

## Che cos'è un biofilm?

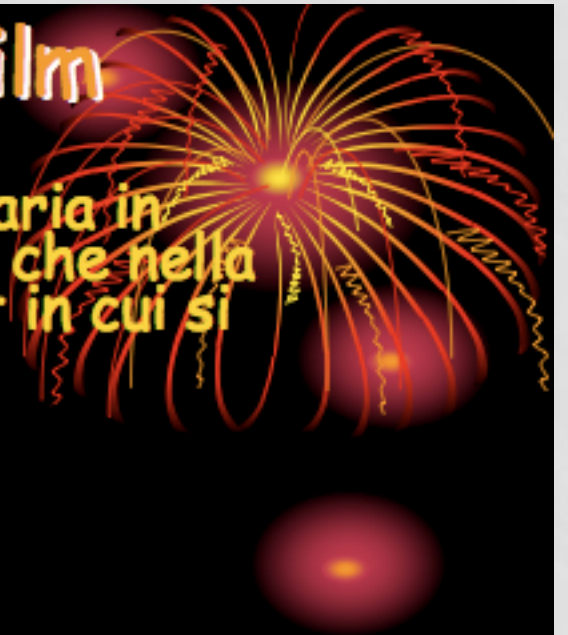
**BIOFILM** è una **COMUNITA'** Microbica costituita da microrganismi adesi ad una superficie ed immersi in una matrice organica.

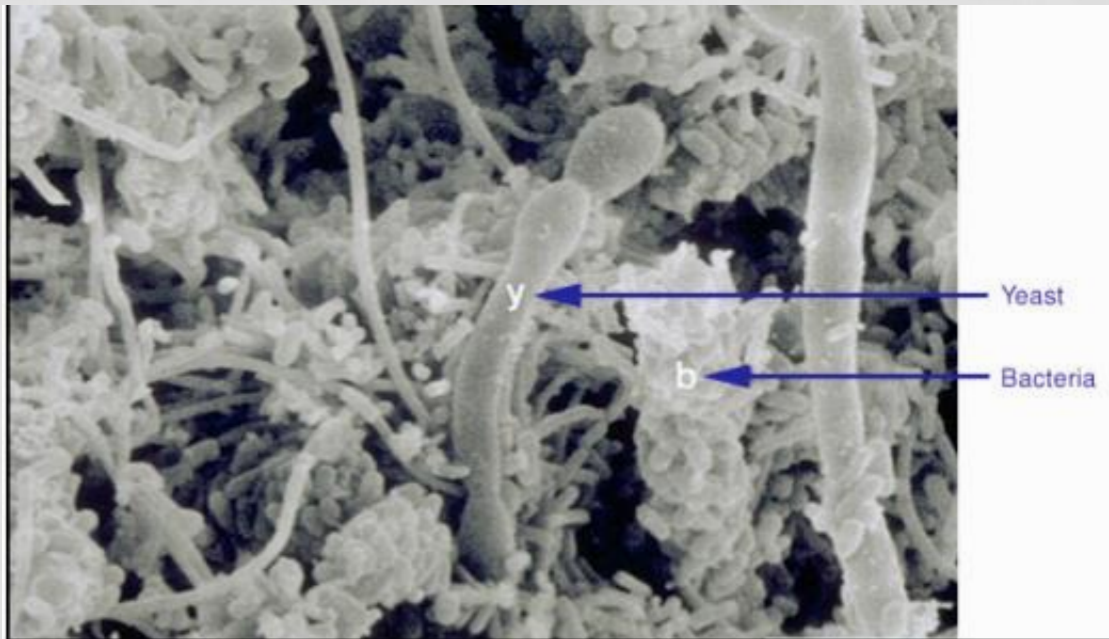
# Costituenti di un biofilm

Non si può parlare di una composizione unitaria in quanto vi è eterogeneità sia nella struttura che nella composizione chimica a seconda dell'habitat in cui si crea  
In generale..

i costituenti fondamentali sono

- i microrganismi che formano microcolonie
- le sostanze organiche definite
- EPS (Extracellular polymeric substances) nelle quali sono immersi i batteri
- l'acqua che forma canali tra le microcolonie favorendo la circolazione di nutrienti
- Materiale non-cellulare del tipo cristalli minerali, particelle o elementi del sangue. Il materiale non-cellulare cambierà in funzione dell'ambiente dove il biofilm si sviluppa.





**Il Biofilm può svilupparsi su differenti superfici quali tessuti viventi, strumenti usati in medicina, sistemi naturali acquatici, sistemi industriali o condotte di acqua (come sopra), eccetera.**

**In generale quando il biofilm si sviluppa in ambienti naturali la sua composizione è complessa includendo differenti microrganismi diatomee, funghi o altro**



# Biofilms Impact . . .



Teeth



Drinking Water



Oil Industry

Cooling Water



Food Processing

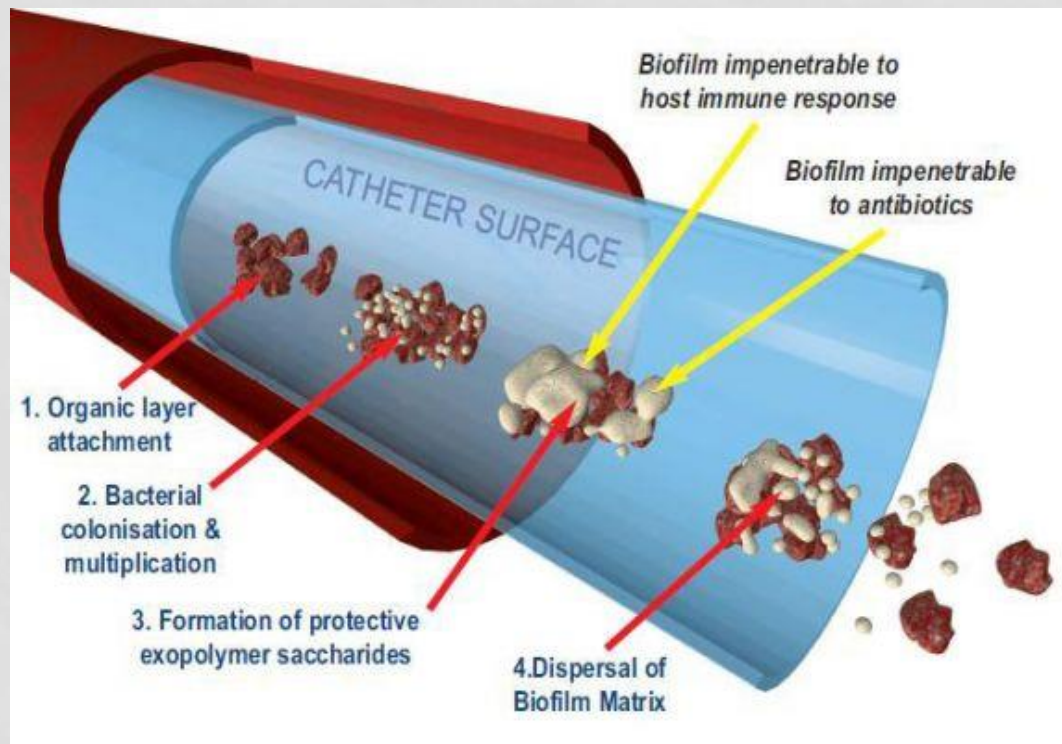
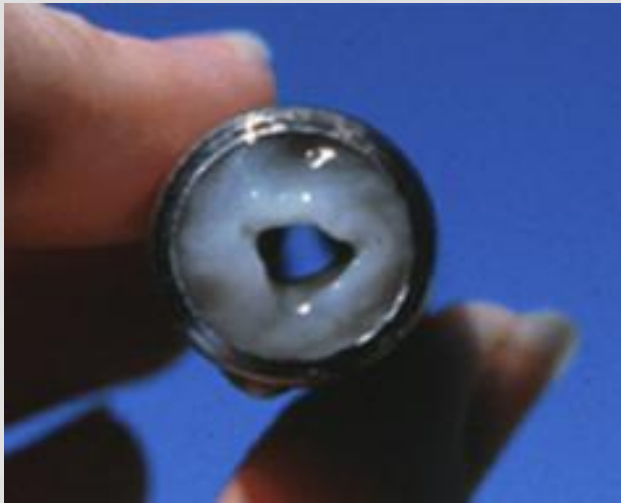
Ship Hulls



Paper Manufacturing



Medical Implants





### **Domestic biofouling:**

Toilet rinsing water reservoir, red and dark brown colour: bacterial and fungal biofilms in calciferous incrustations

