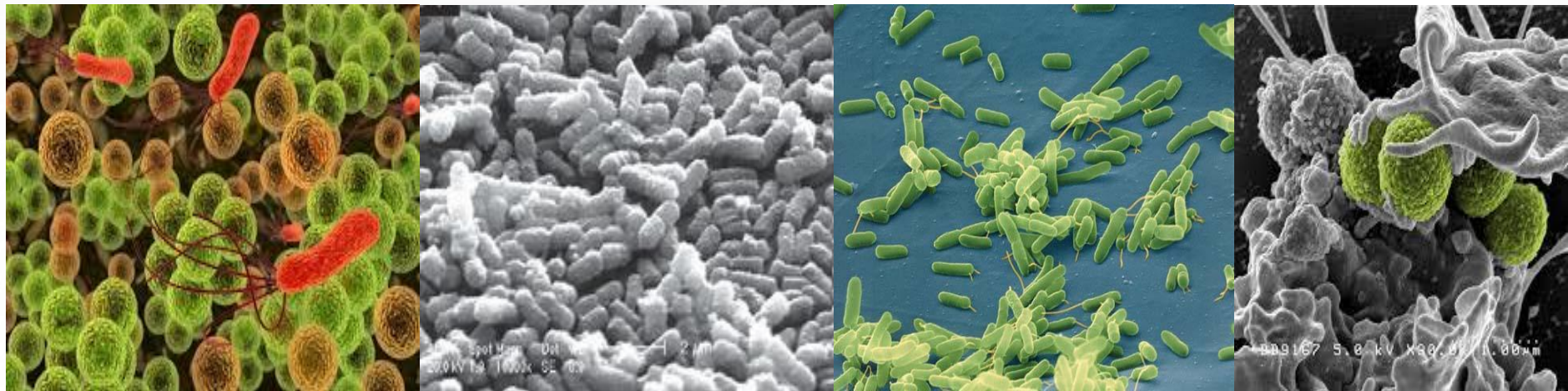


Biofilm

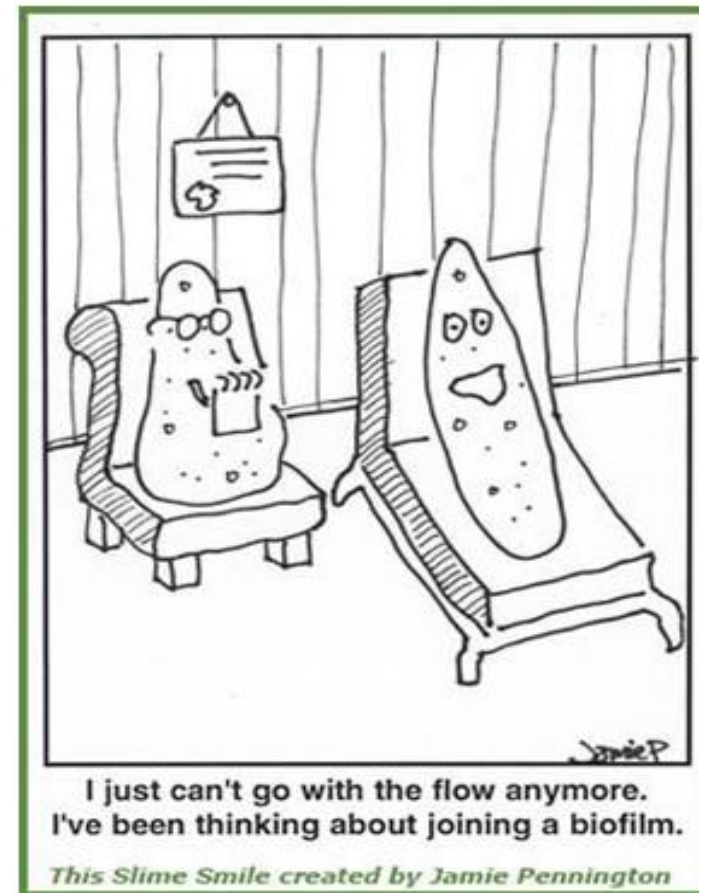


Licenciatura en Bioquímica
Licenciatura en Biotecnología-2019

Objetivos

- Describir la estructura y formación de biofilm
- Mencionar los sistemas de comunicación en el biofilm
- Entender el biofilm como un sistema dinámico
- Establecer la importancia del biofilm en proceso infeccioso

No puedo ir más con la corriente.
He estado pensando en unirme a un
biofilm



Biofilms no son nuevos

Los datos indican que la capacidad de formar biofilms es una característica antigua e integral de las células procariotas.

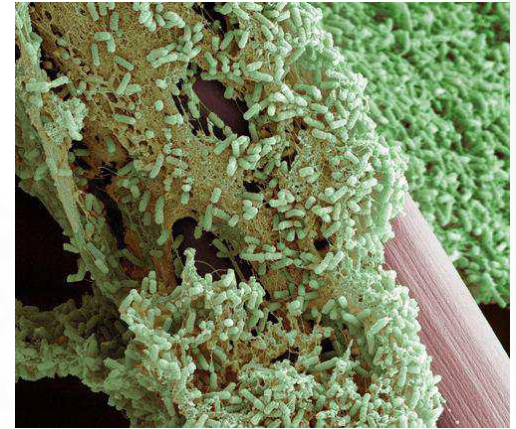
En el contexto de la evolución y adaptación los biofilms proporcionaron la homeostasis de las cambiantes y duras condiciones de la tierra primitiva.

Es decir, permitieron mantener relativamente constante la composición, parámetros físico-químicos característicos dentro de ciertos límites, frente a alteraciones o cambios impuestos por el medio ambiente tales como temperaturas extremas, pH y de exposición a la luz ultravioleta.

Biofilm

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- bacterias planctónicas, de libre flotación,
- bacterias sesiles, en colonias de microorganismos que forman biofilms.



Representan la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de nuestra vida:

tratamiento de aguas residuales

corrosión de materiales

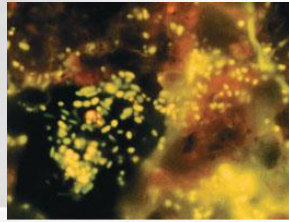
contaminación de alimentos en la industria alimentaria

colapso de tuberías

las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera

infecciones bacterianas asociadas a biofilm

Biofilm

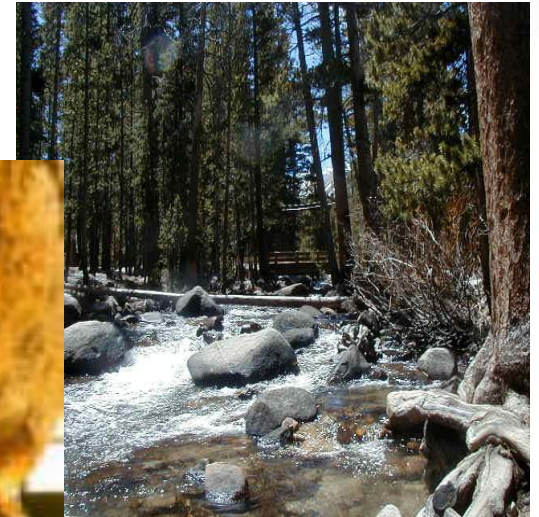
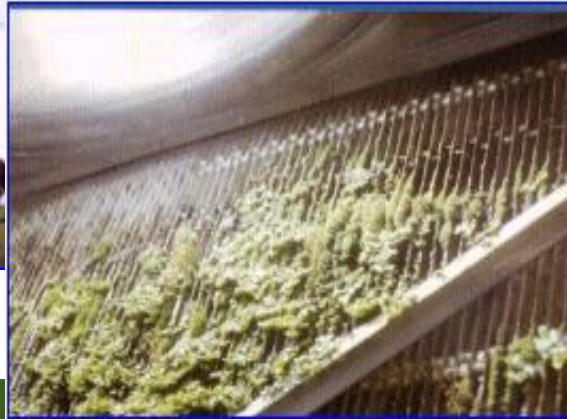


Los biofilms microbianos son microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo y embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado (EPS, proteínas, ADN, lípidos).

En 1684, Anthony van Leewenhoek comentó sobre la gran acumulación de microorganismos en la placa dental en un informe de la Royal Society de Londres: *"El número de estos animálculos en la capa de los dientes de un hombre son tantas que creo que exceden el número de hombres en un reino"*.

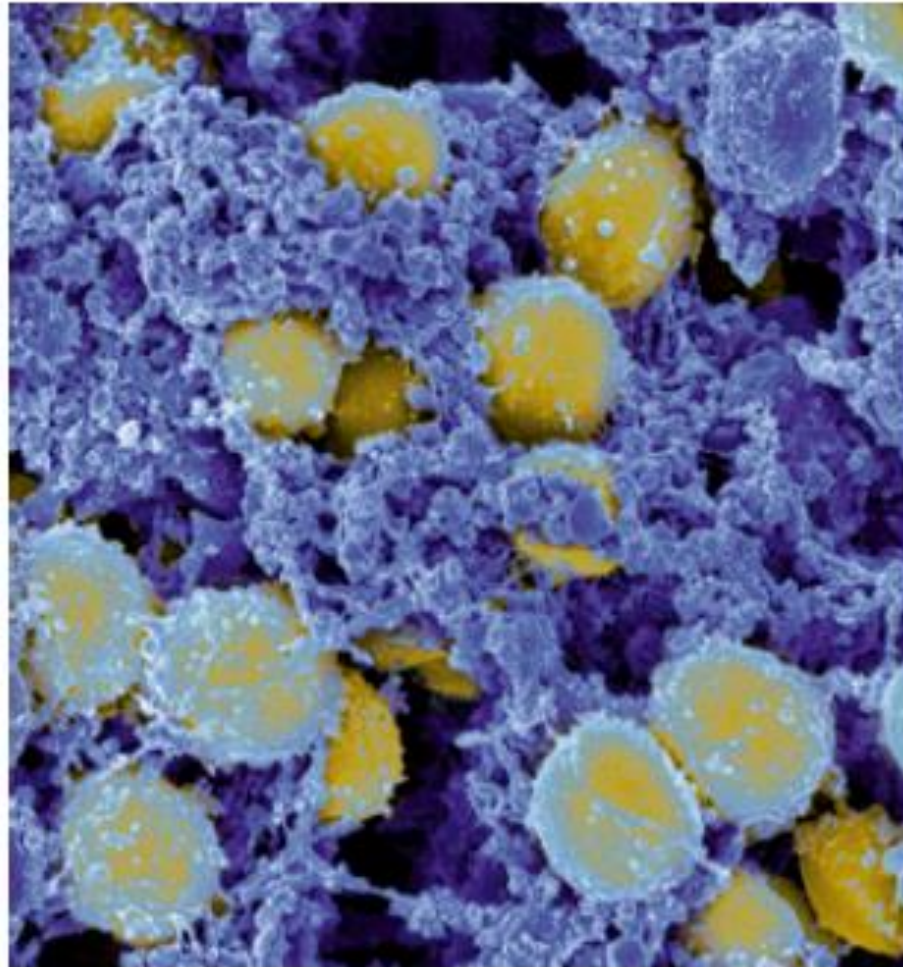
Sin embargo, desde Koch, los bacteriólogos y clínicos se han abocado al estudio de los microorganismos planctónicos, limitando la comprensión respecto a las interacciones entre bacterias y huéspedes.

