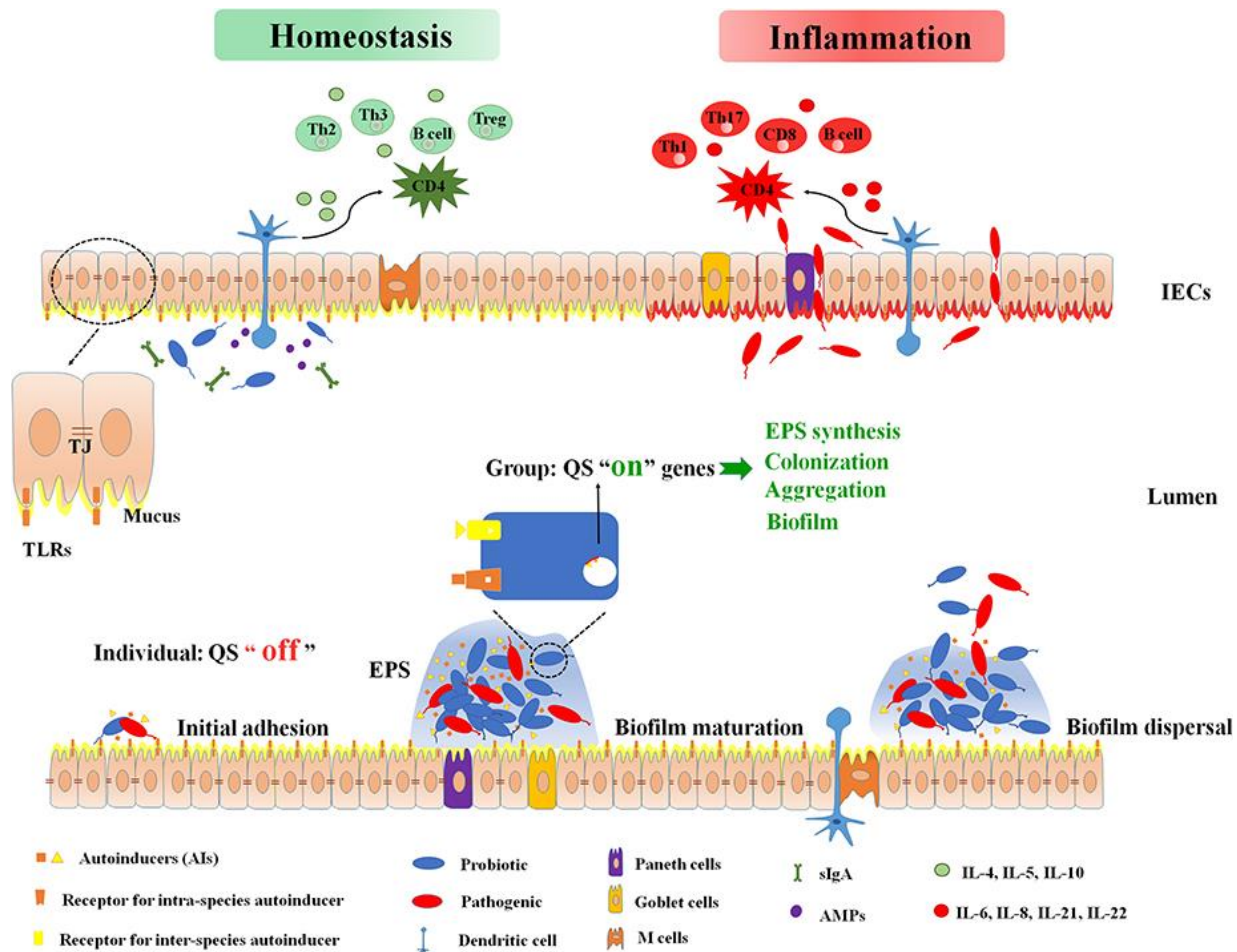
3. Közösségi lét előnyei: a metabolikus terhek megosztása (pl. tápanyagok lebontása) vagy a horizontális géntranszfer lehetősége.

4. A biofilmben élő mikrobiális közösség ökológiai potenciálja túlszárnyalja a közösséget alkotó egyes fajok képességeinek összegét.

5. Elsődleges életforma: Számos mikrobának a biofilm a primer életformája, a különálló lét csupán a kedvezőtlen időszakokra jellemző.



Biofilmek általában 4



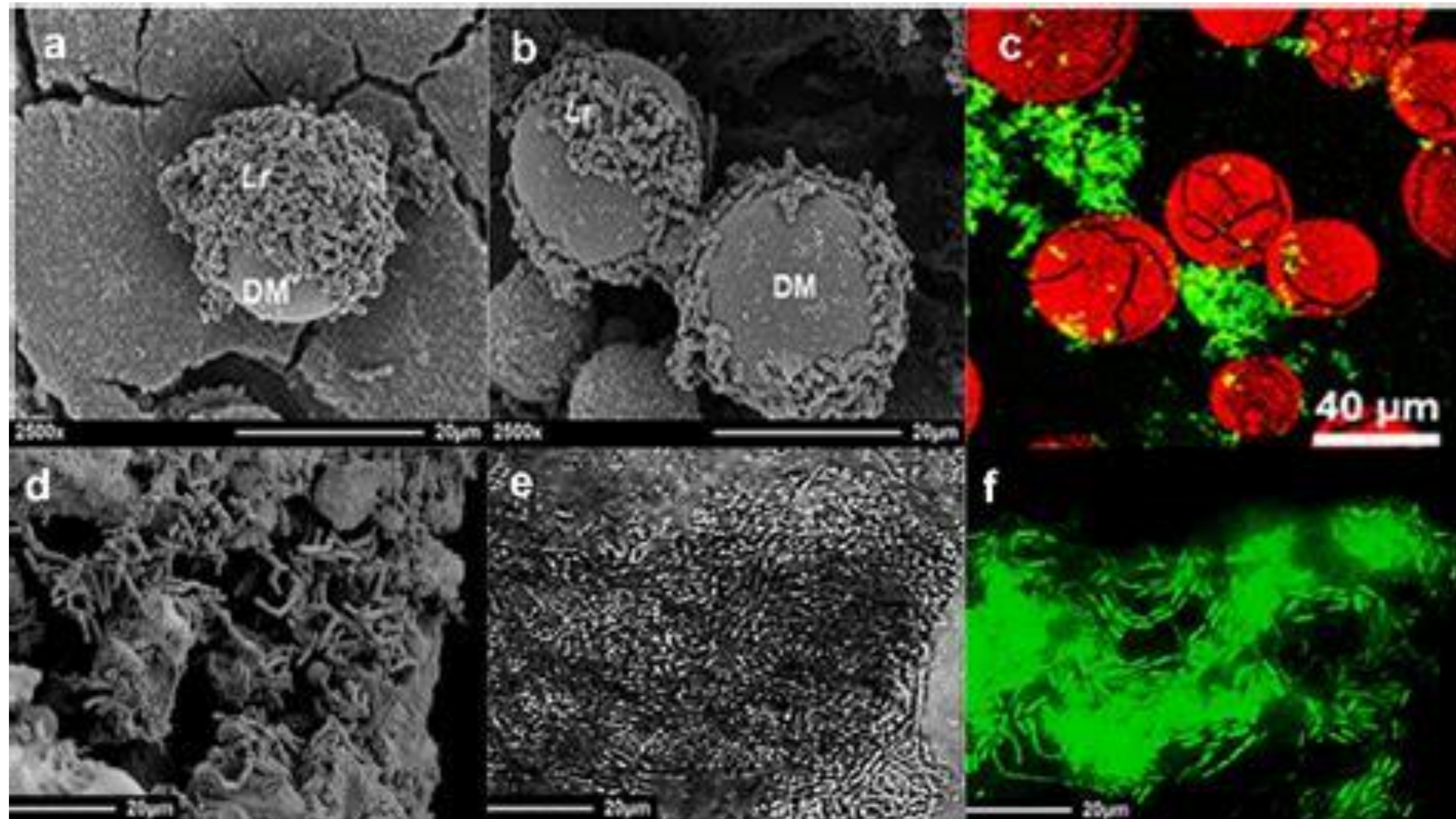
Biofilmek: a homeosztázis és a fertőző betegségek kapcsolata