Potential problem: dispersion of aerosols when flushing

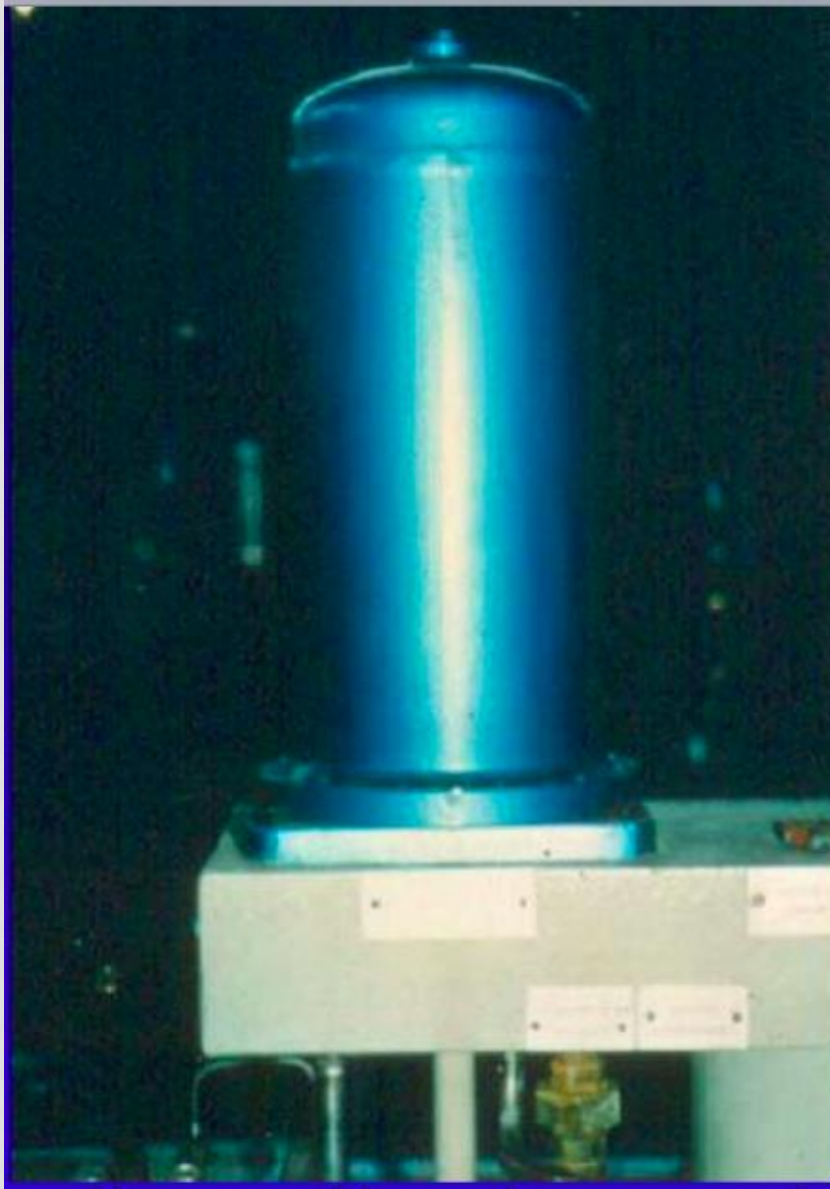






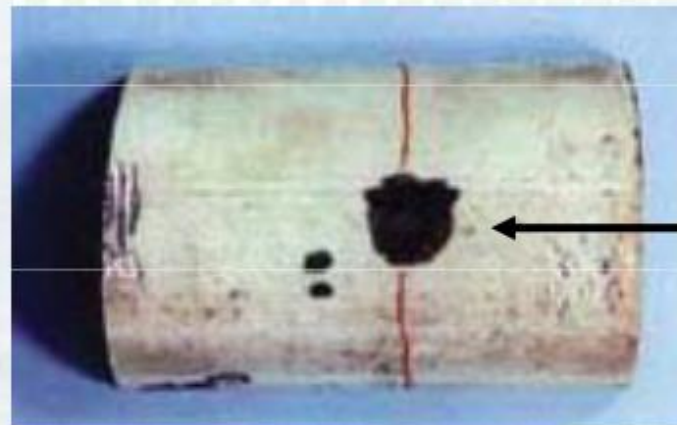
**Inner tubes of showers:  
massive biofilm growth,  
habitat for hygienically  
relevant organisms which  
can be distributed as  
aerosols**



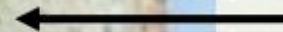


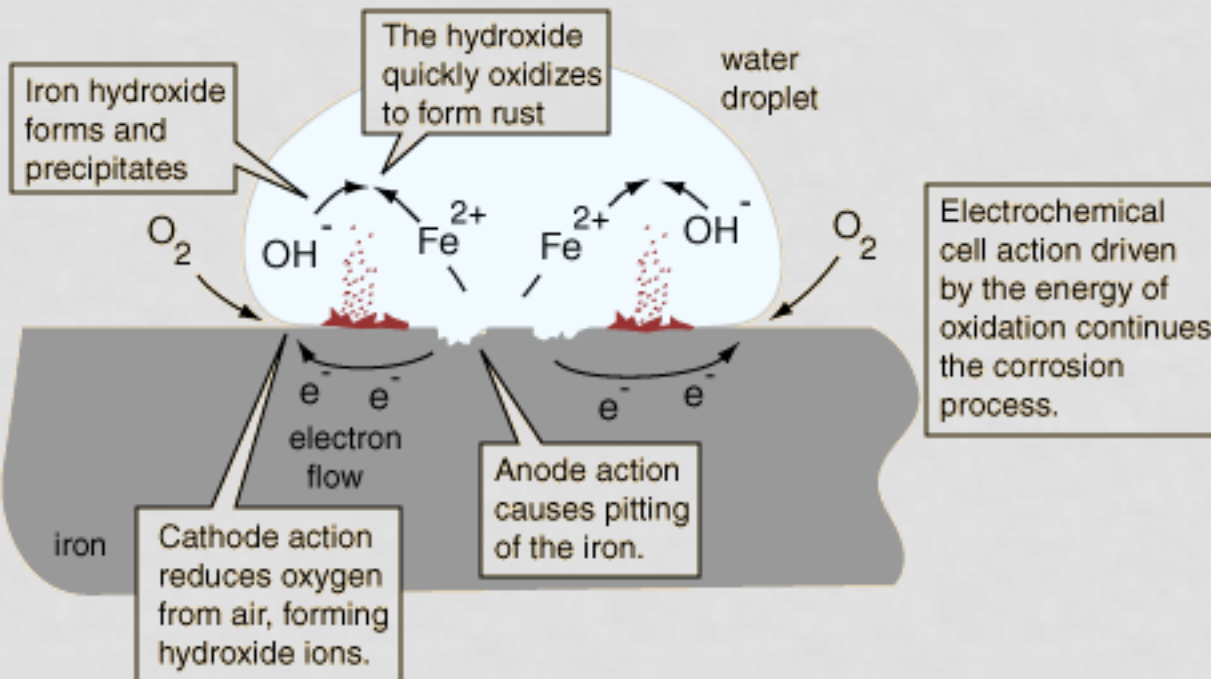
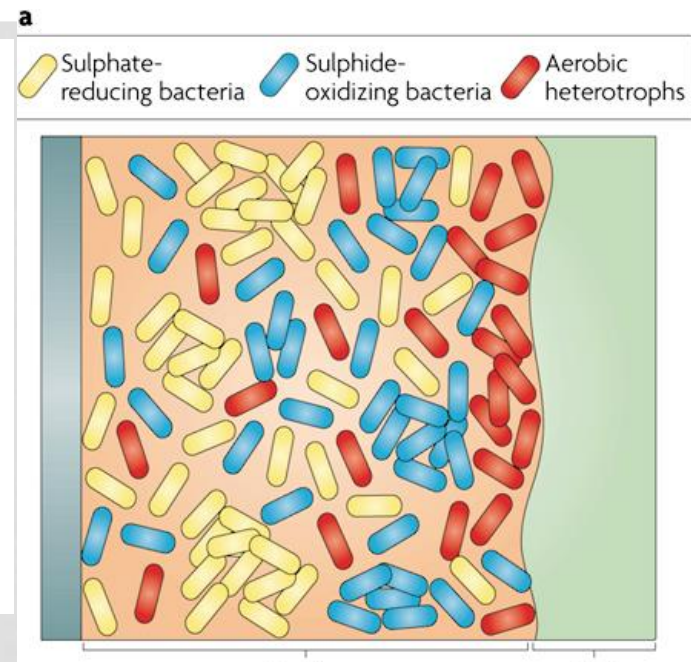
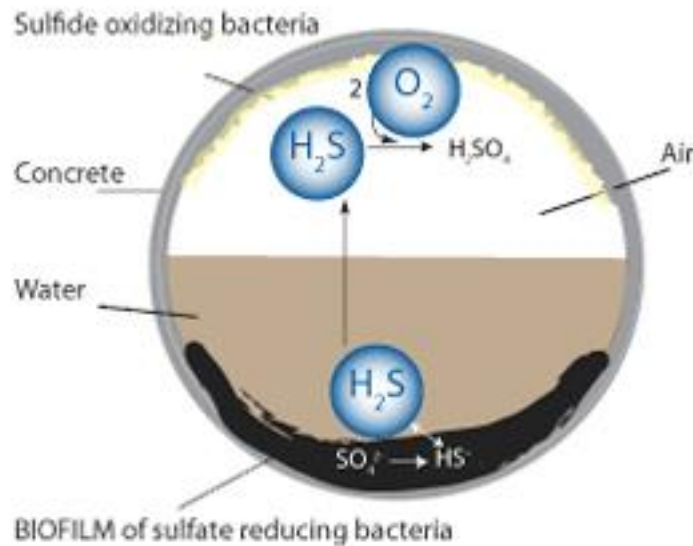


# From a oil refinery in Dubai



Pitting  
corrosion





I biofilm che si sviluppano generalmente all'interfaccia fra liquidi e metalli sono determinati da batteri ferro riduttori e zolfo riduttori ed il processo di biocorrosione viene mediato da enzimi quali ossidoriduttasi ed idrolasi.



# Sites of **Primary** and **Secondary** Biofilm Infection

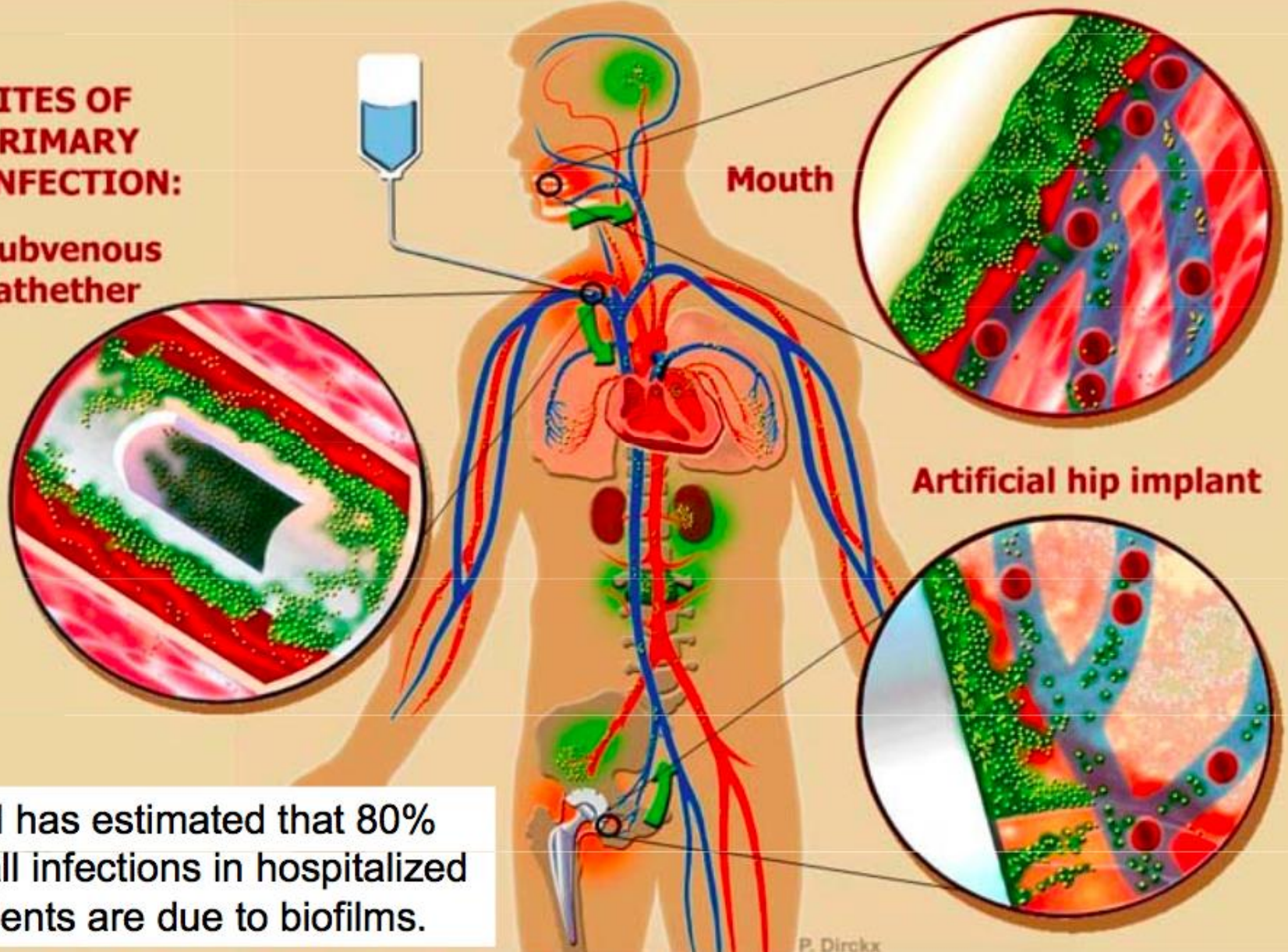
## SITES OF PRIMARY INFECTION:

Subvenous  
cathether

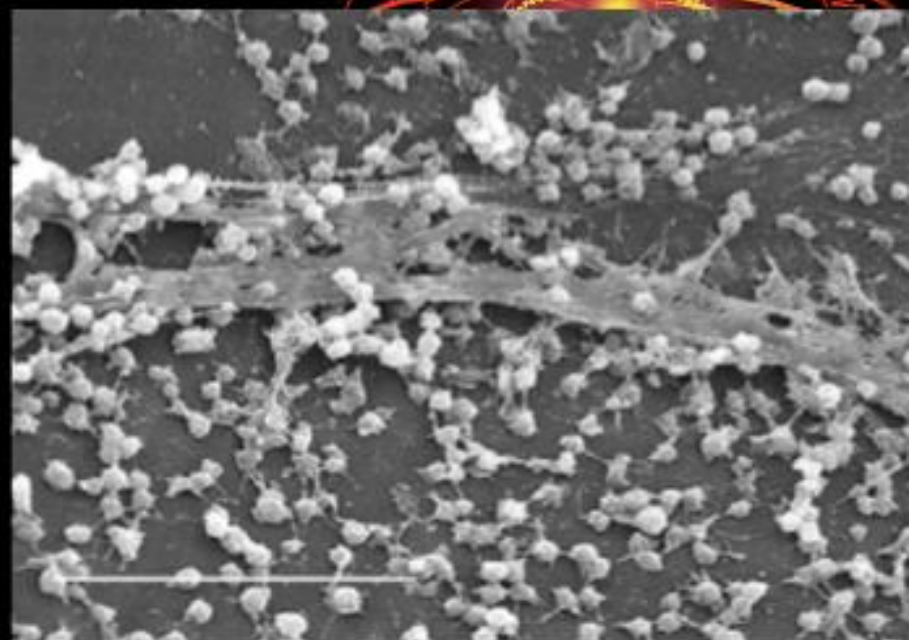
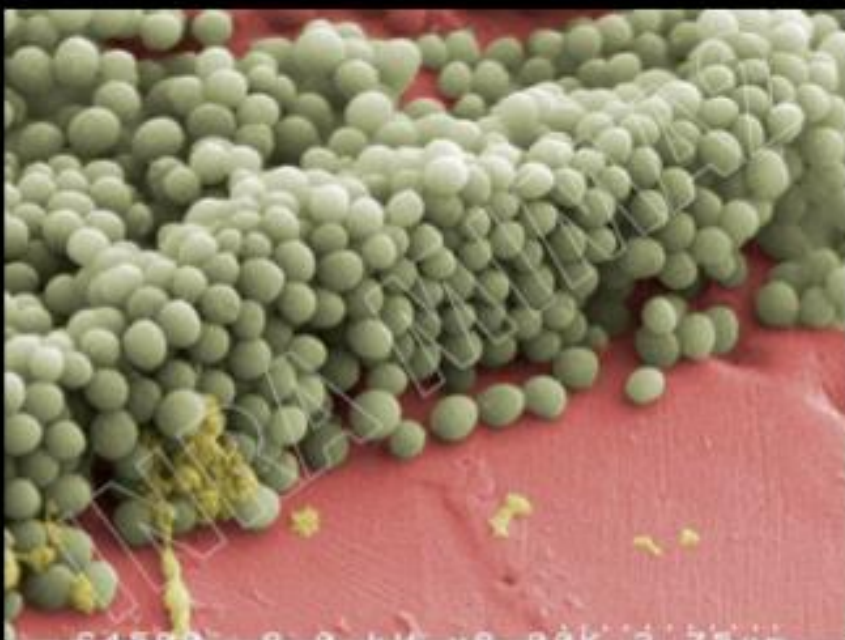
Mouth

Artificial hip implant

NIH has estimated that 80% of all infections in hospitalized patients are due to biofilms.

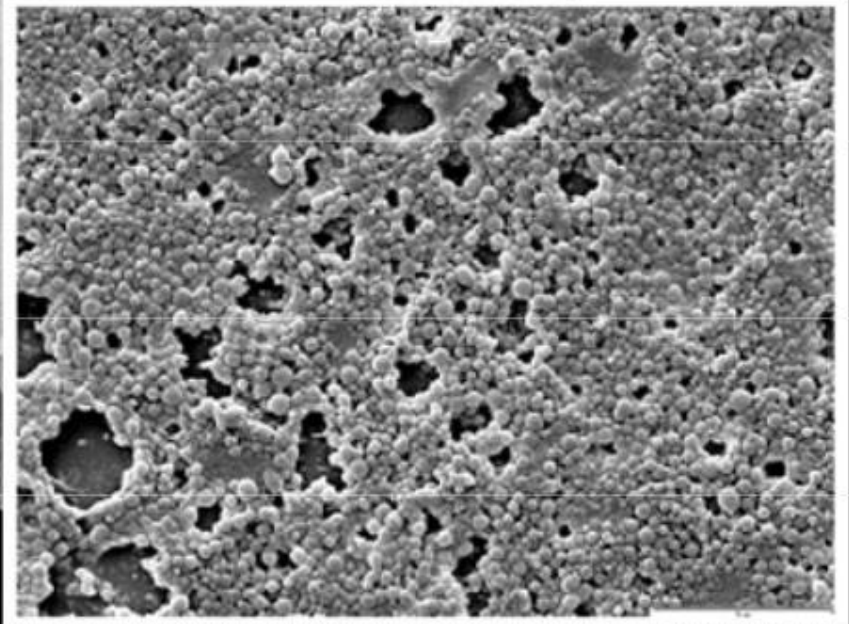
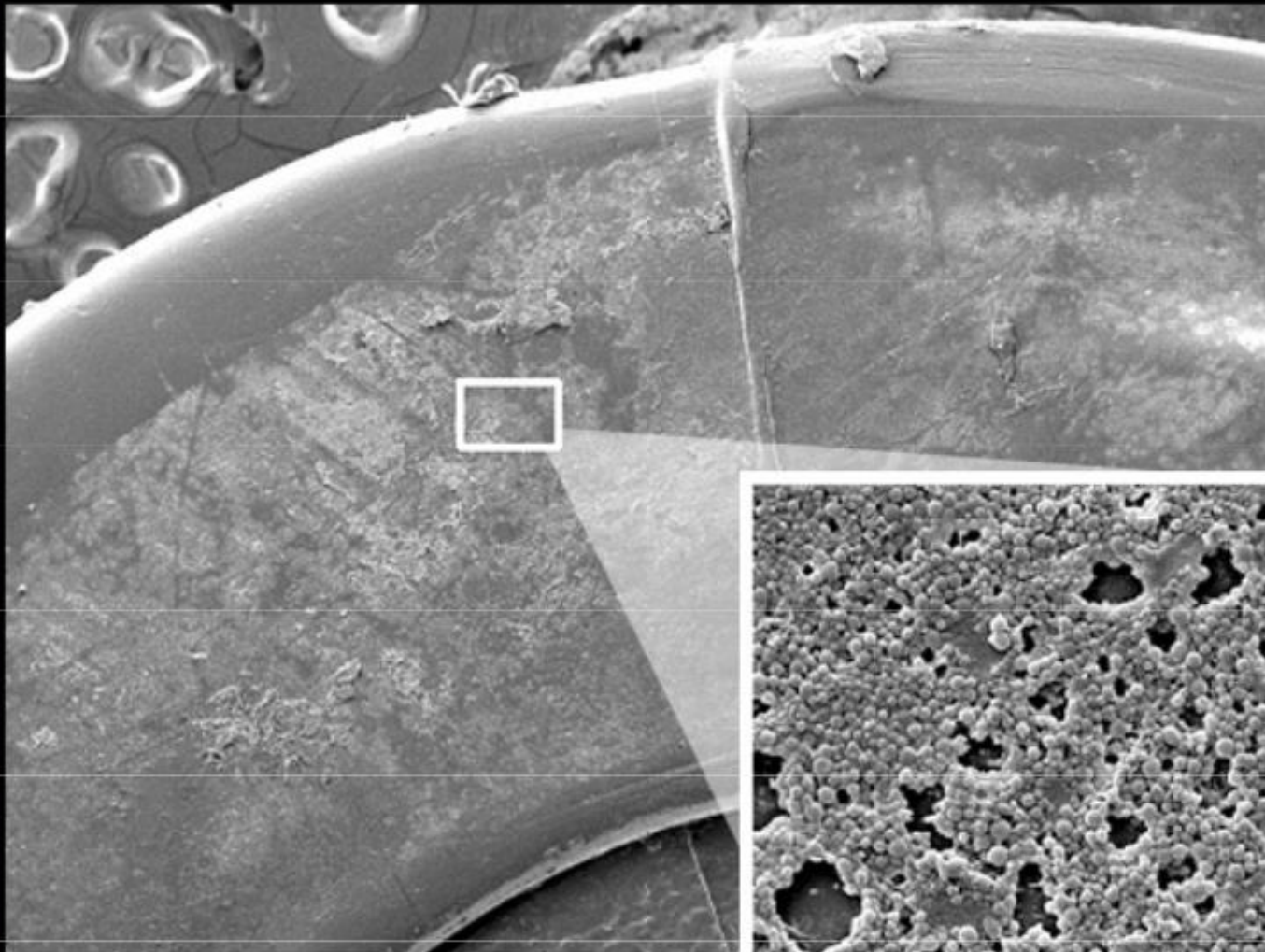