Biofilms son ubicuos



Blgo. Carlos A. Fernández Miño

Los biofilms aparecen temprano en el registro fósil;
particularmente en ambientes hidrotermales



M. Otto, D. Dorward, E. Fischer and A. Mora, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA.

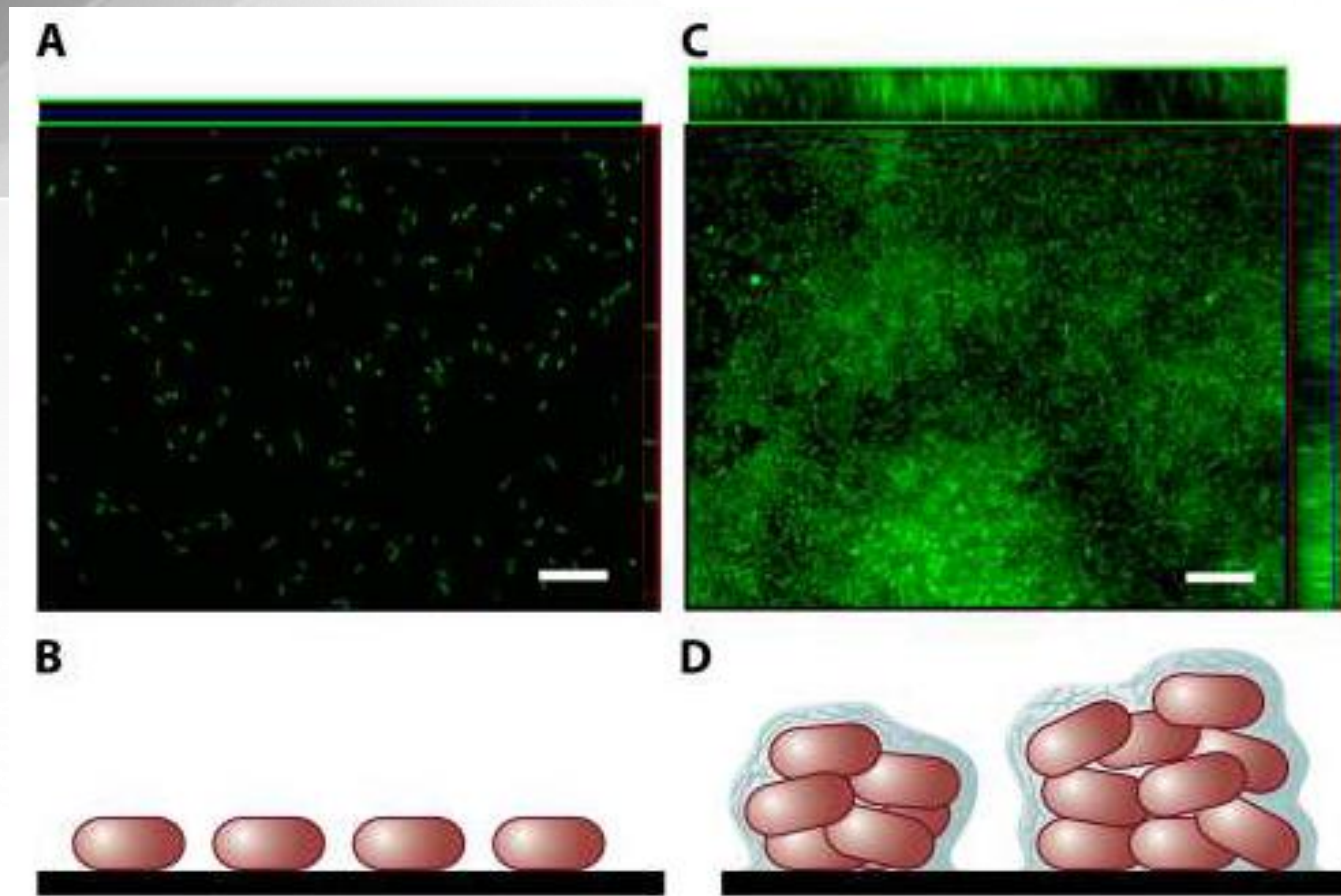
Microscopia electrónica de biofilm de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes asociados a la comunidad; embebido en una matrix extracelular formada sobre un catéter

Etapas de la formación del biofilm

Es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes:

- Adhesión: Una vez que las bacterias perciben una superficie proceden a formar una unión activa vía apéndices (fimbrias, flagelos o pili).
- Crecimiento: la bacteria adherida se divide y se extienden alrededor formando una microcolonia; elaboran EPS que constituye la matriz del biofilm, se despliega una formación tridimensional, generando estructuras similares a hongo
- Separación o desprendimiento: para colonizar nuevas superficies

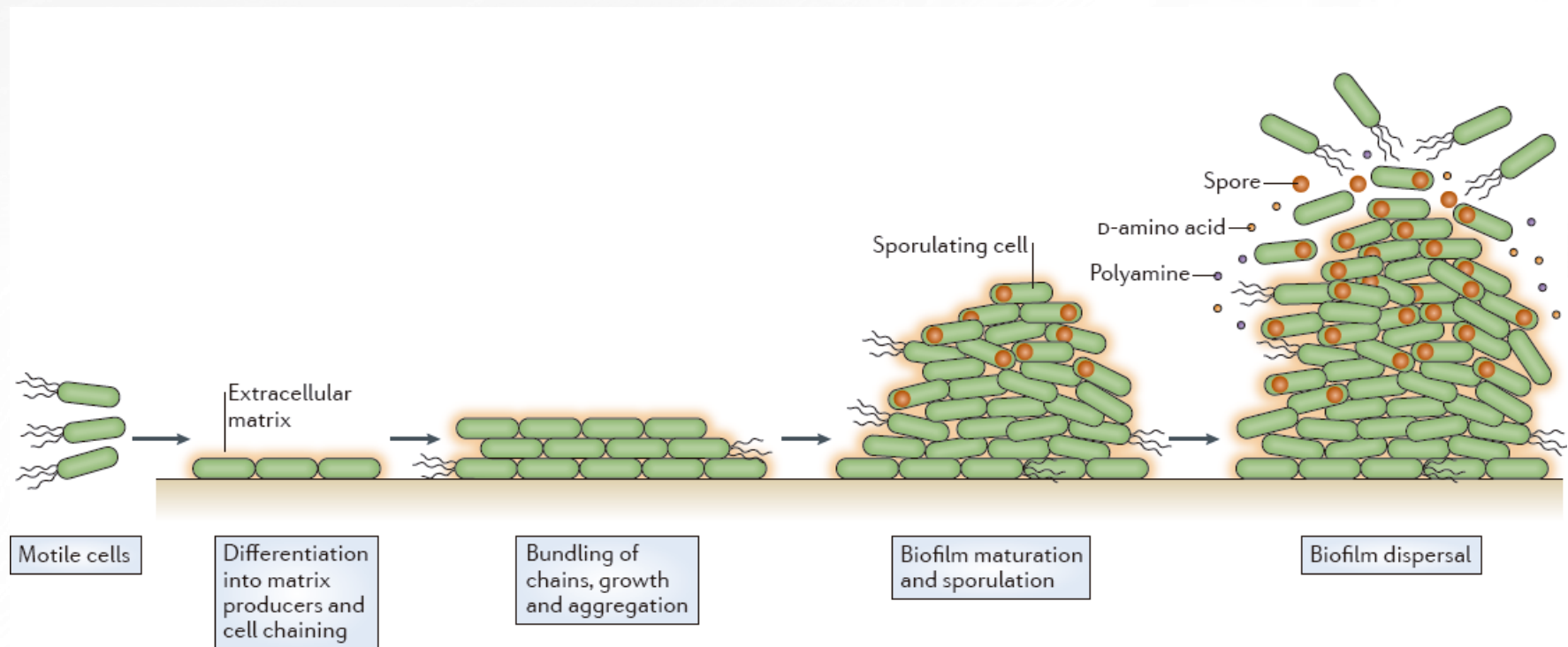




Biofilms en mono y multicapa. (A y C) Se observan secciones transversales de una monocapa (A) y una multicapa de biofilm (C) de *Vibrio cholerae* con microscopia de laser confocal.

(B y D) Representacion esquematica de las vistas laterales de una monocapa (B) y una multicapa (D) de biofilm

Formation de biofilm de *B. subtilis*



Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., Kolter, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 157-168 (2013).