- Az élőlényekben egészséges állapotban egyensúly van a mikrobiota és a gazda szervezet között.
- **A biofilmben élő mikroorganizmusok fontos szerepet játszanak az egyensúly megbomlásában**
- Az egyensúly megbomlása kóros állapothoz vezet
- **A biofilmmel kapcsolatba hozott fertőző folyamatok közé tartoznak pl. dentális plakk, katéter fertőzés, kontaktlencse fertőzés, bél megbetegedései, protézisek**
- Ezeket a problémákat éppen a biofilm „védelmi” jellege miatt nehéz kezelni

Biofilmek vizsgálata

Megközelítések:

- Klasszikus mikrobiológia
- Molekuláris biológia
- Genomika
- **Mikroszkópia**



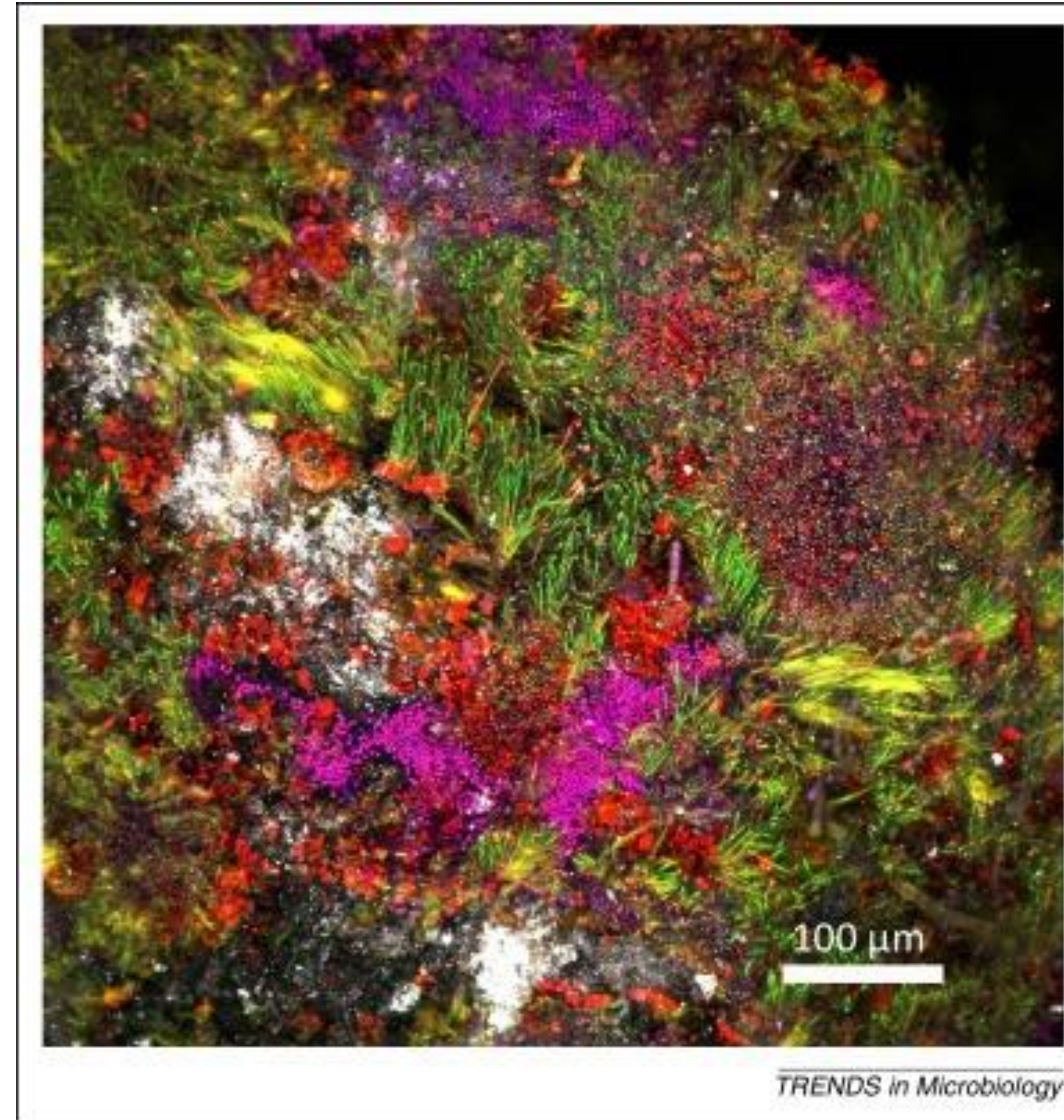
Leggyakrabban használt nem elektron mikroszkópiás eljárások Relucenti et al. 2021

	Light Microscopy	CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy	AFM Atomic Force Microscopy
Pros	Simple protocols Cheap and easy to perform Large investigation area	Allows single cell visualization and 3-D imaging	Nondestructive technique that works under physiological-like conditions, allowing living biofilms qualitative and quantitative assessment with few treatments, sample 3-D structure reconstruction at nanometer scale.
Cons	Low resolution and magnification power, need for sample staining, gross morphological differentiation, finest details not visible	Use of fluorophores, limited number of reporter molecules, intrinsic biofilm fluorescence can interfere with probes	Small scan area (max 150 × 150 μm), no image of bacterial cells sidewalls, possible surface damage during imaging due to tip interactions.
Applications	Visualization of biofilm formation and quantitative assessment of its biomass	Assessment of biofilm structural parameters, Biofilm 3D structure, identification and localization of living and death cells	Quantitative biofilm analysis, determination of adhesion forces, biofilm topography, in situ imaging.