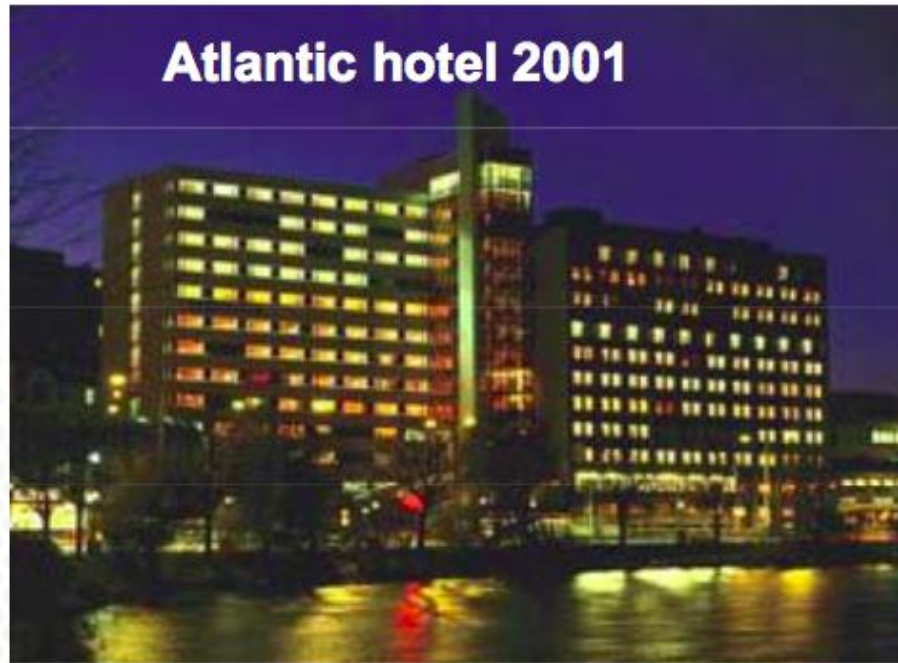
- Al contrario quando il biofilm si sviluppa su materiale medico appare in generale composto da un'unica specie associata con una matrice extracellulare

## Catheter related bloodstream infections



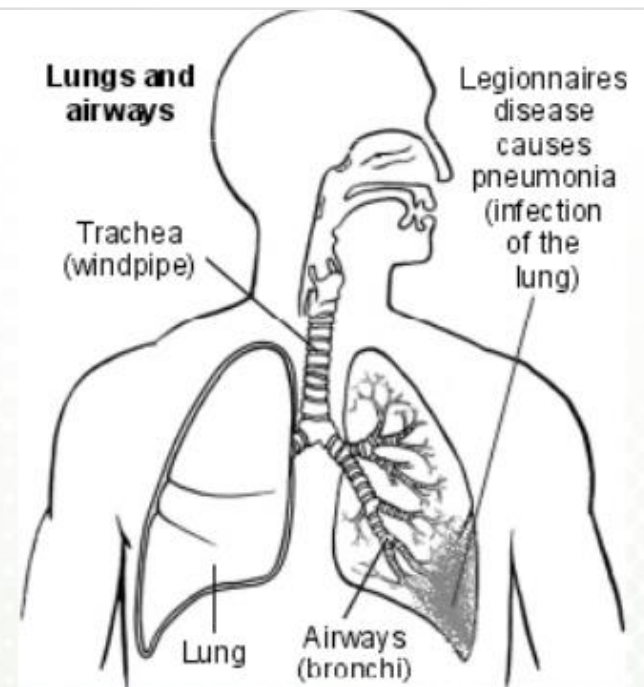


# Legionnaires' disease



- 27 infected by *Legionella pneumophila*
- 7 died

**Disease spreads through aerosols generated by cooling towers, showers, fountains etc. that harbors biofilm containing *Legionella***