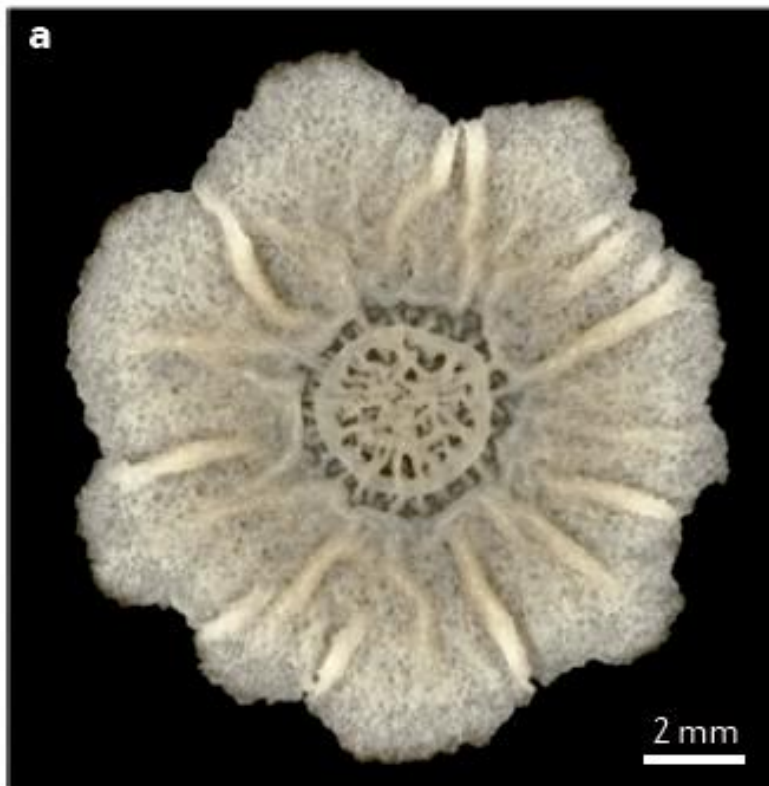
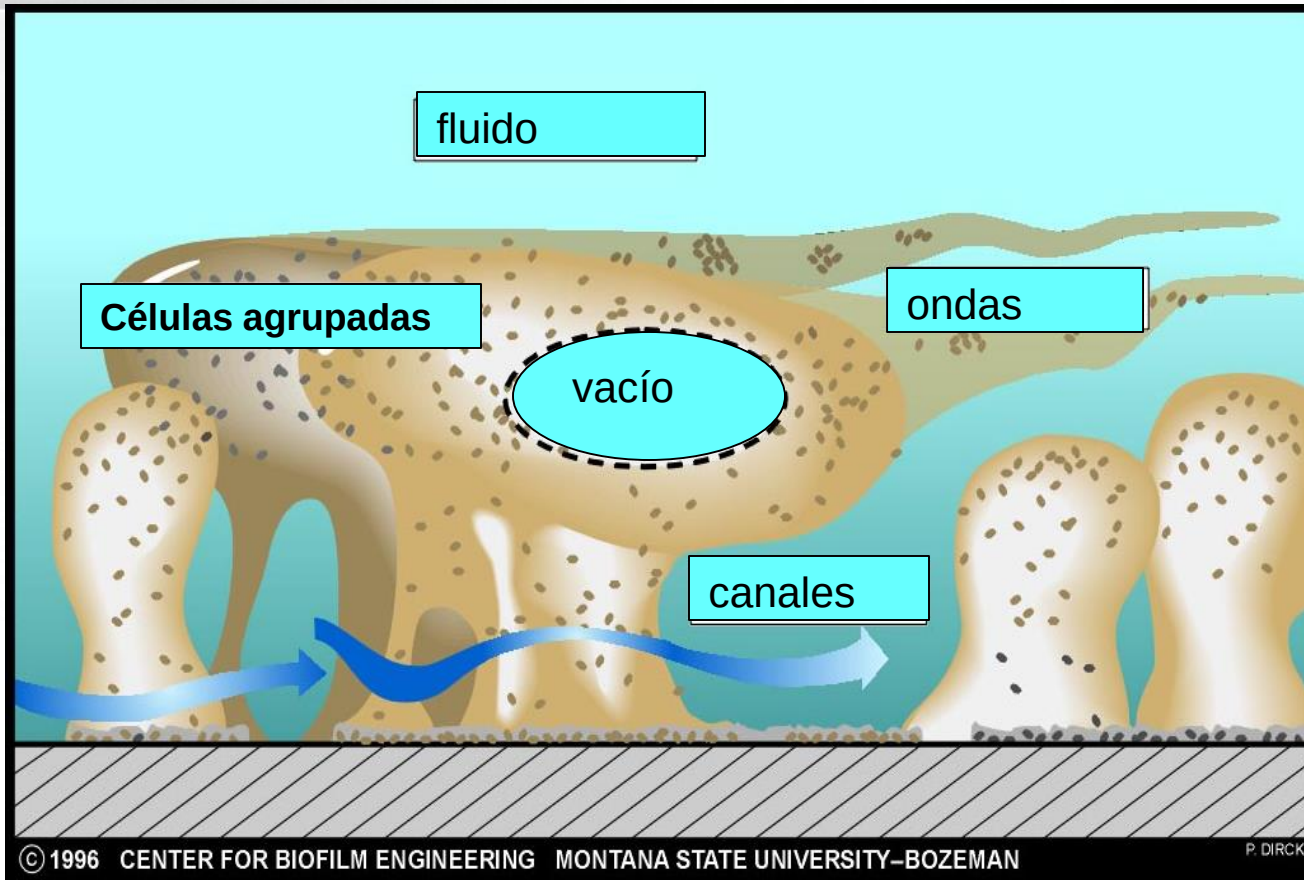


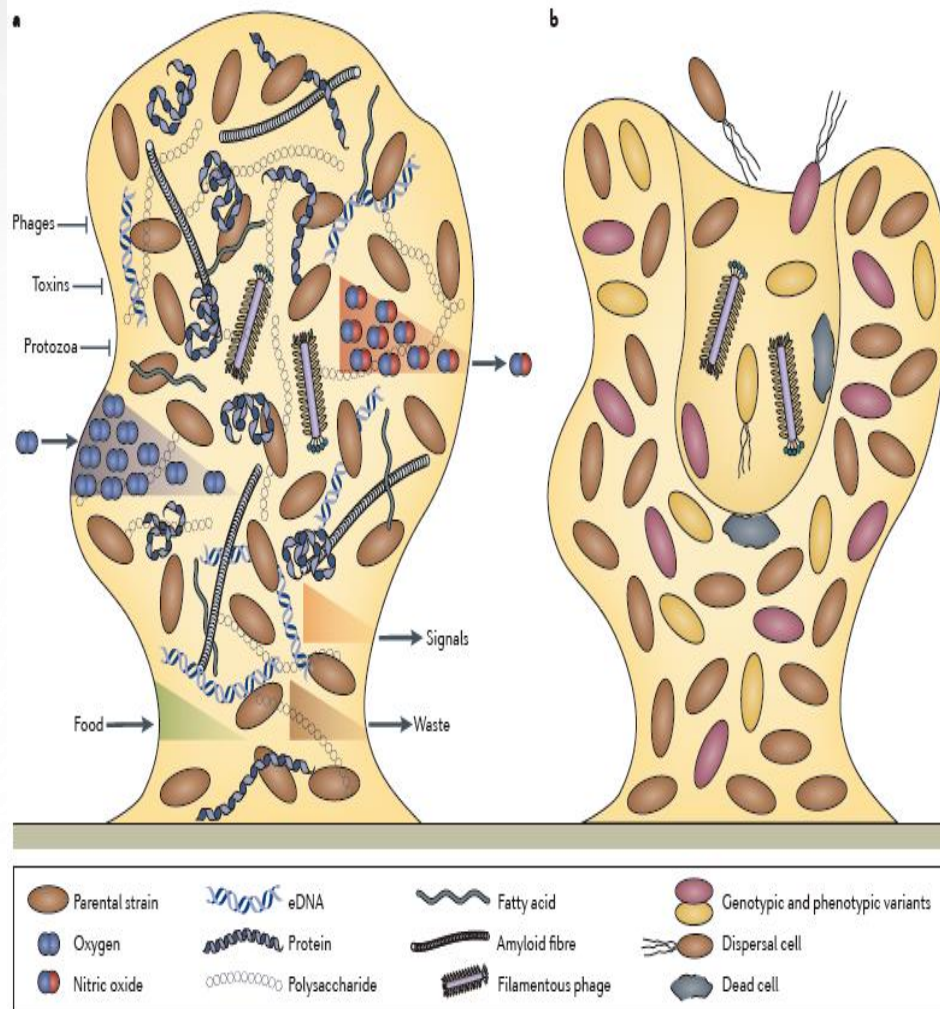
Figure 2 | **Laboratory-grown *Bacillus subtilis* biofilms.** **a** | Top-down view of a colony grown at room temperature on biofilm-inducing medium (MSgg medium) for 7 days. A time-lapse movie of the growth of this colony can be viewed in [Supplementary information S1](#) (movie). **b** | Top-down view of a pellicle grown at room temperature for 5 days. Part **b** image is reproduced, with permission, from REF. 14 © (2001) National Academy of Sciences USA.

Matrix extracelular de biofilms



La estructura del biofilm in situ muestra bacterias sésiles que crecen en microcolonias heterogéneas inmersas en una matriz, intercalados con canales de agua.

Estructura compleja de biofilms bacterianos

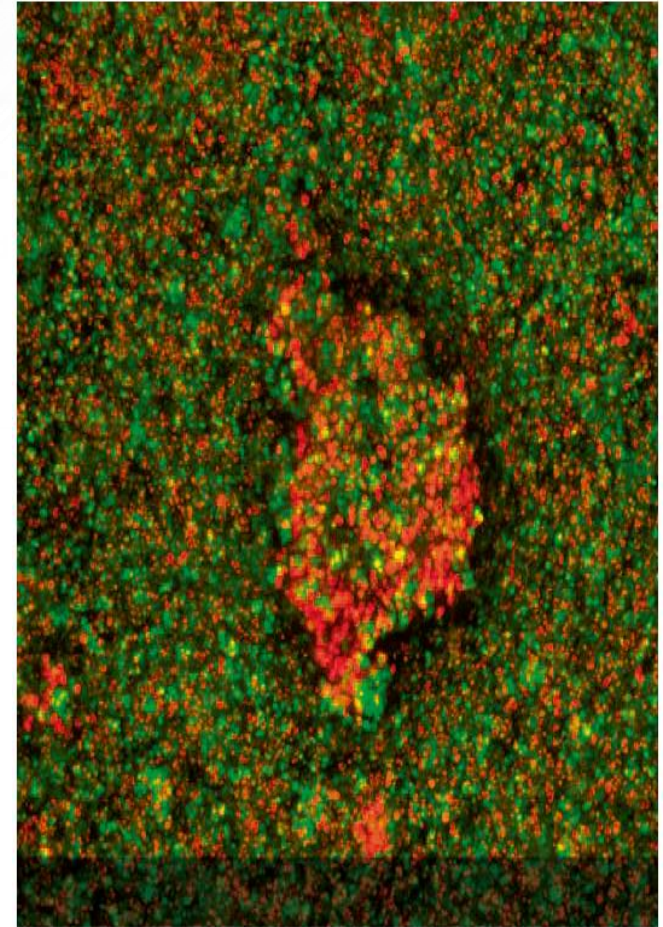


a) Las microcolonias en el biofilms maduro se caracterizan por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), ADN extracelular, polisacáridos, proteínas, fibras amiloides y bacteriófagos. Las funciones de matriz EPS es proteger a la comunidad bacteriana de depredadores tales como protozoos o fagos líticos, así como de las toxinas químicas (biocidas y antibióticos). La matriz de EPS ayuda a secuestrar nutrientes y junto con las bacterias subyacentes es responsable de la creación de gradientes (oxígeno y los nutrientes que se difunden hacia el interior, y los productos de desecho como el óxido nítrico que difunden al exterior).

b) En el momento de la dispersión las microcolonias sufren muerte celular y lisis, junto con la dispersión activa de bacterias móviles se forman huecos. Esta etapa se caracteriza por la aparición de bacteriófagos así como variantes genéticos en el biofilm.