Biofilmek vizsgálata STED

Festékek, amik használatosak Wilson et al. 2018

Name	Cellular Location	Membrane Permeability	Viability (Live/Dead/Both)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dilactate)	Nucleic Acids	Yes	Both
FM dyes	Cell Membrane Lipids	Yes	Both
SYPRO Ruby Biofilm Matrix Stain	Matrix Proteins	No	Both
Propidium Iodide	Nucleic Acids	No	Dead
SYTO	Nucleic Acids	Yes	Live
Calcein	Intracellular Space	Yes	Live



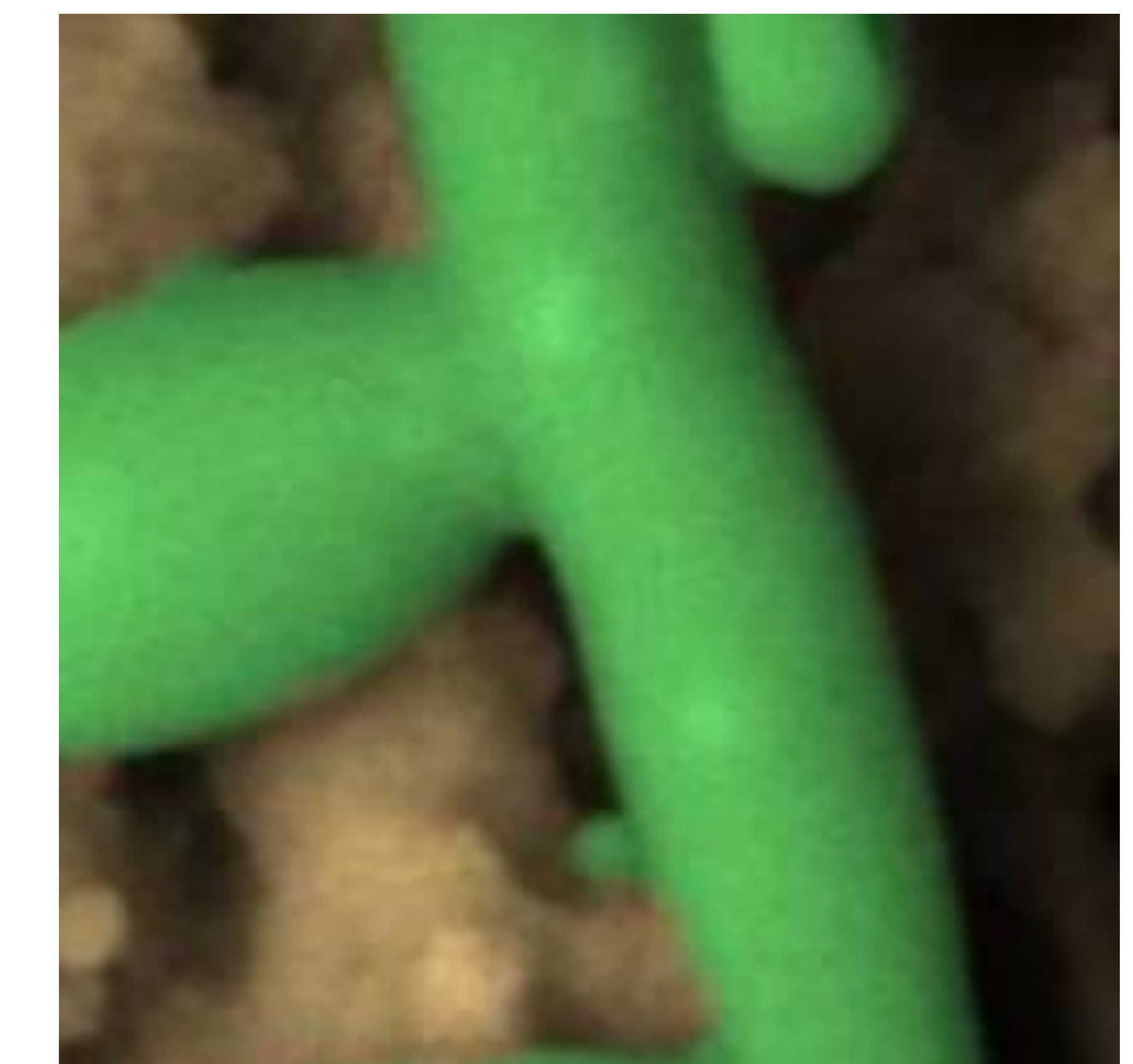
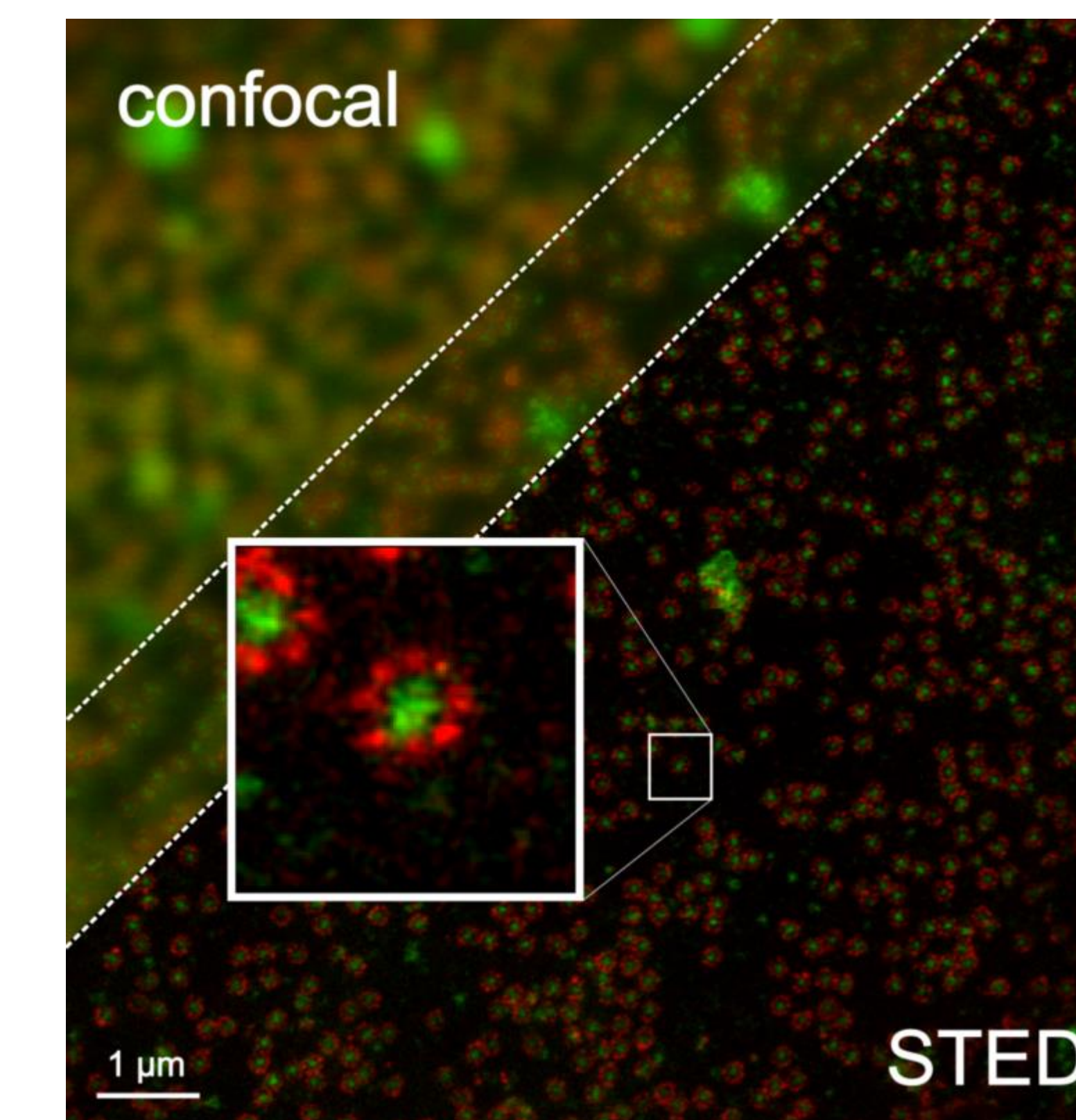
Egy folyó alján levő biofilm képe, ami festése lectin-specific glycoconjugate, D-glucans, nukleinsav történt egymásra vetítve Neu et al. 2015