# Walkerton Tragedy

---

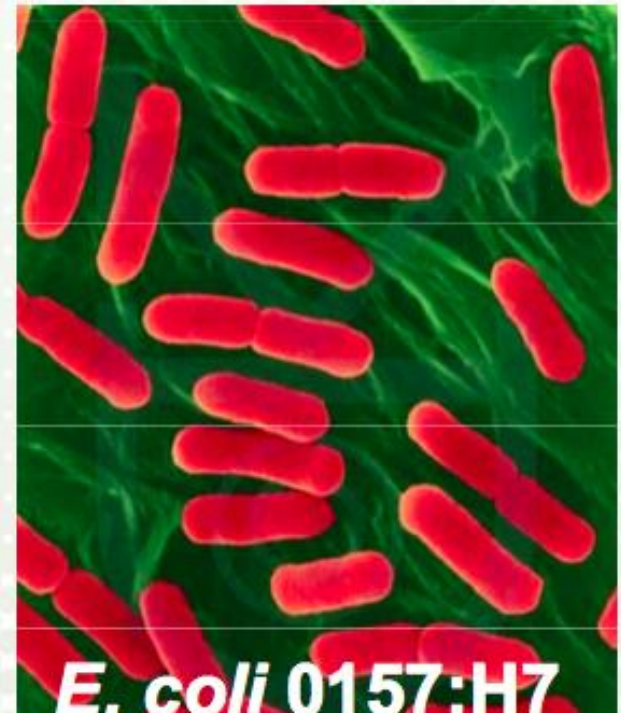


## Walkerton, Ontario - 2000

Population: 5000

Sick: 2500

Dead: 7



*E. coli* 0157:H7



Source water

Treatment

Filtration & disinfection



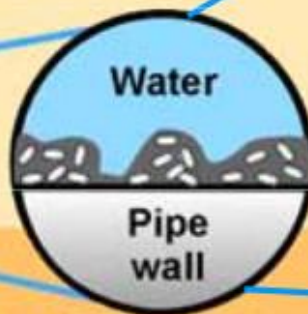
Storage



Distribution system



Distribution system pipe



Biofilm on pipe

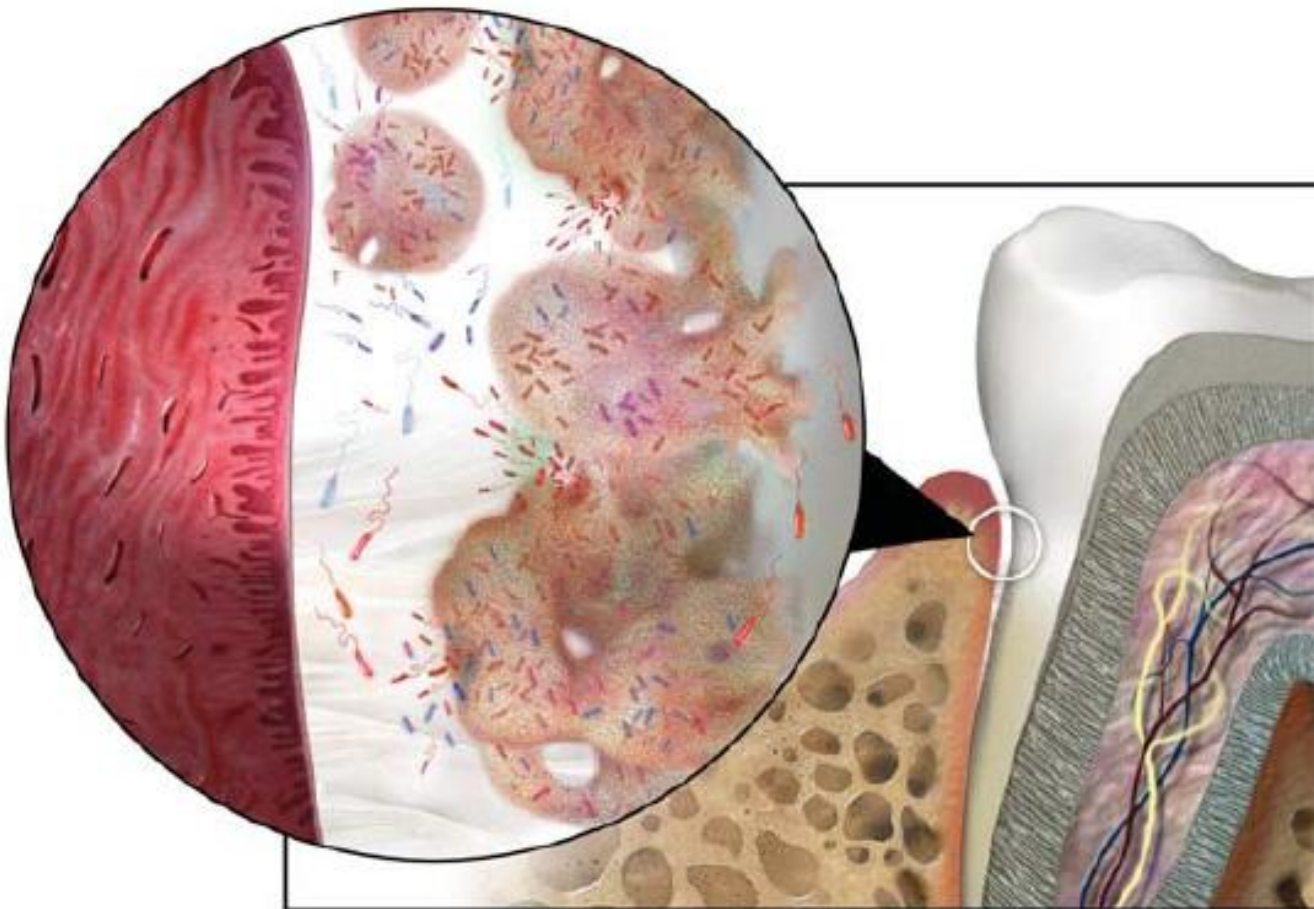


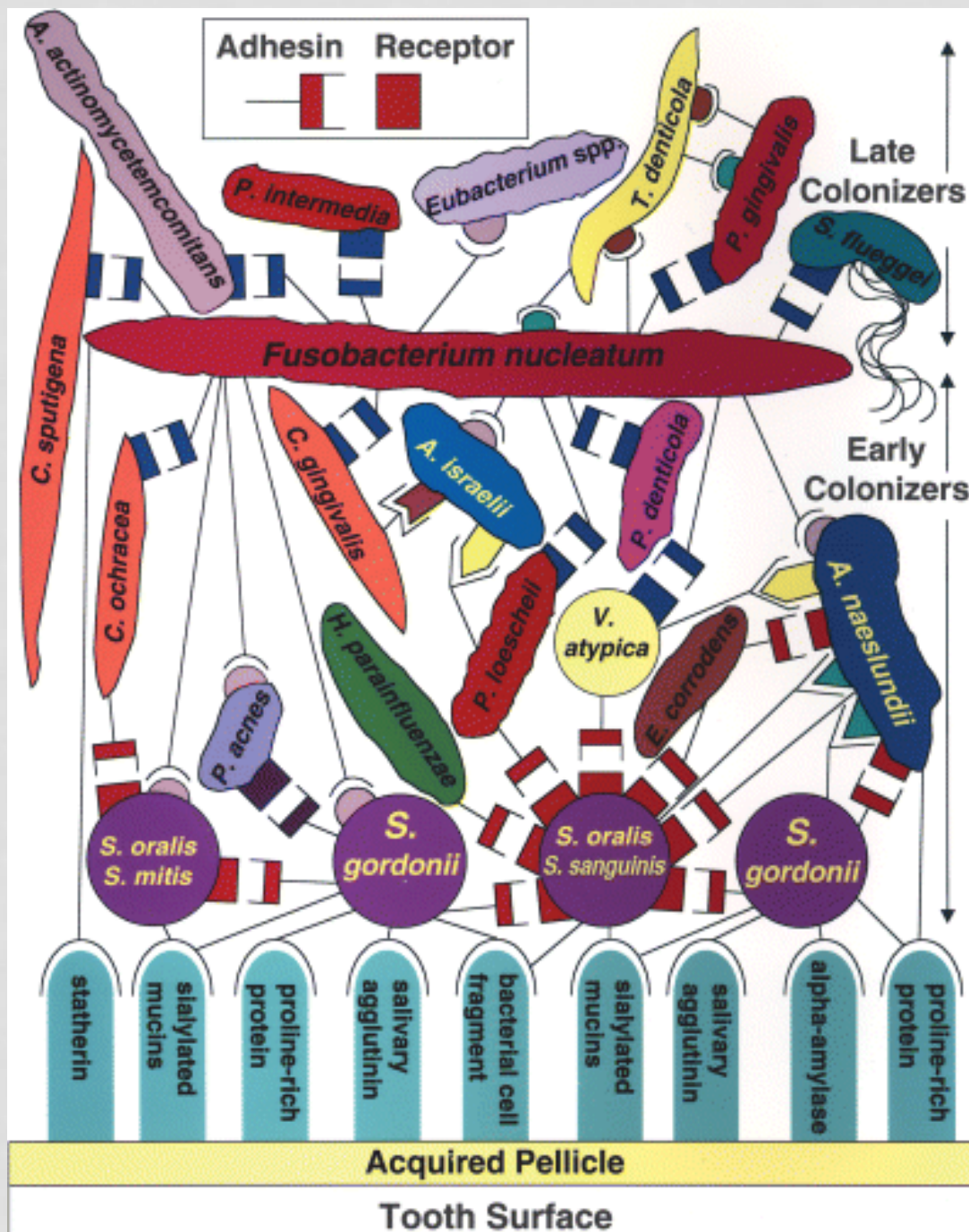


# Un caso particolare..la placca dentaria



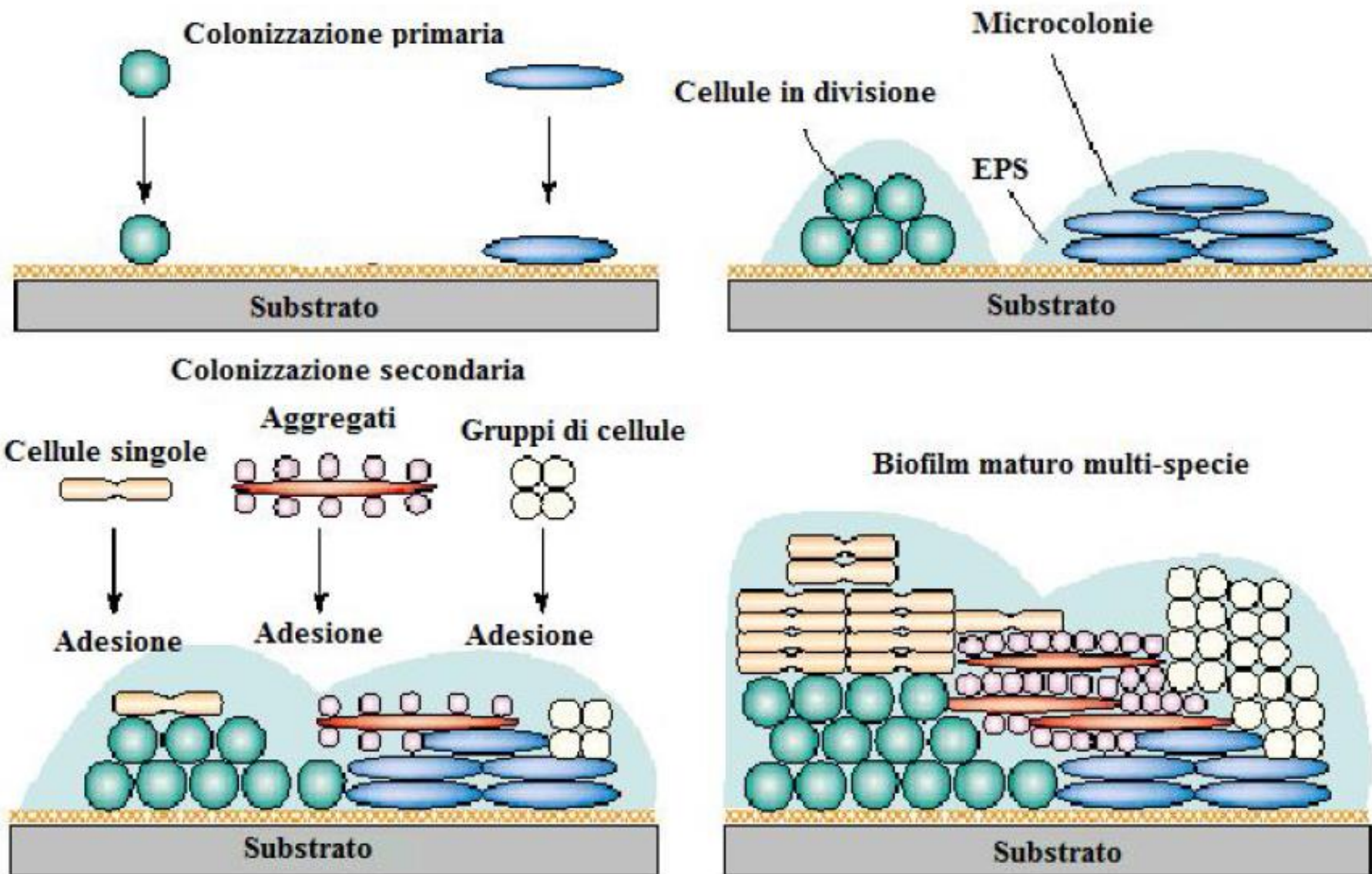






*Streptococcus oralis* produce una glicosiltransferasi che trasforma il saccarosio in polisaccaridi-PNAG- (poli N-acetil-glucosamina) che agiscono come adesine per altri batteri e contribuisce ai processi di adesione di *Streptococcus* alla superficie del dente

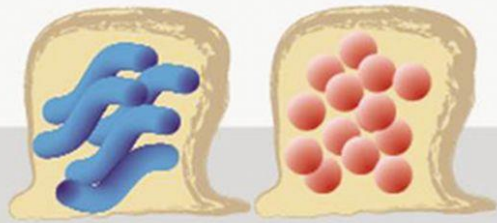




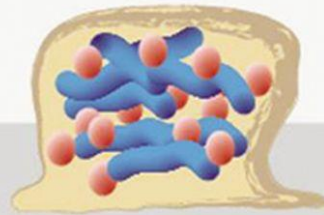
**Figura 2:** Esempio di evoluzione di *biofilm* su substrato inerte



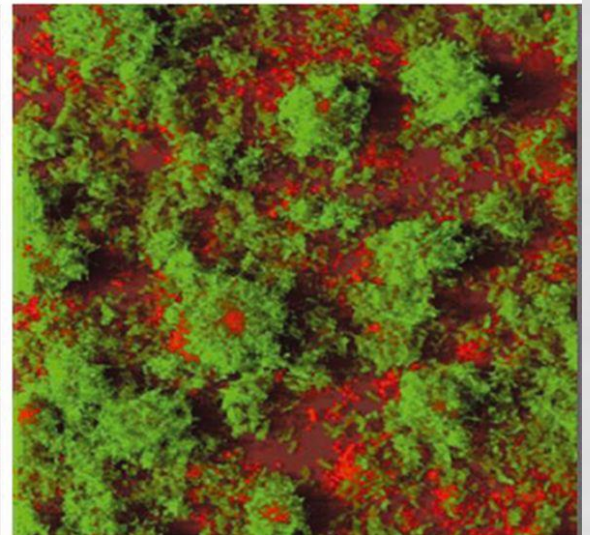
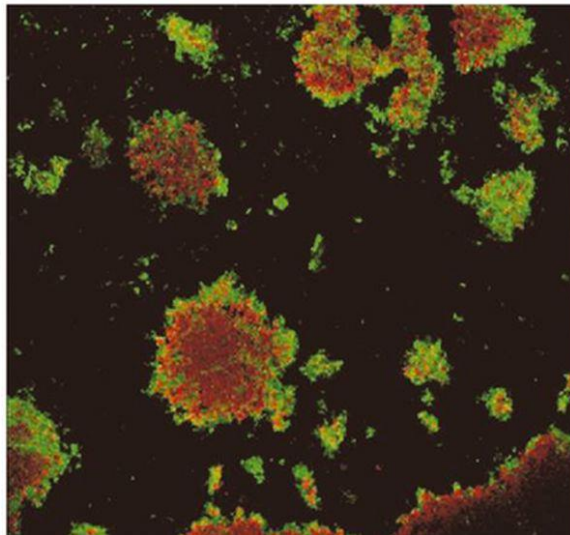
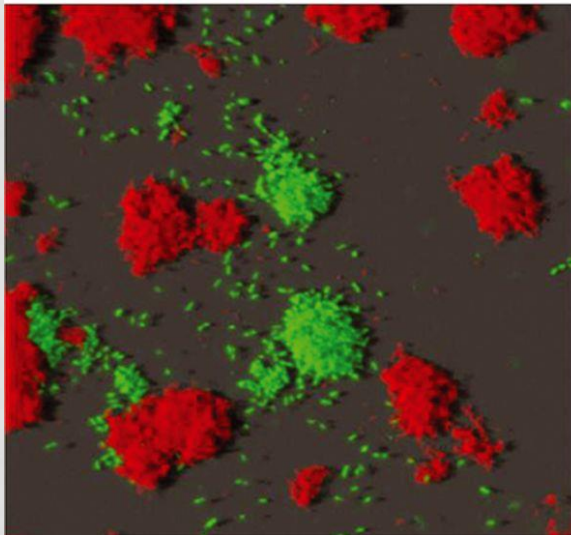
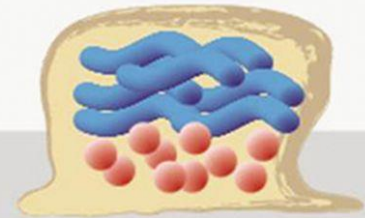
**(a) Separate microcolonies**