Expresión diferencial de genes

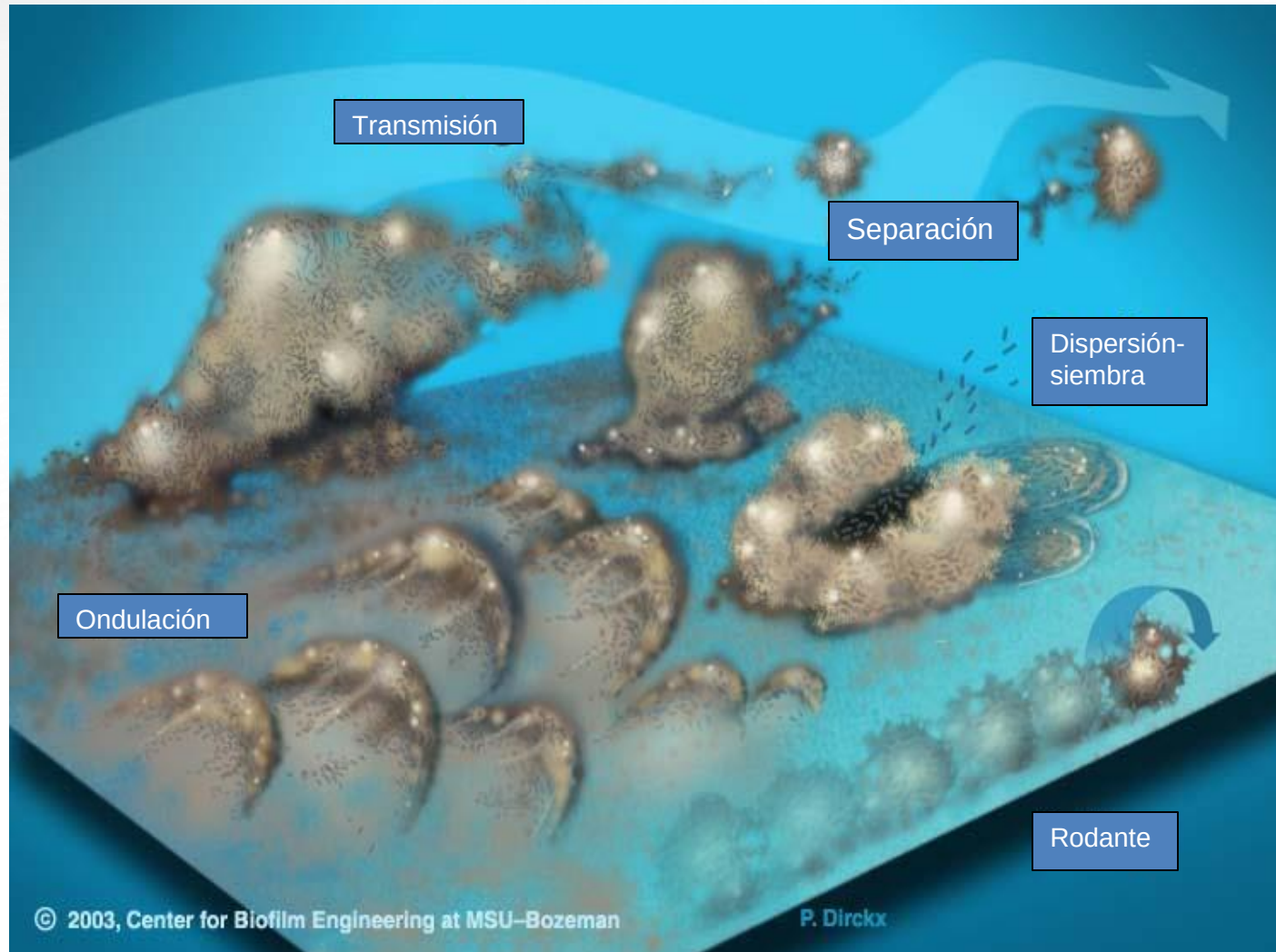
- Pili y flagelos están involucrado en las etapas iniciales (de unión y de formación de microcolonias) del desarrollo de biofilms de *P. aeruginosa*. Estos apéndices no son necesarios para el mantenimiento del biofilm maduro por lo que los genes para la síntesis de pili y flagelos son reprimidos.
- Los operones *cidABC* y *lrgAB* de *S. aureus* regulan la lisis celular (mureína hidrolasa y tolerancia a penicilina) durante la fase estacionaria de crecimiento y en respuesta a la exposición a antibióticos.
- Hay homólogos de genes *CID* / *IRG* presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.



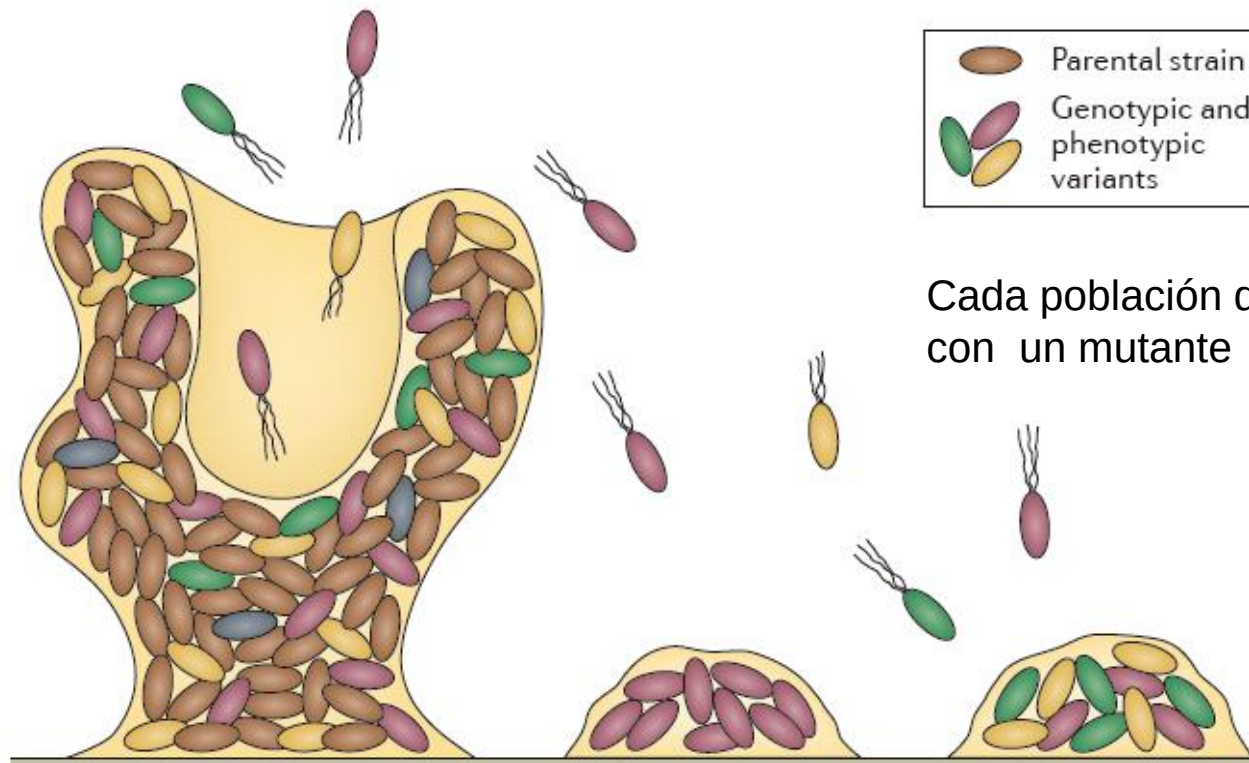
A confocal image (400× magnification) showing a mixed population of live (green) and dead (red) *Staphylococcus aureus* cells within a 3-day-old biofilm. Image by Ethan Mann, University of Nebraska Medical Center, Nebraska, USA.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860-864 (2001).

Movimiento de bacterias en el biofilms



Dispersión activa del biofilm- Variantes de formación



La dispersión de la cepa y sus variantes genéticas, conduce a la unión y la colonización que puede ser iniciado por cualquiera de las variantes individuales posteriores, para generar biofilms clonales, o para formar biofilms mixtos.

Lenguaje de comunicación en biofilm

- Hace algunos años, Watnick y Kolter propusieron la idea que los biofilms pueden compararse con ciudades
- En estas ciudades de microbios, los microorganismos se consideran organismos "sociales" capaces de comunicarse entre sí
- El uso de diferentes idiomas químicos, permite a las bacterias aprender y comprender su población celular actual y determinar cuando han alcanzado una masa crítica
- Gracias a esta información, las bacterias pueden modificar su comportamiento para llevar a cabo procesos que requieren que actúen en conjunto para que el cambio sea eficaz

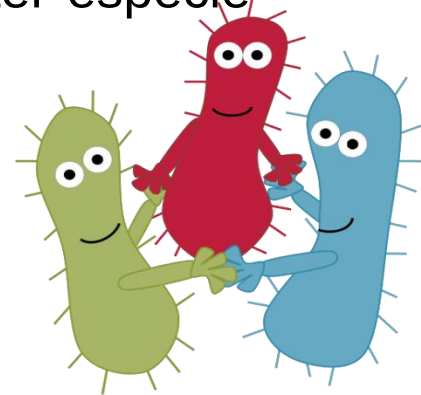
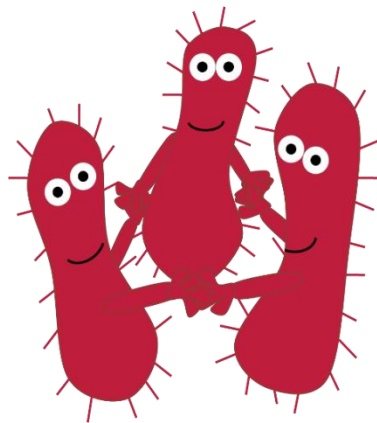
Quorum sensing

En este proceso, las bacterias se comunican a través de moléculas de señalización secretadas llamados "autoinductores", que contribuyen a la regulación de la expresión de genes particulares en respuesta a fluctuaciones en la densidad de población celular.

Las bacterias que poseen quórum sensing requiere dos cosas :
Moléculas de señalización llamadas autoinductores.

Un receptor que detecta específicamente la molécula de señalización.

Dos sistemas quorum sensing son reconocidos en bacterias que permiten la comunicación intra-especies y la comunicación inter-especie





¿Por qué las bacterias hablan unas con otras? Cual es la necesidad del Quorum sensing?

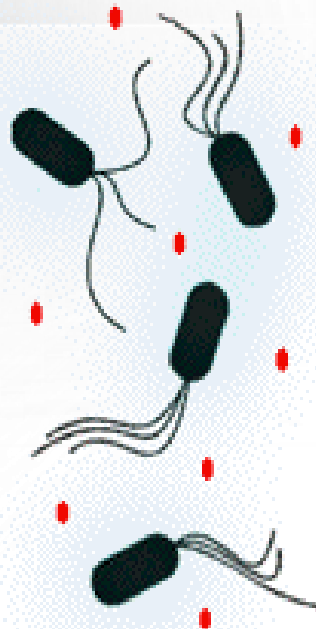
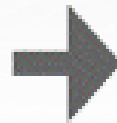
A medida que las condiciones ambientales cambian rápidamente, las bacterias necesitan responder con rapidez a fin de sobrevivir.

La detección de quórum permite a las bacterias coordinar su comportamiento.