STED specifikáció

Stimulated emission depletion (STED) microscopy

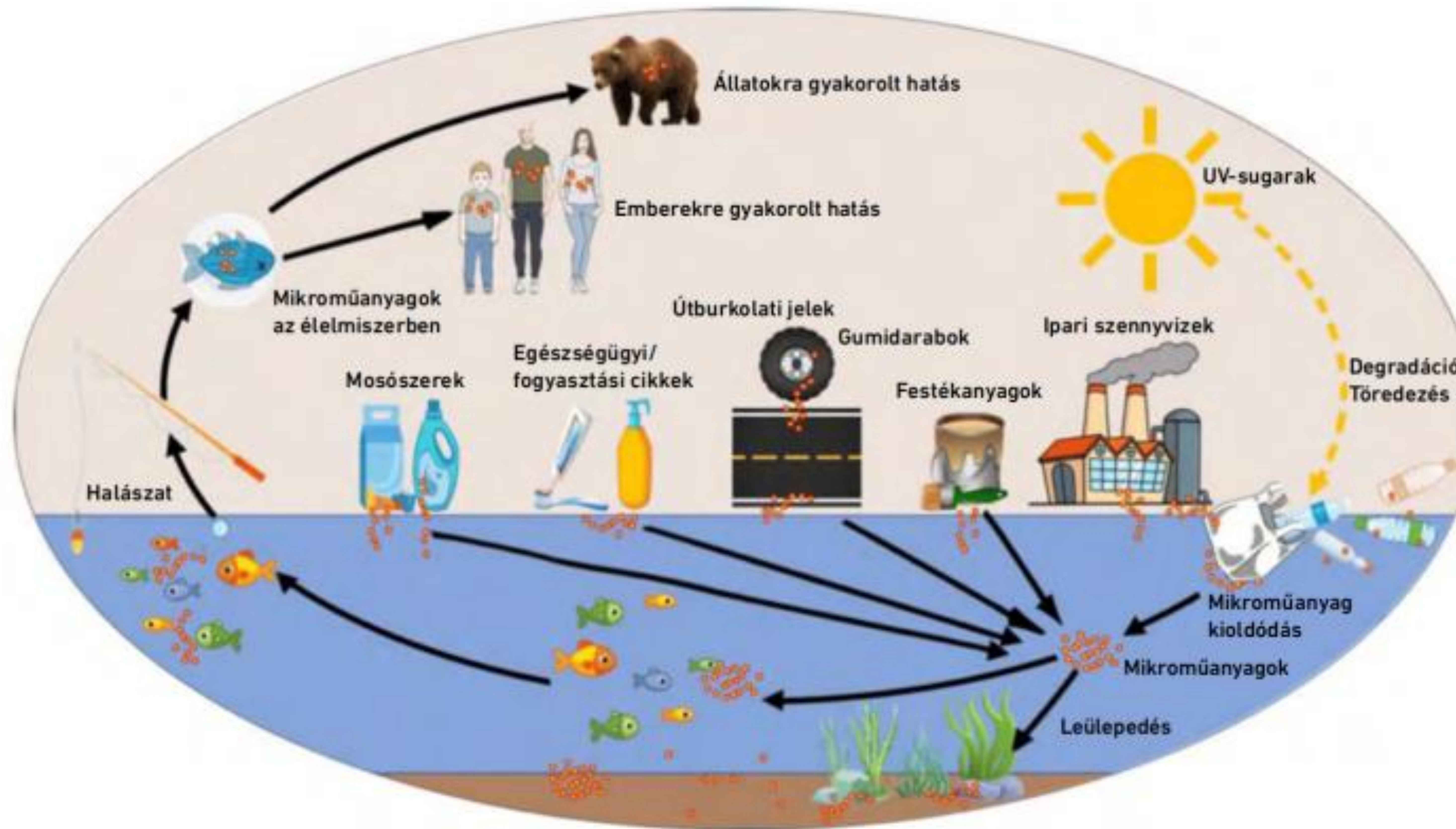
Resolution in the range of 70 nm; scanning instrument similar to CLSM

Depth resolution $\approx 30 \mu\text{m}$; specific fluorochromes only with two-photon STED, more with continuous wave STED, many options with gated STED