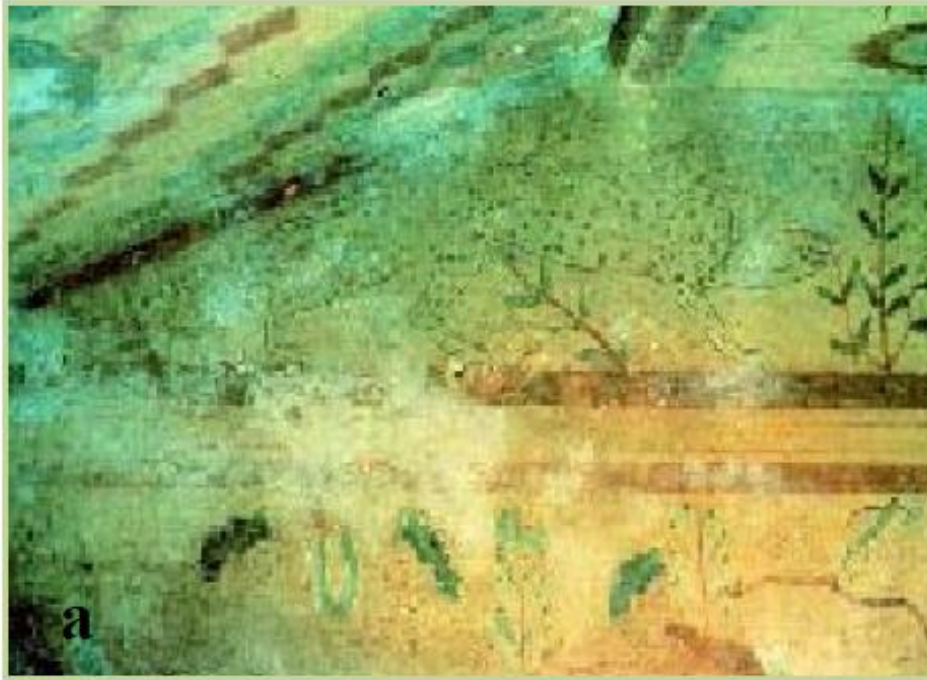


**(b) Coaggregation**



**(c) Layering**

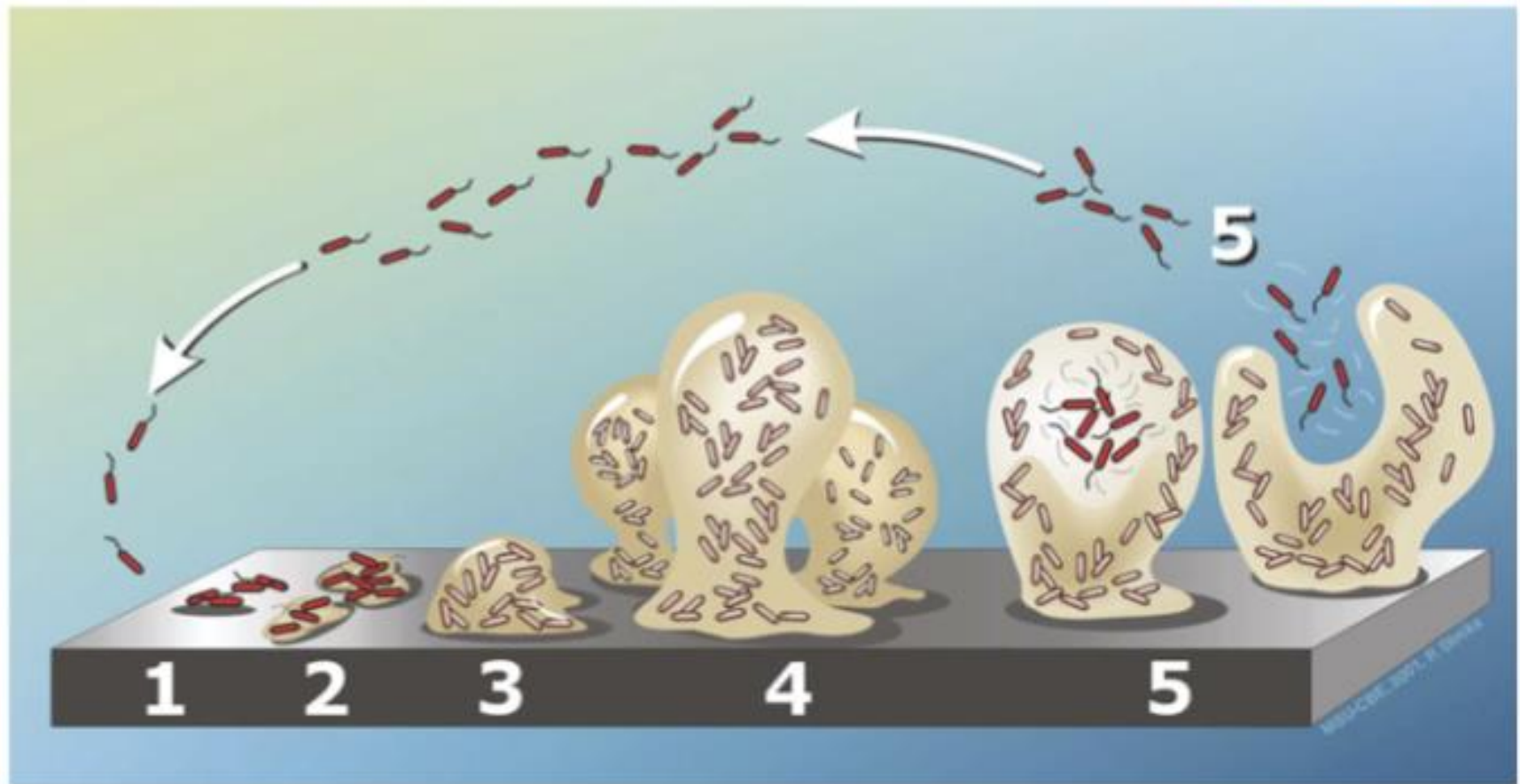




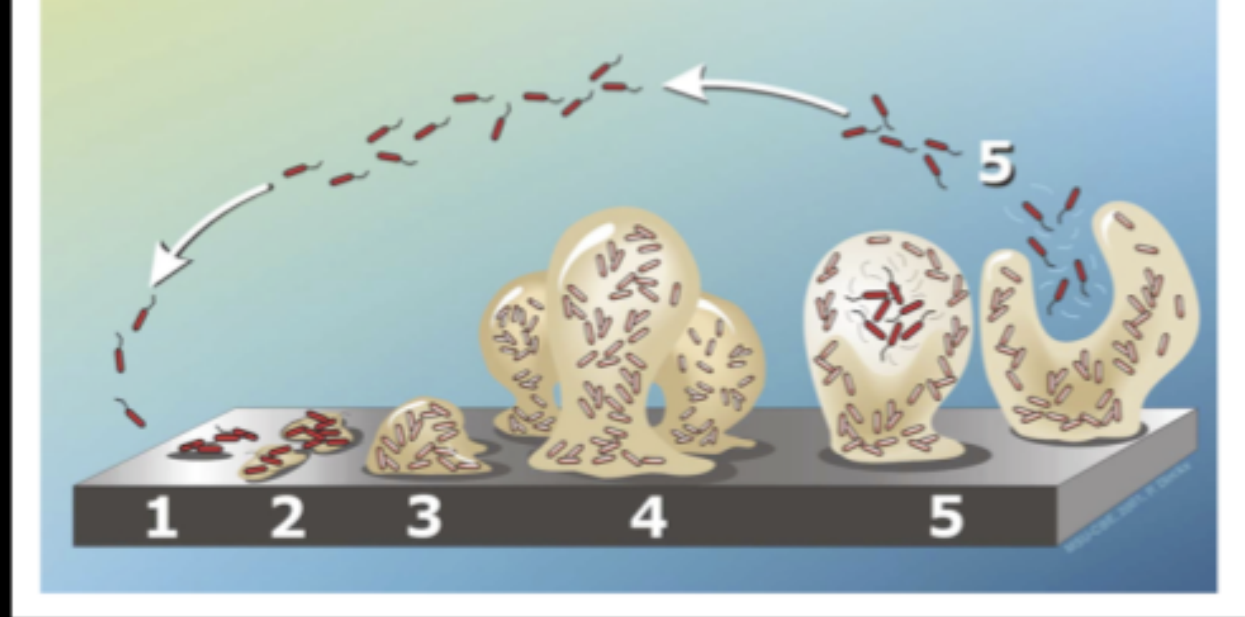
Di solito la formazione dei biofilm su superfici lapidee inizia con batteri e microrganismi fototrofi (es cianobatteri ) che utilizzano la  $\text{CO}_2$  atmosferica come fonte di carbonio e la luce solare come fonte di energia. Successivamente i microrganismi eterotrofi sfruttano i metaboliti dei microrganismi fototrofi come risorsa di carbonio organico per la loro crescita.



# FASE NELLO SVILUPPO DEL BIOFILM



1. Un iniziale reversibile adesione dei batteri planctonici a superfici "condizionate" sia attraverso il flusso dei fluidi o mediante meccanismo di motilità dei batteri. In questa fase l'adesione deve superare le forze repulsive fra la superficie e cellule batteriche.



2. Transizione fra adesione reversibile ad adesione irreversibile accompagnata dalla produzione di matrici polimeriche e dalla presenza di appendici sulla superficie del batterio.