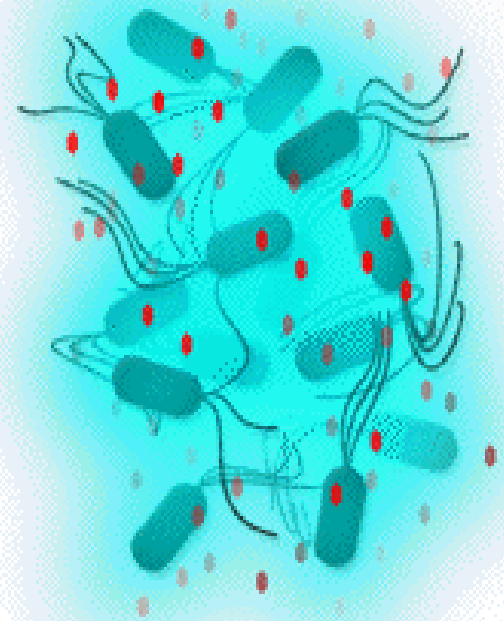
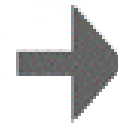
Es muy importante para las bacterias patógenas durante la infección de un hospedador para coordinar su virulencia con el fin de establecer una infección exitosa.



At low cell density the autoinducers (red dots) that are produced diffuse through the cell membrane into the growth media.



As the cell growth continues, the level of autoinducers in the media will start to accumulate in a confined environment. A very low intensity of light emission can be detected.

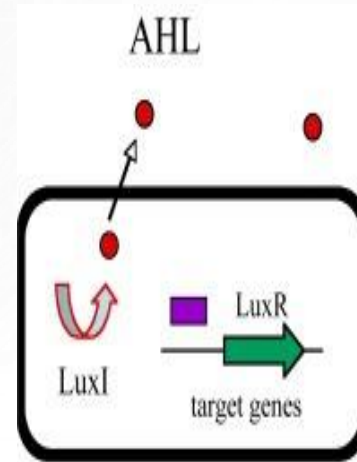


High levels of autoinducers activate the luminescent systems of the luminous bacteria in the media. The regulatory response to the autoinducer leading to induction of expression of the *luxCDABE* genes is termed "QUORUM SENSING."

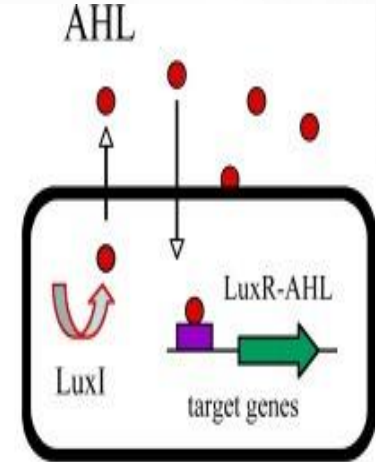
Cuando el inductor se une al receptor, se activa la transcripción de determinados genes, incluyendo los de la síntesis de inductor.

En Gram-negativas

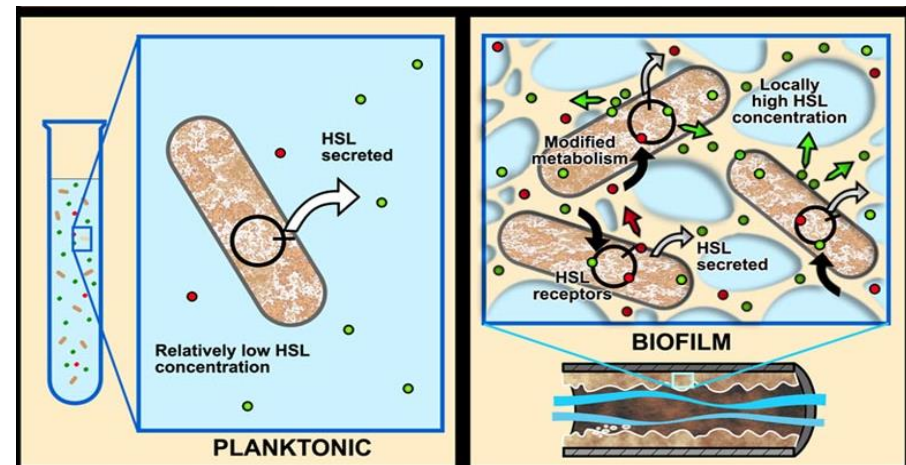
- La detección del Quorum sensing en bacterias Gram-negativas usa el lenguaje de los genes **LuxI** y **LuxR**
- Autoinductor: **N-acyl homoseril lactona (AHL)**
- Es sintetizado por los genes **LuxI** y **LuxR**

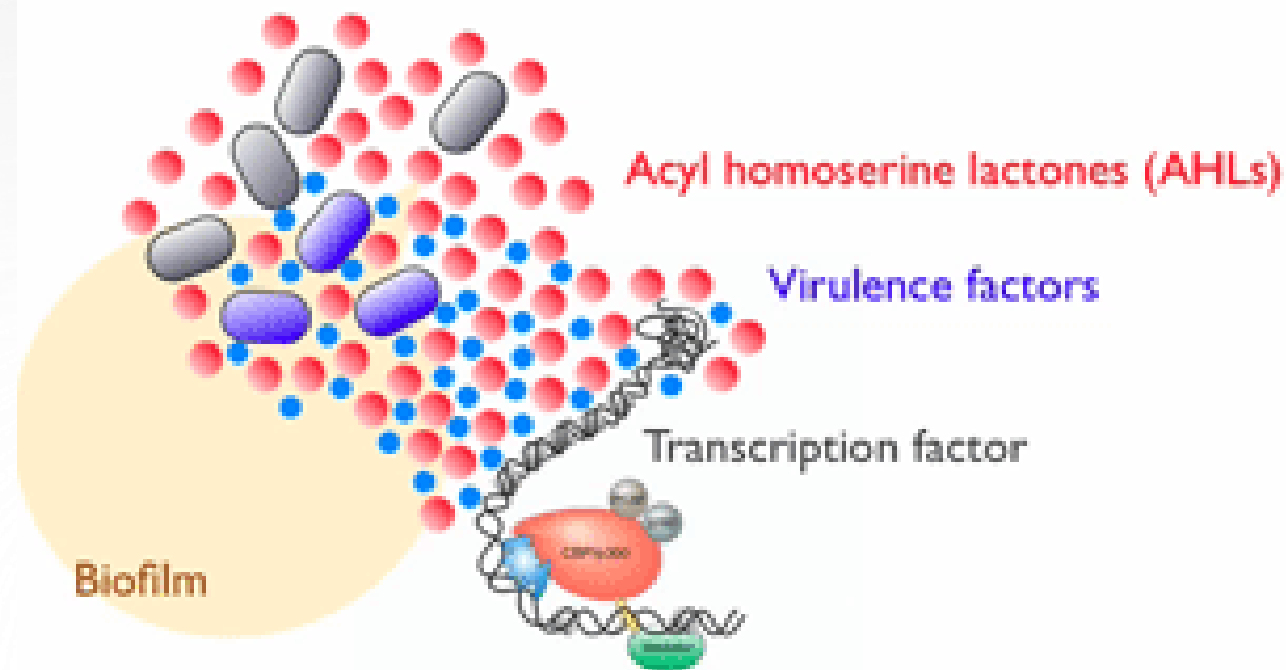


Transcription is not activated at low cell density



Transcription is activated at high cell density



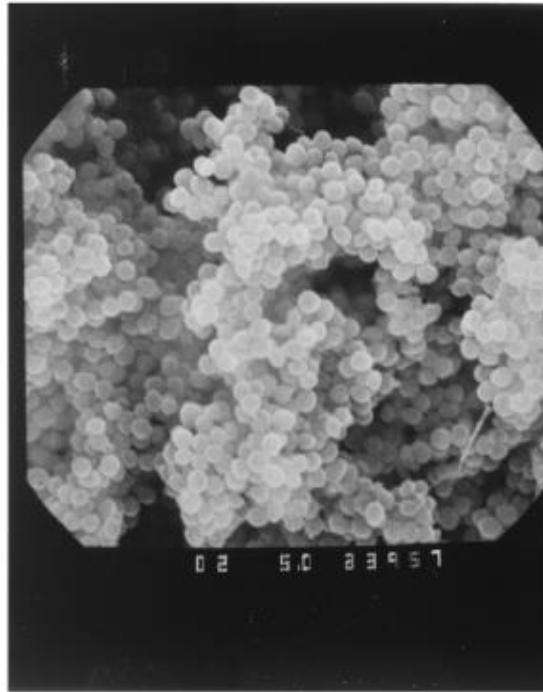


AHLs bind transcription factors and induce virulence genes which code for virulence factors and biofilm.

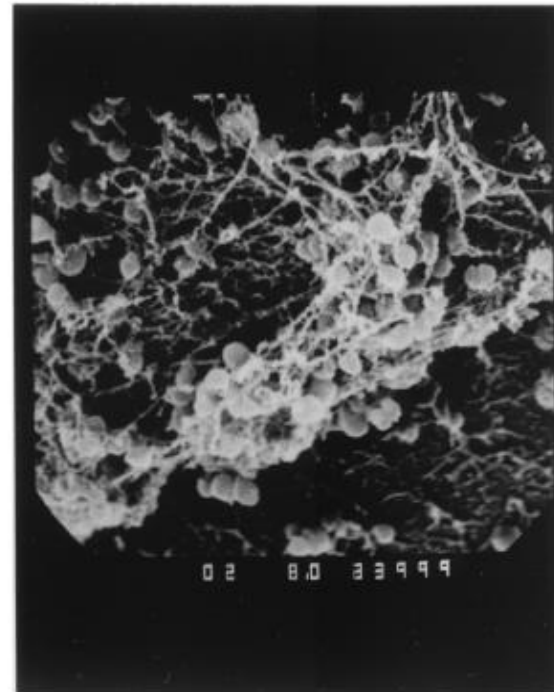
En Gram positivas

- La detección del Quorum sensing in bacterias Gram- positivas usa el lenguaje de péptidos secretados por transportador ABC (ATP binding cassette transporter)
- El péptido señal funciona mediante la unión a una proteína sensor "histidina quinasa", que se encuentra en la membrana celular de la bacteria.
- La histidina quinasa se activa y conduce a la fosforilación del gen regulador y la interacción con otra proteína reguladora facilita la activación transcripcional.