AGRI-BIOTECH

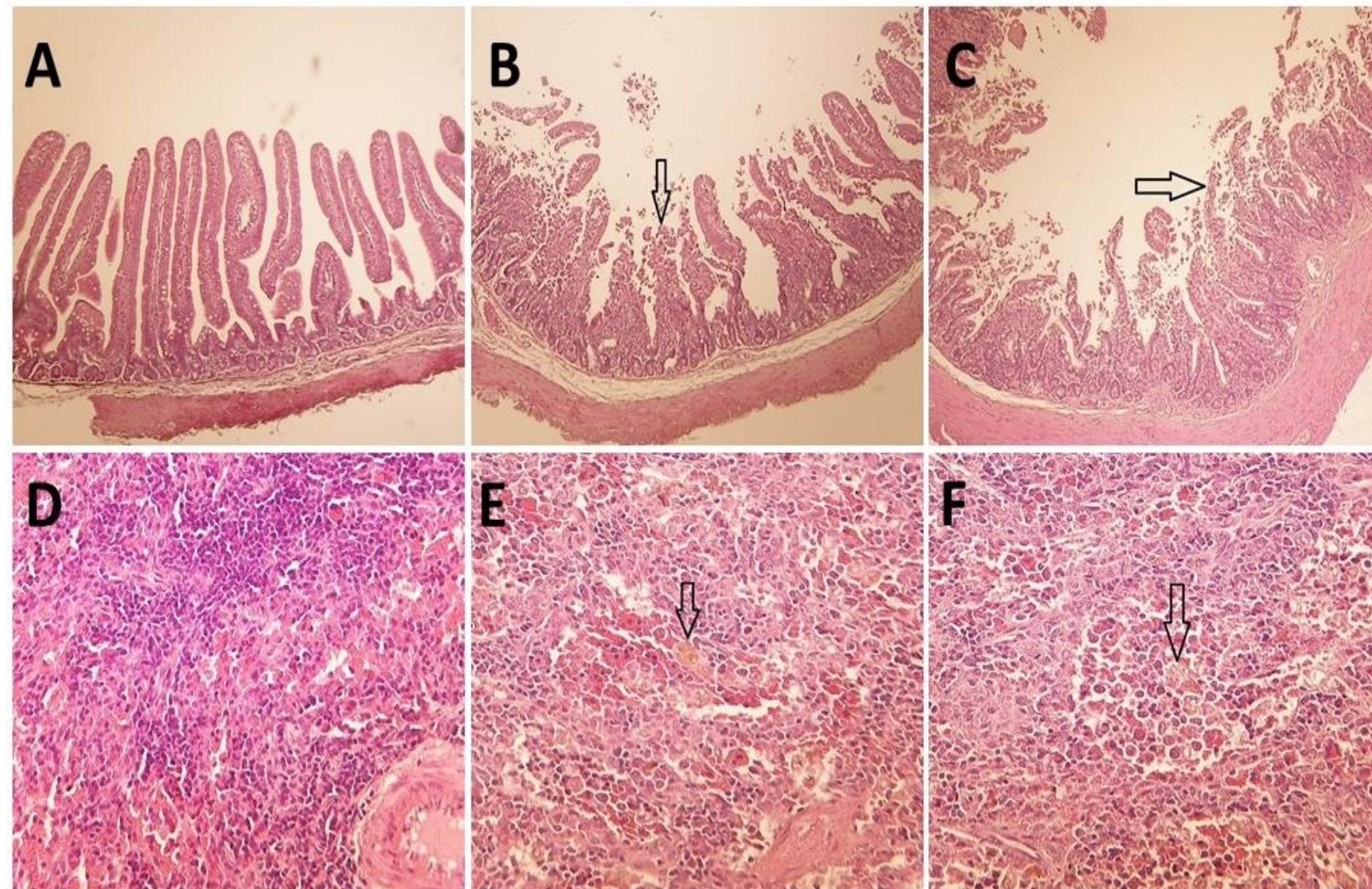
Mikroműanyagok



Mikroműanyagok keletkezése és hatása az ökoszisztémára

A mikroműanyag szennyezésből eredő egészségügyi kockázatok összefüggnek az expozícióval és annak hosszával, az érintett szervekkel, ezért döntő fontosságú a különböző biológiai szinteken lehetséges hatások azonosítása. Ezek a biológiai szintek a következők: kémiai szint, biológiai szint, sejtek, szövetek, szervek és szervrendszerek, mint pl. az emésztő-, légző-, endokrin-, reprodukív- és az immunrendszer.

A mikroműanyagok hatása a szervezetre



PVC mikroműanyag hatása a bélre (A,B,C rész) és bejutása a lépbe D,E,F rész)

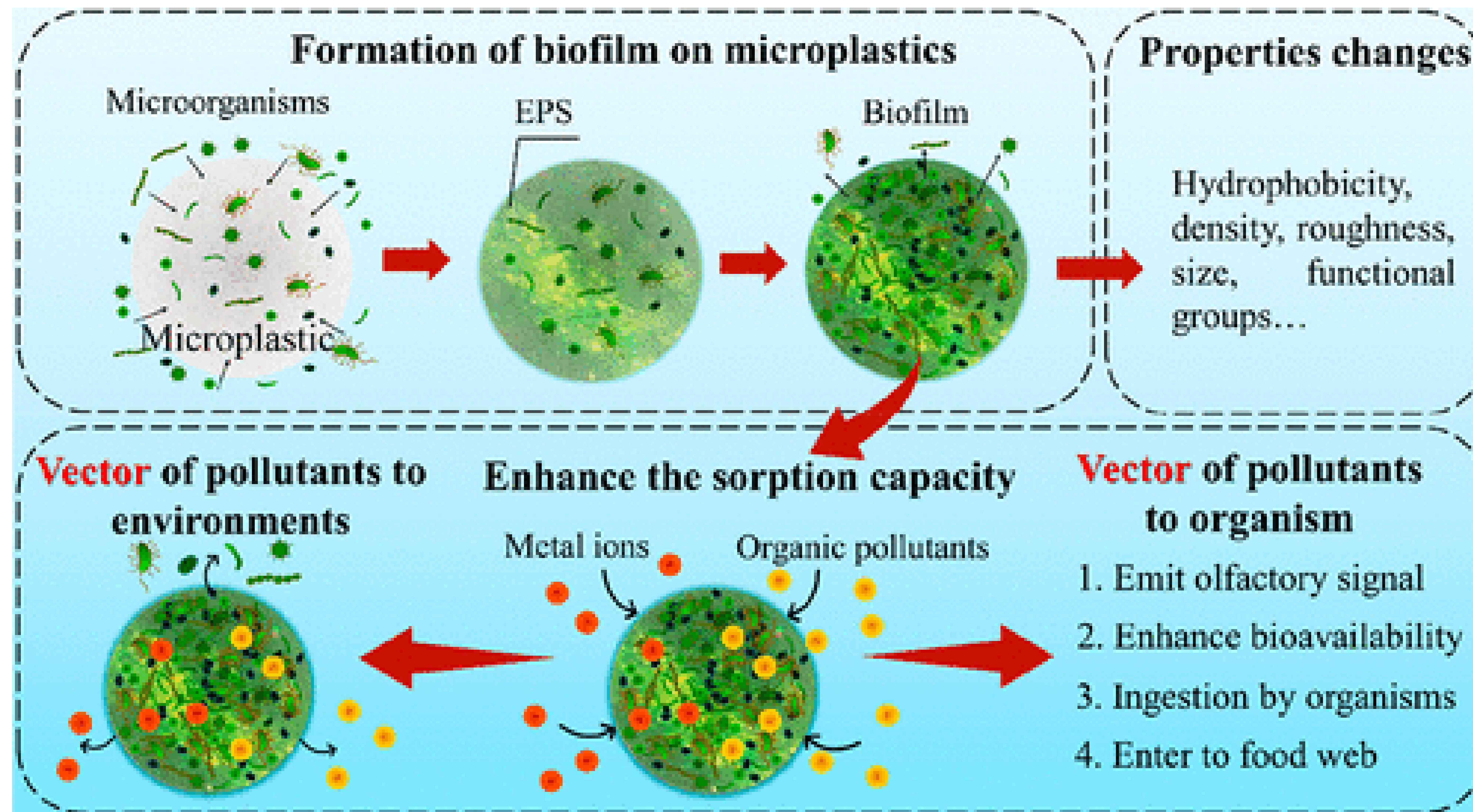
A és D kontrol. B és E alacsony dózisú PVC, C és F magas dózisú PVC