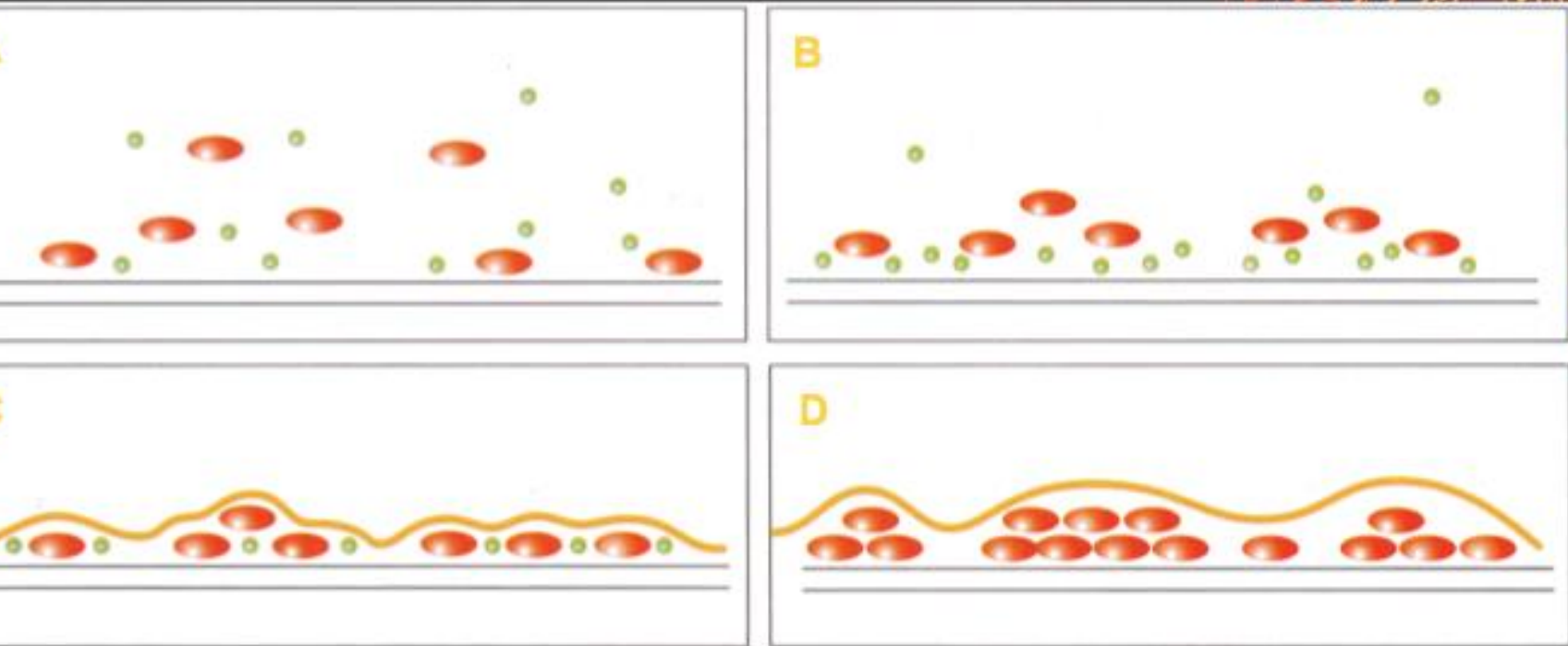
3. Iniziale sviluppo dell'architettura del biofilm.

4. Sviluppo delle microcolonie. In questa fase la matrice polisaccaridica serve da collante fra le cellule e funziona anche da "carta moschicida" per le sostanze nutrienti dell'ambiente. In questa fase si stabilisce l'architettura del biofilm. Data la specificità dell'ambiente i microrganismi sviluppano funzioni e adattano i loro pathways metabolici a questo specifico ambiente.

5. Dispersione dei batteri nell'ambiente e ritorno alle condizioni planctoniche



# Le prime fasi...



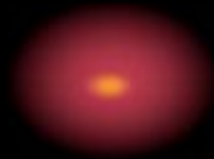
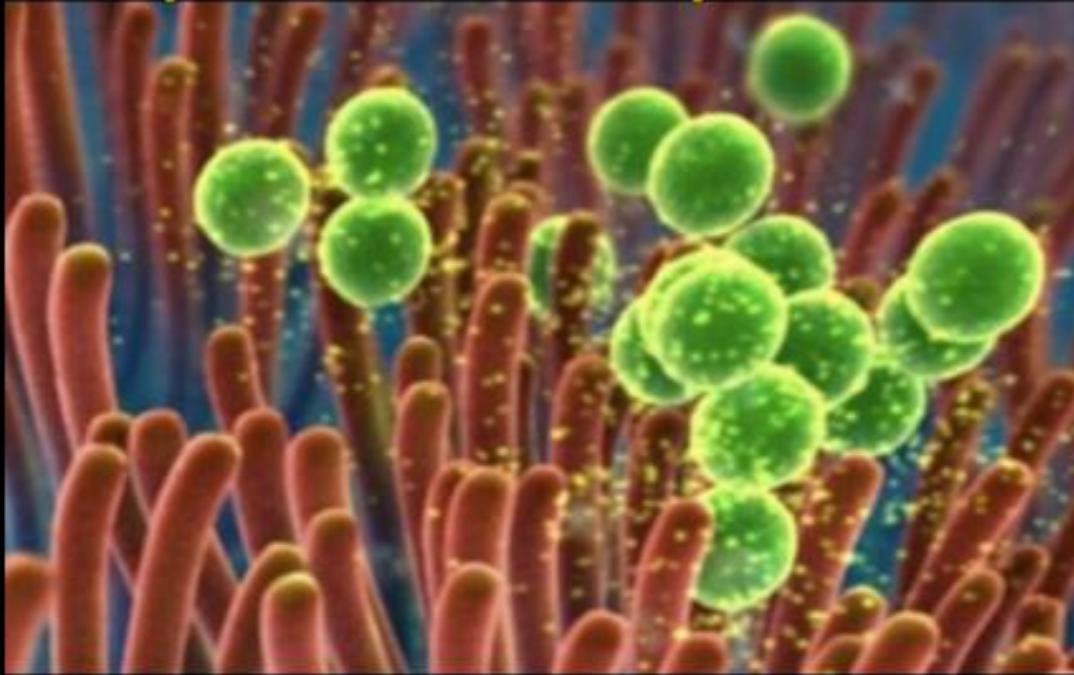
**A -** Cellule batteriche (in rosso) e materiale particolato (in verde) in sospensione sopra la superficie che verrà colonizzata

**B -** Accumulo sulla superficie

**C -** Biofilm iniziale

**D -** Col procedere della crescita cellulare il biofilm si ispessisce

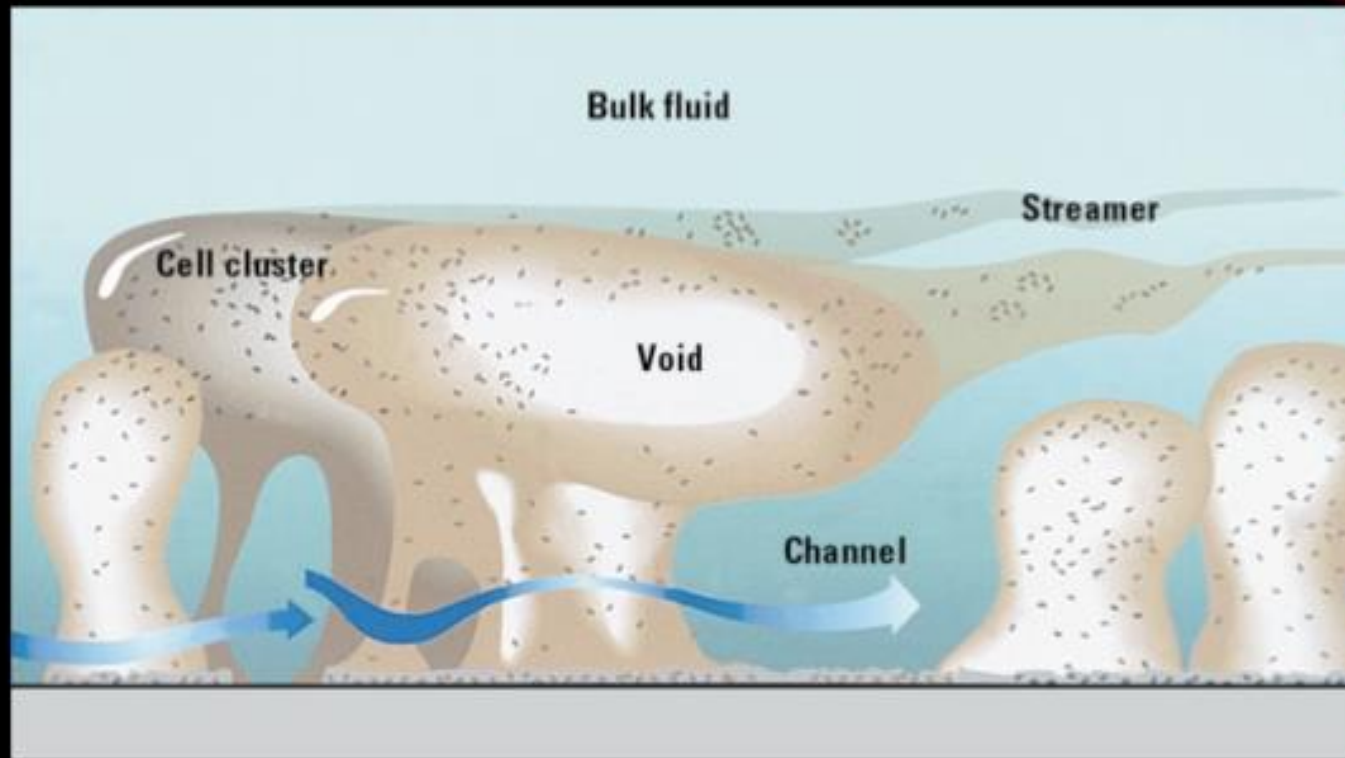
# L'importanza delle particelle...



- Nel corso delle infezioni eritrociti e fibrina vengono intrappolati dal biofilm.
- Sulle valvole cardiache la presenza della fibrina protegge il biofilm dall'attacco dei leucociti.
- Sui cateteri la formazione del biofilm da microrganismi in grado di produrre ureasi porta all'aumento del pH con conseguente precipitazione di minerali quali il fosfato di calcio (idrossiapatite) che vengono intrappolati dal biofilm. Questo può portare alla ostruzione dei cateteri.
- Problemi analoghi possono avvenire nei biofilm delle condotte d'acqua.