Resistencia a drogas en Biofilms

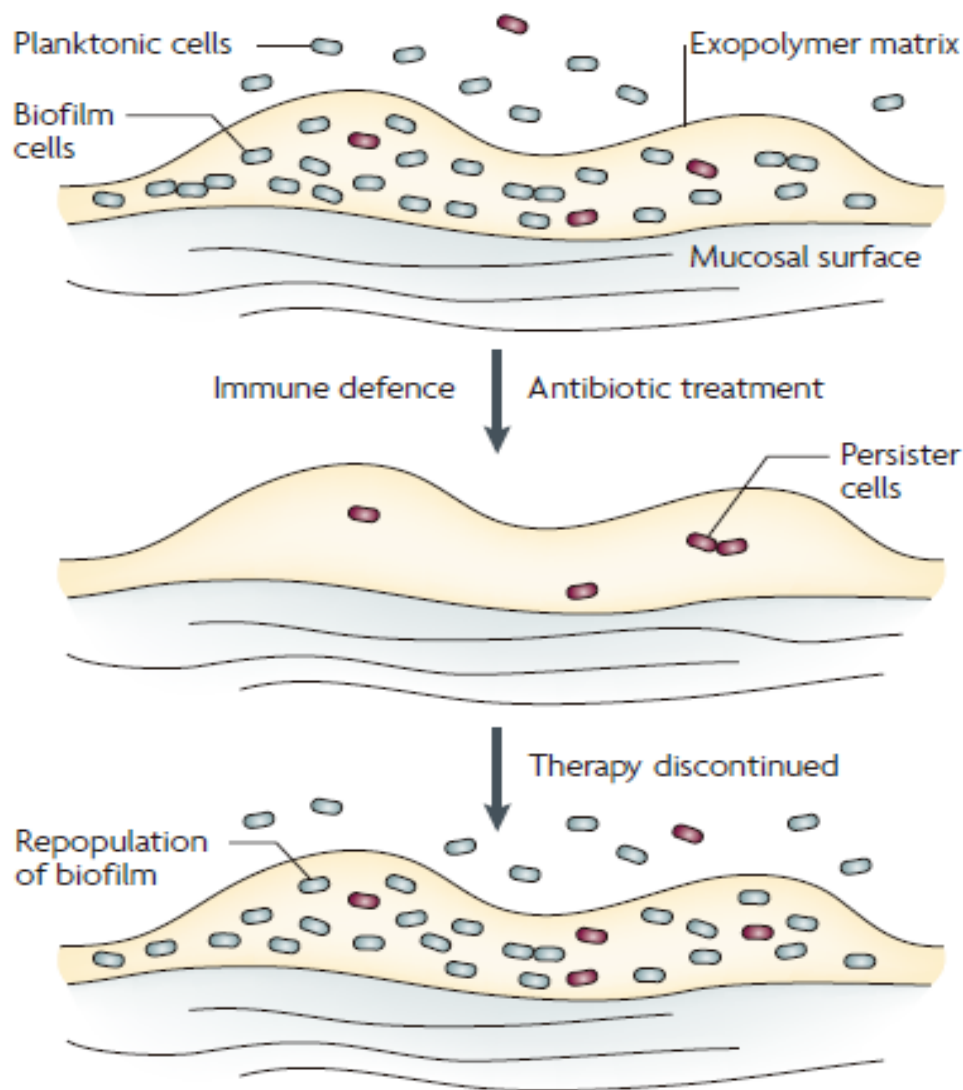


a



b

Micrografía electrónica de barrido de un biofilm no tratada de *S. epidermidis* (a) y un biofilm idéntica expuesta a la vancomicina y rifampicina durante 72 h a concentraciones superiores a la CIM y CBM para el organismo (b). A pesar de los cambios obvios en el biofilm tratado, los organismos viables se recuperaron. La CIM y CBM de ambos agentes se alteraron. Foto: Soc Americana de Microbiología.



Resistencia a los medicamentos en los biofilms es mediada por células persistentes. Además el EPS actúa como barrera de difusión evitando la acción de antibióticos y desinfectantes

Lewis, Kim. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 48-56 (2007).

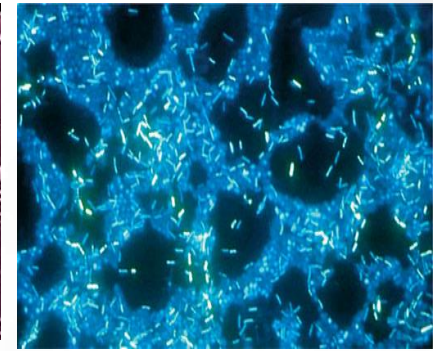
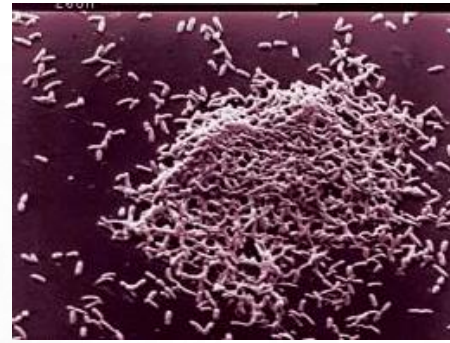
Inducción de genes por Tobramicina

La existencia de un biofilm induce niveles moderados de resistencia a todos los tratamientos antimicrobianos, debido a la capacidad de las bacterias del biofilm de responder a un antibiótico mediante la inducción de genes más específicos a ese antibiótico.

Se comparó biofilms expuestos a tobramicina con biofilms no tratados. 20 genes se expresaron diferencialmente en biofilms tratados con tobramicina: 14 fueron activados y 6 fueron reprimidos por tobramicina. De estos 20 genes, 12 fueron clasificados como genes que codifican para las proteínas hipotéticas de función desconocida.

El tratamiento con tobramicina, provoca errores en la síntesis de proteínas e induciría una respuesta de estrés, con la activación de dnaK y GroES genes.

El Biofilm como factor de virulencia



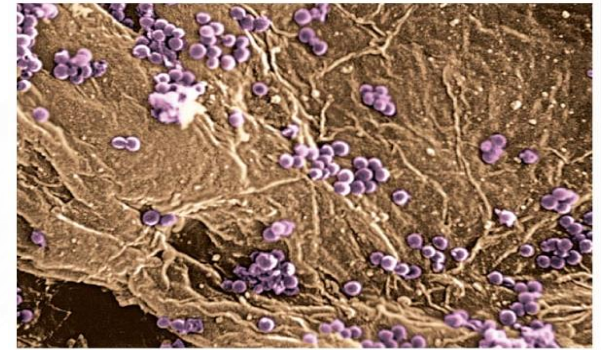
Los biofilms son el principal ejemplo de adaptación fisiológica
resisten fuerzas físicas de arrastre (nicho favorable)
resisten la fagocitosis (evaden SI)
resisten la acción de los antimicrobianos (dosis de ATM hasta 1000 veces superiores)
Intercambio genético

La mayoría de la infecciones intrahospitalarias están relacionadas a infecciones crónicas sobre tejido vivo (fibrosis quística, otitis, neumonía, infecciones urinarias y oculares, osteomielitis, úlceras, placa dental)
o infecciones asociadas a implantes médicos.

Infecciones humanas asociadas a biofilm

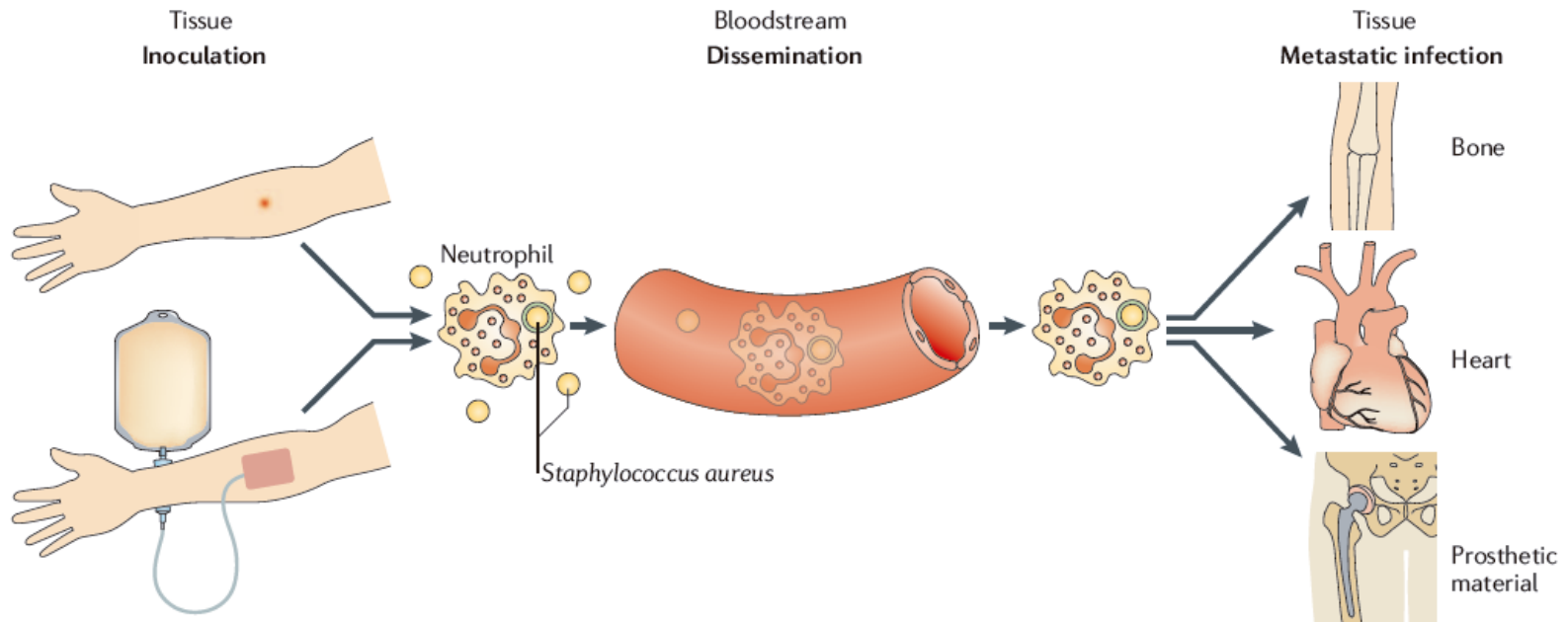
Anatomic location	Infectious disease	Microorganisms
Eye	Ocular infections	<i>S. aureus</i>
Ear	Otitis media	Non-typeable <i>H. influenzae</i>
Mouth	Dental caries Endodontic infections Periodontitis	Acidogenic Gram-positive cocci Gram-positive anaerobic species, <i>Bacteroides</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> Gram-negative anaerobic oral bacteria
Respiratory tract	CF pneumonia Chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> <i>S. aureus</i> and CoNS*
Heart	Endocarditis	Viridans streptococci
Muscle	Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci
Bone	Osteomyelitis	Various bacterial species
Skin	Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Foot	Diabetic foot infection	<i>Corynebacterium</i> spp. and various obligate anaerobes
Prostate gland	Bacterial prostatitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative species
Vagina	Staphylococcal toxic shock syndrome	<i>S. aureus</i>
Biliary system	Gallstone	Enteric bacteria
Urinary tract	Urinary tract infection	<i>E. coli</i> , Enterococci, <i>Klebsiella</i>
Large intestine	Persistent diarrhea	<i>E. coli</i>

* CoNS: coagulase-negative staphylococci.