A mikroműanyagok képesek behatolni az állati, növényi sejtekbe és szövetekbe. Felhalmozódhatnak és egyrészt mechanikailag roncsolják a sejteket, másrészt biokémiai reakciókat okozhatnak, továbbá potenciálisan vagy maguk a műanyagok, vagy bomlás termékeik toxikus hatásúak.

Hatásuk:

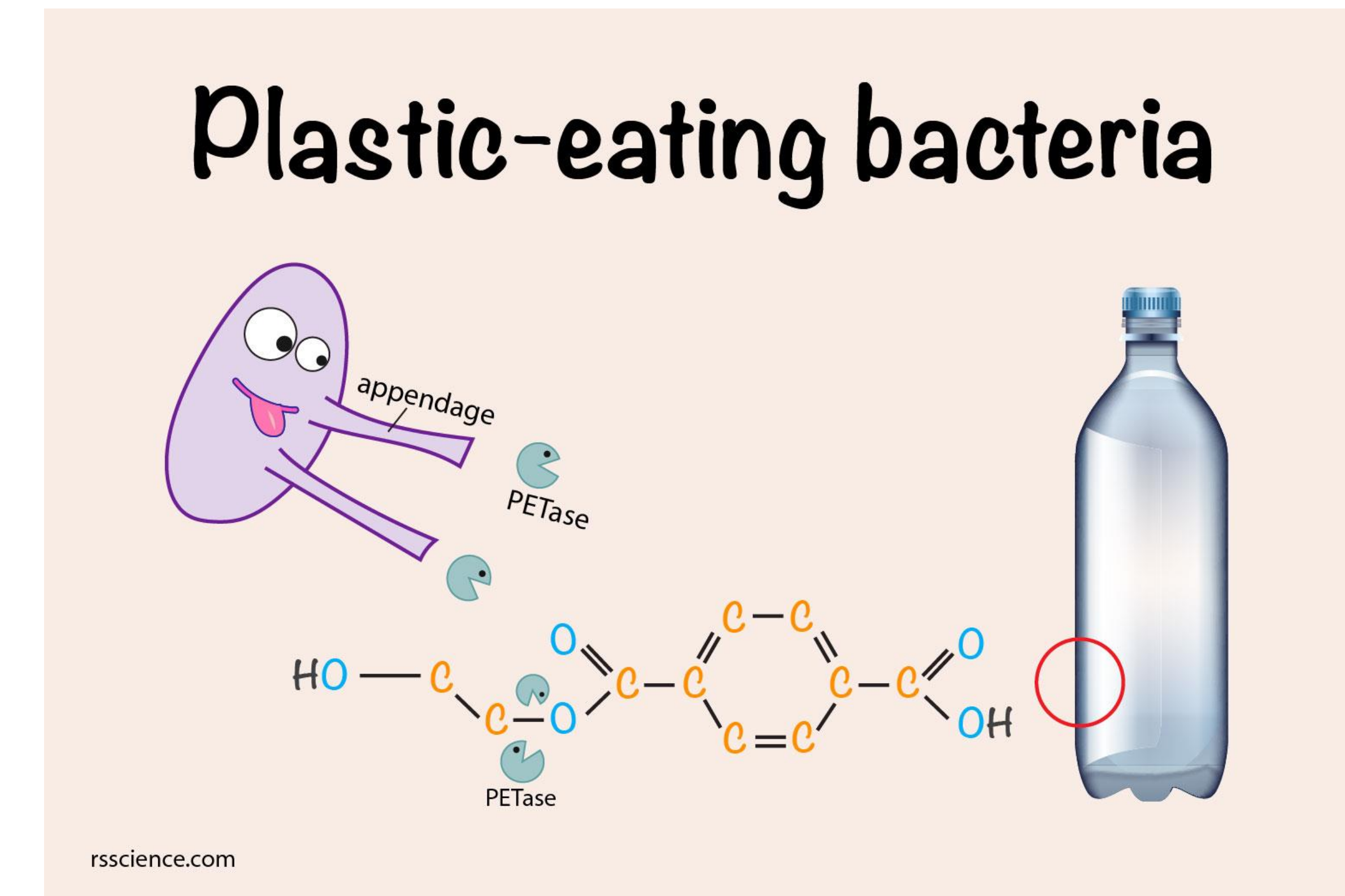
- Máj, vese, lép, tüdő károsodás
- Meggyengült immun rendszer
- Szaporodásbiológiai eltérések
- Bél mikrobiota változás – diszbiózis
- Vérrendszer abnormalitása
- Gyulladásos folyamatok

Biofilm képződés a műanyag részecskéken



Komplex folyamat, melynek egyedi jellegzetességei és hatásai vannak

Műanyagbontó baktériumok



A műanyagok „nem természetes” anyagok, így a baktériumok nem fejlesztettek ki korábban olyan enzimrendszert, amely a bontást lehetővé tenné.

Azonban a baktériumok nagyon képesek a környezetükhöz alkalmazkodni, nagyon gyors evolúcióra képesek.