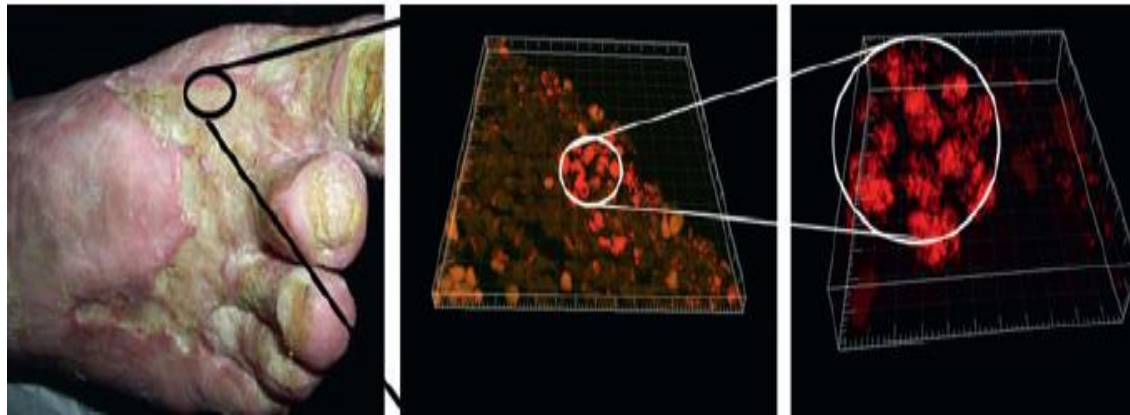
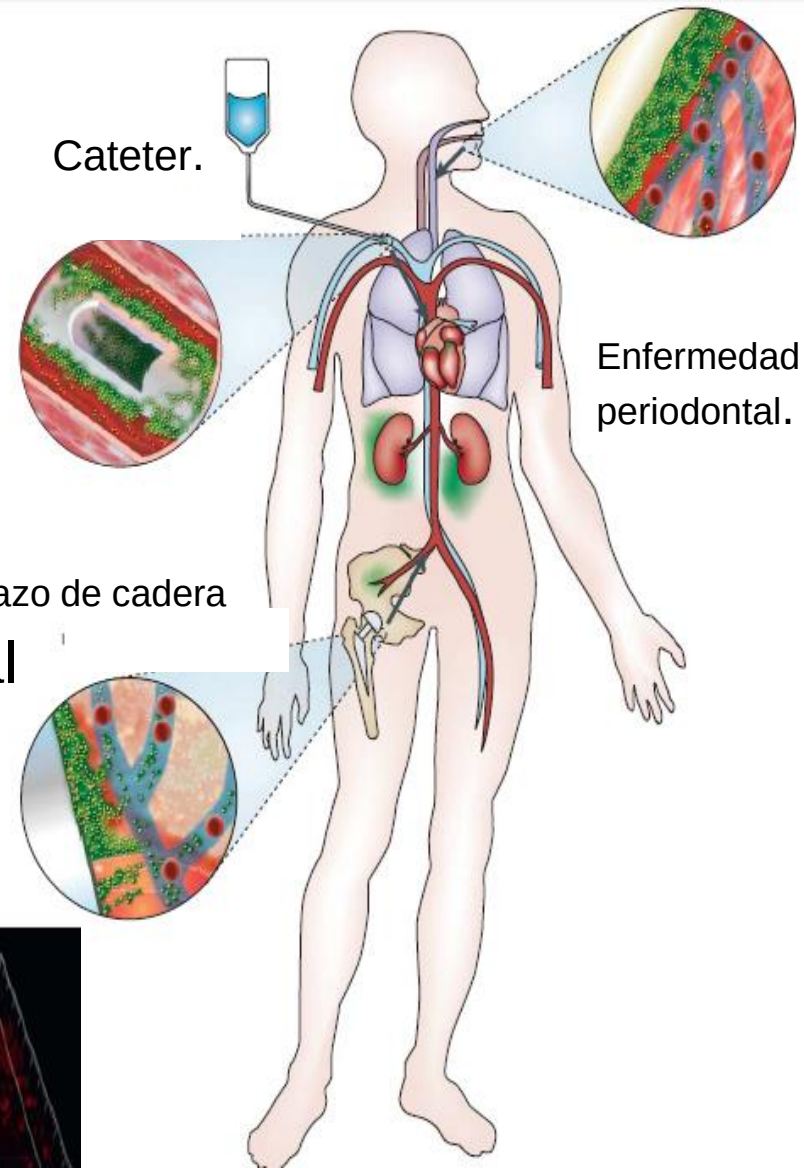
(c) Bacteria (purple) adhering to human skin.

SEM 9 μ m



Progresión de *Staphylococcus aureus* procedente de una fuente contaminada o infectada por el torrente sanguíneo a un blanco metastásico

Difunde en el cuerpo: células individuales o grupos conducir a una bacteriemia
Ej.: válvula de corazón
Endocarditis infecciosa nativa o artificial



Biofilms de *Ps. aeruginosa* a partir de heridas.

Endocarditis en una válvula natural

Es el resultado de la interacción entre el endotelio vascular de las válvulas cardíacas y bacterias u hongos

Streptococcus spp

Staphylococcus spp

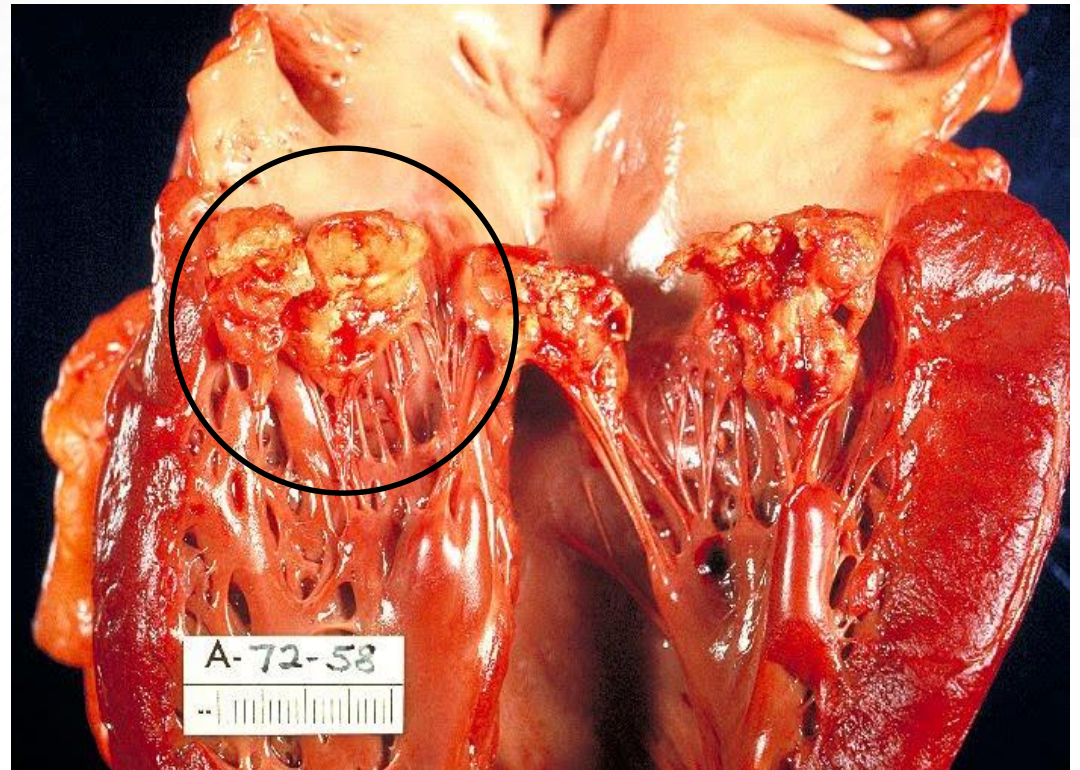
CoNS

E. Coli

Klebsiella spp

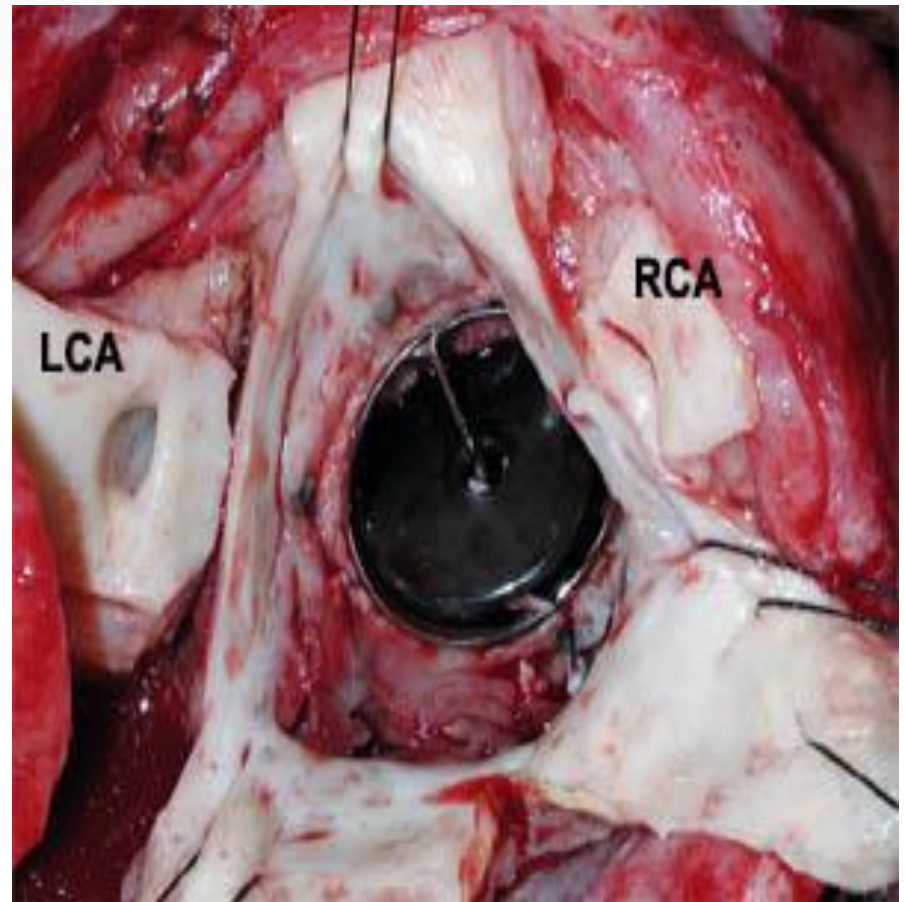
Candida species

Aspergillus spp



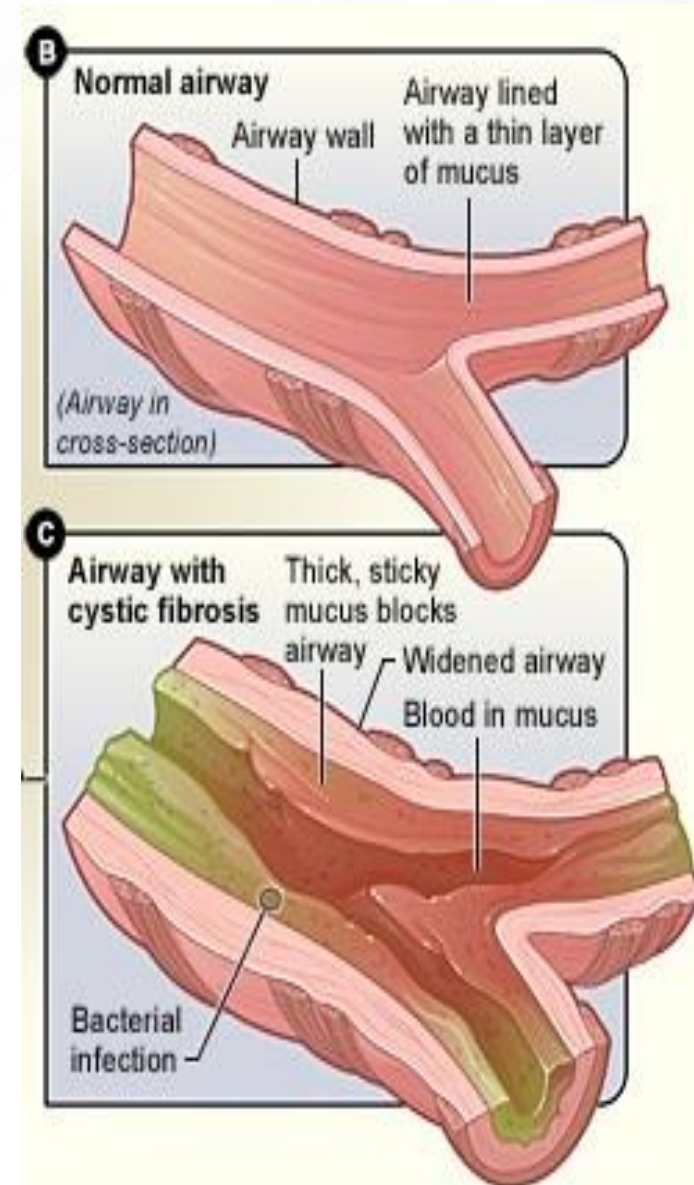
Protesis valvulares cardíacas

La implantación quirúrgica de válvula protésica que conduce a la acumulación de plaquetas y fibrina en el sitio de la sutura y el dispositivo y hay una formación de biofilm.



Fibrosis Quística

- Es una enfermedad que provoca la acumulación de moco espeso y pegajoso en los pulmones, el tubo digestivo y otras áreas del cuerpo
- Esta acumulación de moco provoca infecciones
- *Pseudomonas aeruginosa* es el principal microorganismo involucrado



Otitis media

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Pseudomonas aeruginosa

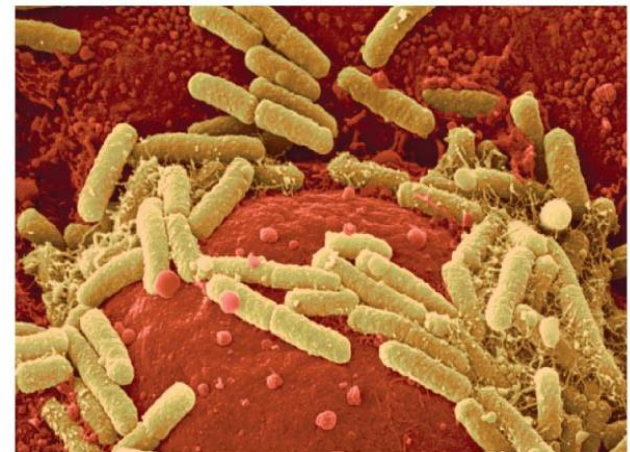
Moraxella catarrhalis



Cateter urinario

Microorganismos forman biofilms cuando se inserta el catéter en la uretra.

Este organismo puede alterar el pH y forma biofilms con el amoníaco y minerales

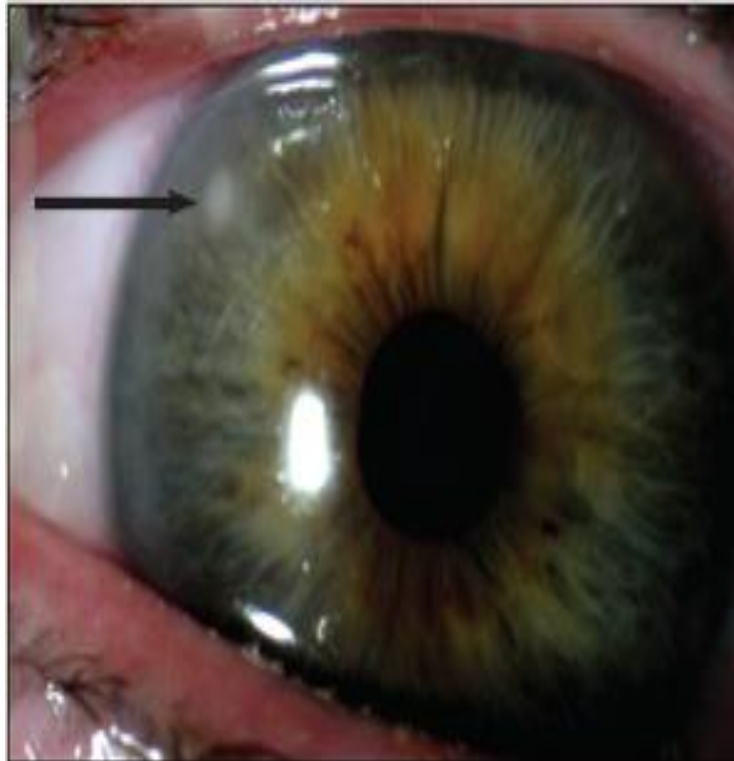


(b) *E. coli* bacteria (yellow-green) on human urinary bladder cells.

SEM 1 µm

Lentes de contacto

Bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens* o *Candida albicans*, se adhieren fácilmente a las lentes



Métodos communes usados en microbiología para recuperar y cuantificar biofilms de dispositivos medicos.

METHOD	BASIC PROTOCOL	ADVANTAGE	LIMITATION
Roll plate	Roll the catheter tip over surface of BA	Easy to use	Examines only outer surface . Inaccurate
Vortex then viable count.	Catheter section in PBS is vortexed then cultured on different media.	Measures intraluminal & extraluminal biofilm.	Recovery efficiency unknown.
Sonicate , vortex, then viable count.	Catheter section in TSB , sonicate , vortex & culture on BA.	Measures intraluminal & extraluminal biofilm.	Recovery efficiency unknown.
Sonicate, vortex, homogenise, then viable count.	Catheter section in PBS/vortex repeatedly then homogenise & culture on BA.	Recovery efficiency determined.	Measures intraluminal biofilms only.

Bibliografía

Madigan MT., Martinko JM, Parker. J. 2015. **Brock, Biología de los Microorganismos.** 14ª ed. Pearson/Prentice-Hall Iberia, Madrid. (Brock Biology of Microorganisms, Editores: Madigan & Martinko, Pearson/Prentice Hall).

Tortora G.J., Funke B.R. , Case C.L. 2017. **Introducción a la Microbiología.** 12a ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.

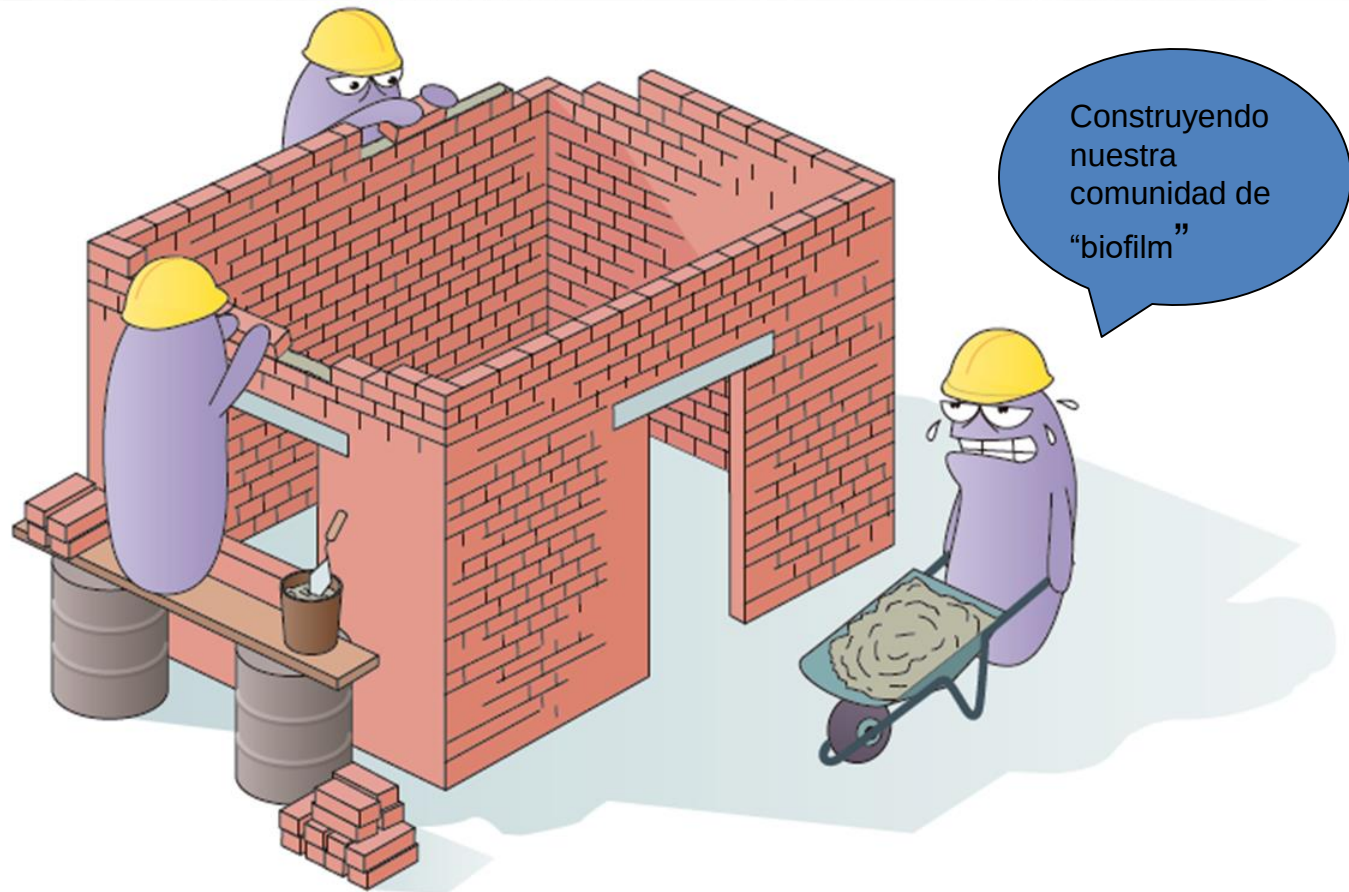
Luanne Hall-Stoodley, J.William Costerton, Paul Stoodley. 2004. **Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases.** Nature reviews microbiology

Toyofuku M, Inaba T., i Kiyokawa T., Obana N. Yawata Y., Nomura N. 2015. **Environmental factors that shape biofilm formation.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry1347-6947

Imágenes extraídas de:

<http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter001/section002/green/page001.html>

AMPIS Published by Blackwell Publishing Ltd. 2013



Muchas Gracias!!