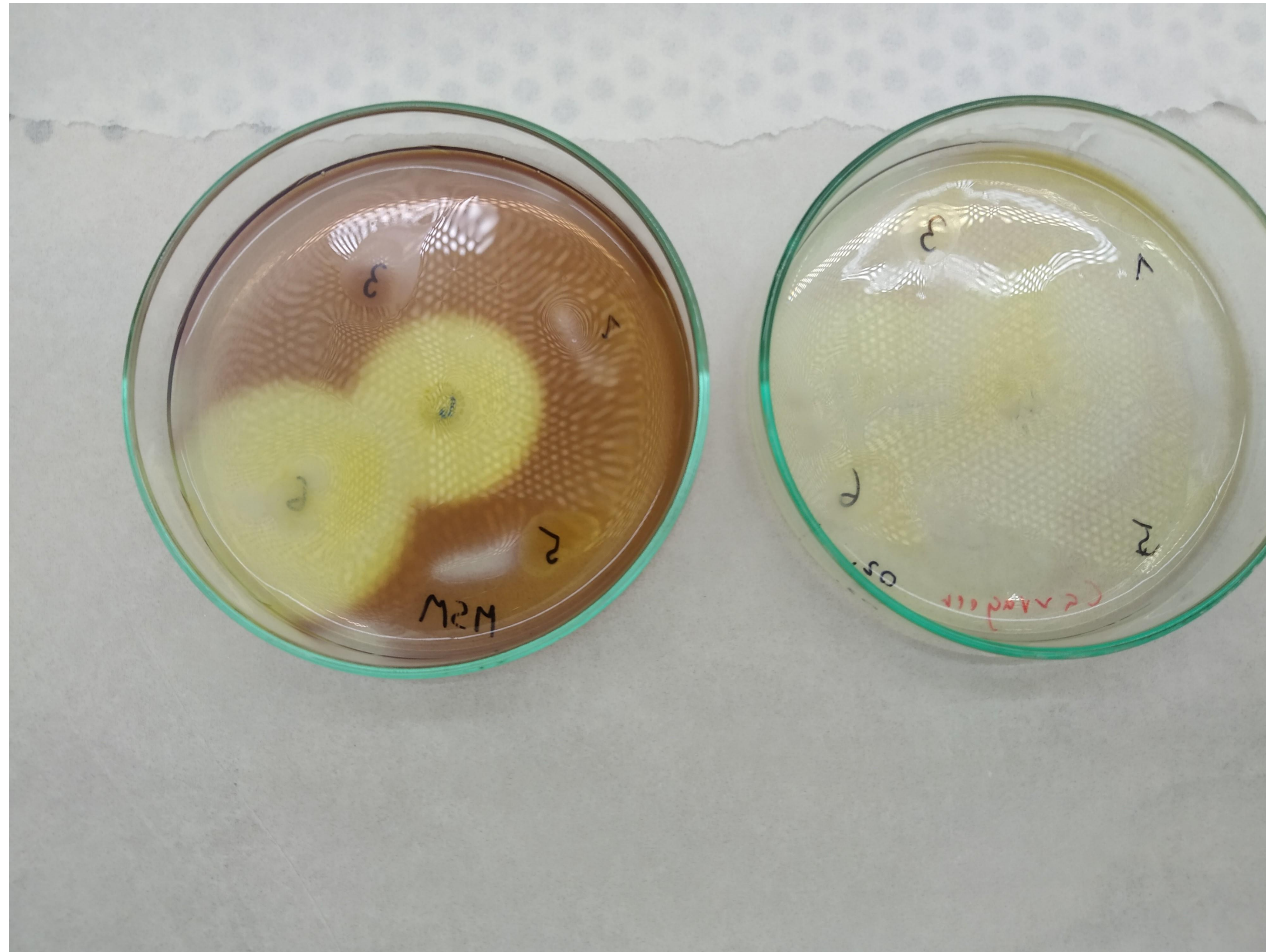
Így a természetben kialakultak olyan fajok, törzsek, melyek képesek a bontásra.

Azonban ez a bontás csak megfelelő táplálék hiányában valósul meg általában.

A műanyagot a baktériumok enzimek segítségével képesek lebontani. Ezeket az enzimeket nem új gének, hanem már meglévő gének mutáns változatai kódolják.



Műanyagbontó baktérium izolátumok



Fajnév	Törzs	honnan lett izolálva,	Izolálási körülmény	Műanyag bontás	Bontó %
Bacillus flexus	DSM-1320, ATCC 49095	pozitív kontroll	megvettük törzset	PVC	0,17
Pseudomonas aeruginosa	NCTC 8060, DSM 1253	pozitív kontroll	megvettük törzset	PVC	1,49
Bacillus subtilis	13Pae	patkány	aerob	PVC	0,53
Bacillus subtilis	40Nyana-ana	nyúl	anaerob	PVC	2,70
Bacillus subtilis	19anaP	patkány	anaerob	PVC	0,60
Bacillus subtilis	18aeP	patkány	aerob	PVC	0,38
Bacillus badius	P-12ANAW1	patkány	anaerob	PET	0,43

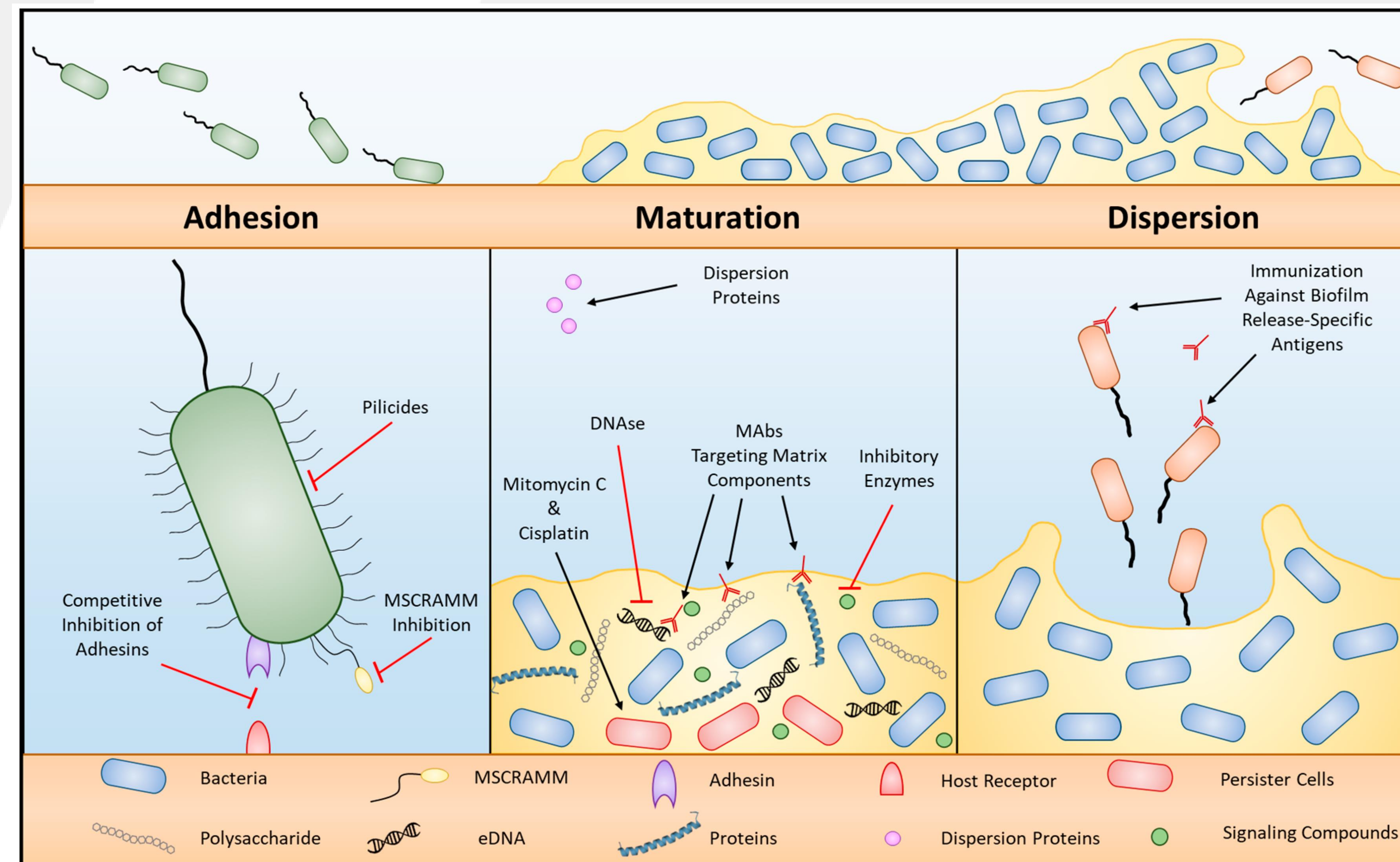
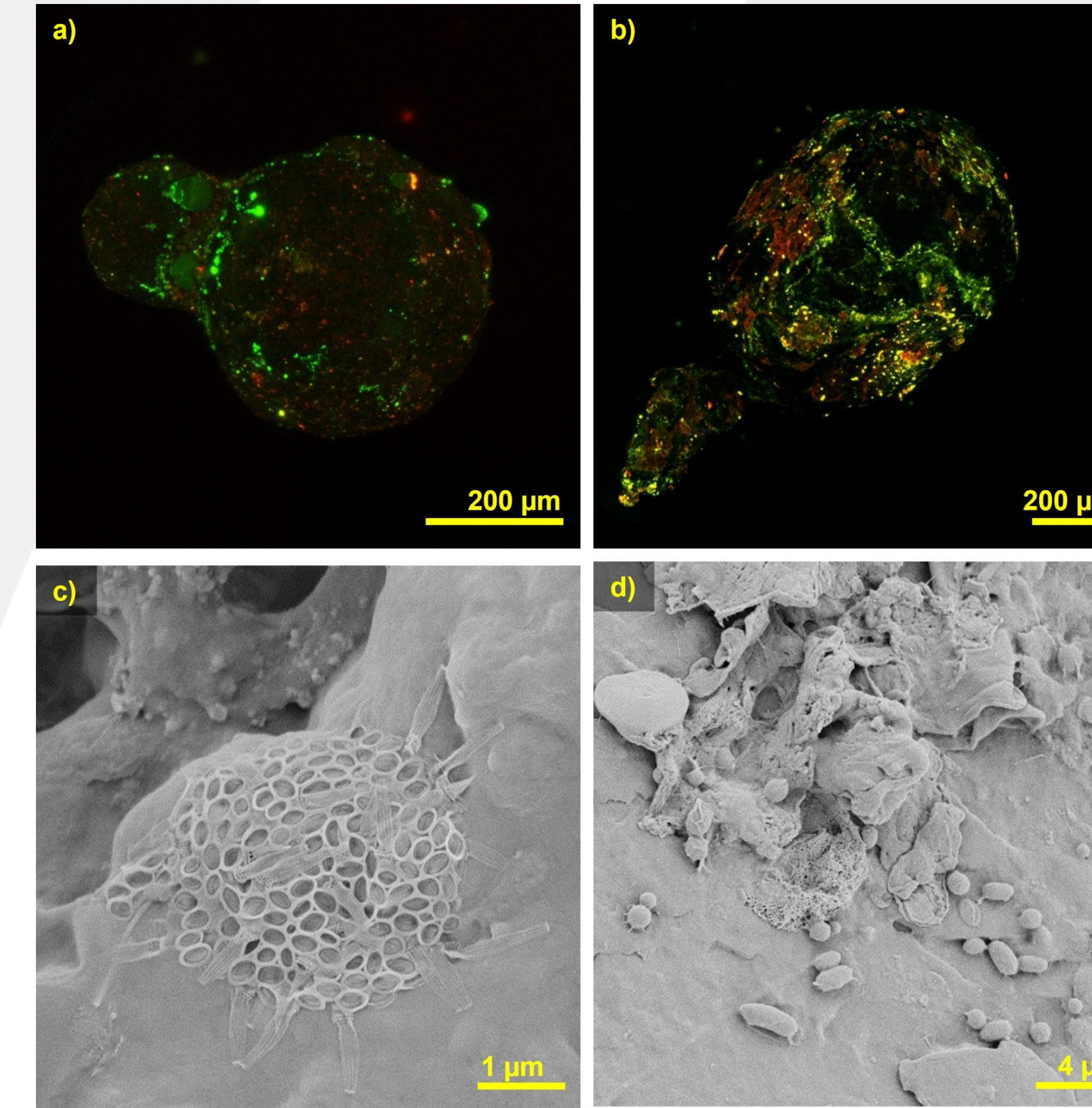


STED tervek

- Potenciális műanyagbontó baktériumok képeznek-e biofilmet PVC mikroműanyag részecskéken?
- **Potenciális műanyagbontó baktériumok alkotnak-e konzorciumot a biofilmben?**
- Környezeti minták biofilmjeibe integrálódnak-e a potenciális műanyagbontó baktériumok?



Köszönöm a megtisztelő figyelmet!



Role of colonic microbiota and microbial biofilms in colorectal carcinogenesis