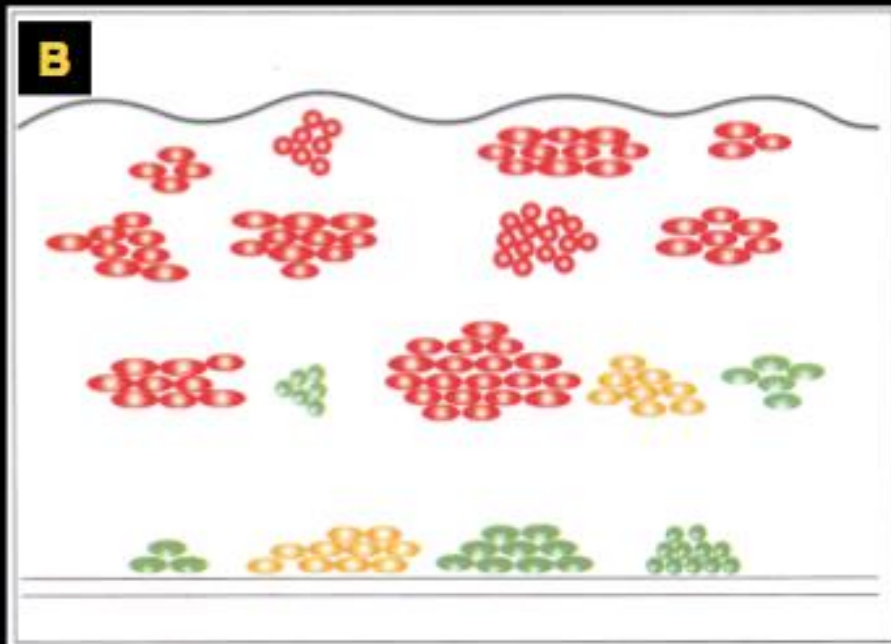
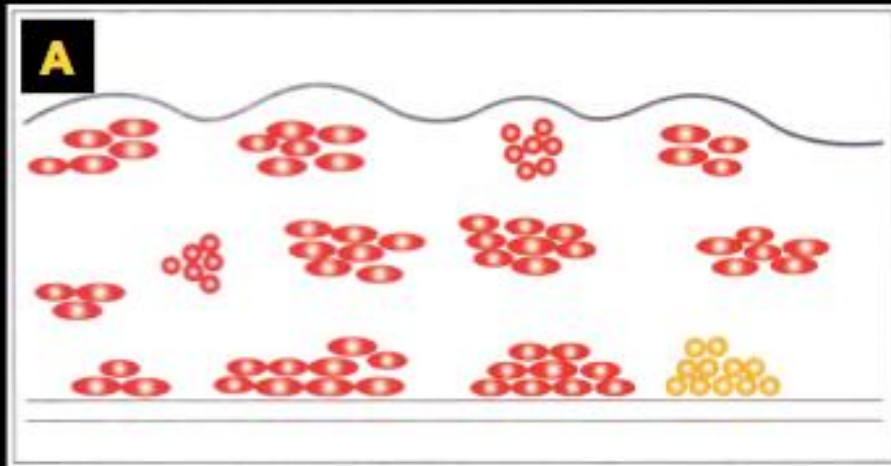


# L'architettura del biofilm



- L'architettura del biofilm è eterogenea e dipende dalla natura della/e comunità microbiche.
- L'architettura dipende anche dalle condizioni ambientali.
- Può essere monostrato o pluristratificato.
- Il flusso dell'acqua nei canali permette la diffusione dei nutrienti.
- Esiste anche il fenomeno della migrazione di microrganismi da una microcolonia all'altra.

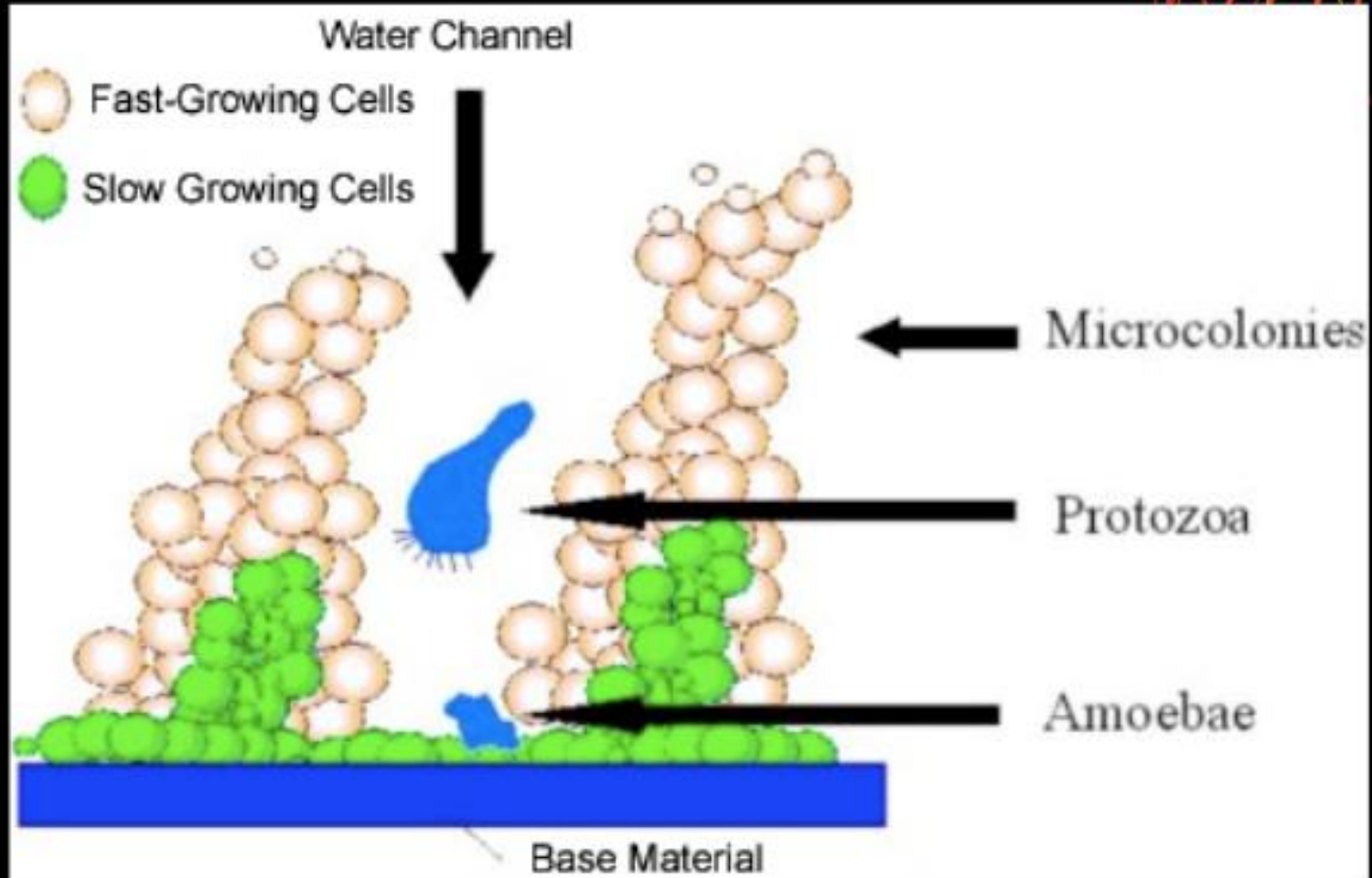
# Crescita di un biofilm



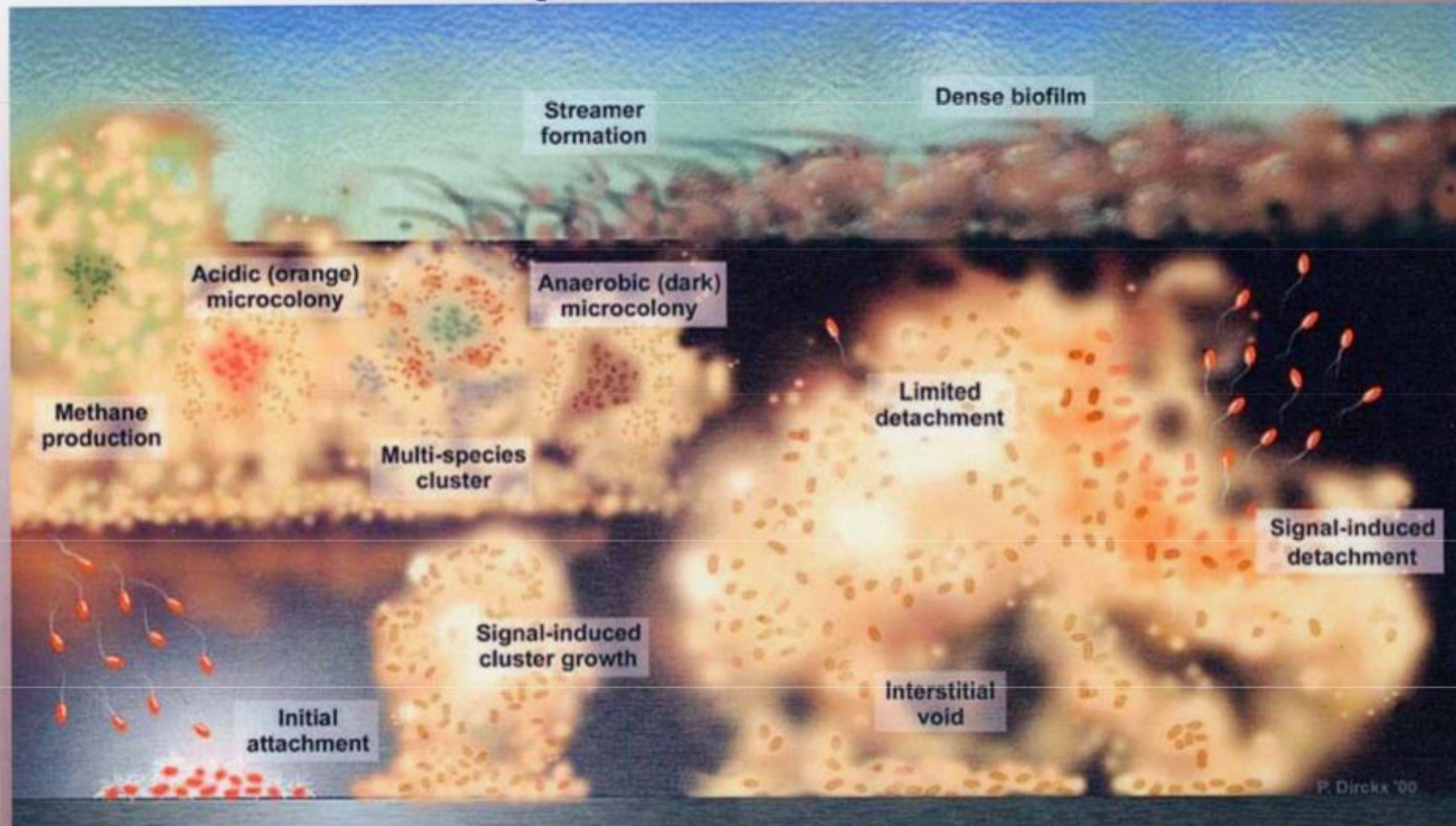
- A - In un biofilm neoformato alcune colonie batteriche diventano quiescenti (in giallo)
- B - Con l'aumentare dello spessore del biofilm alcune colonie muoiono (in verde)



## L'organizzazione...

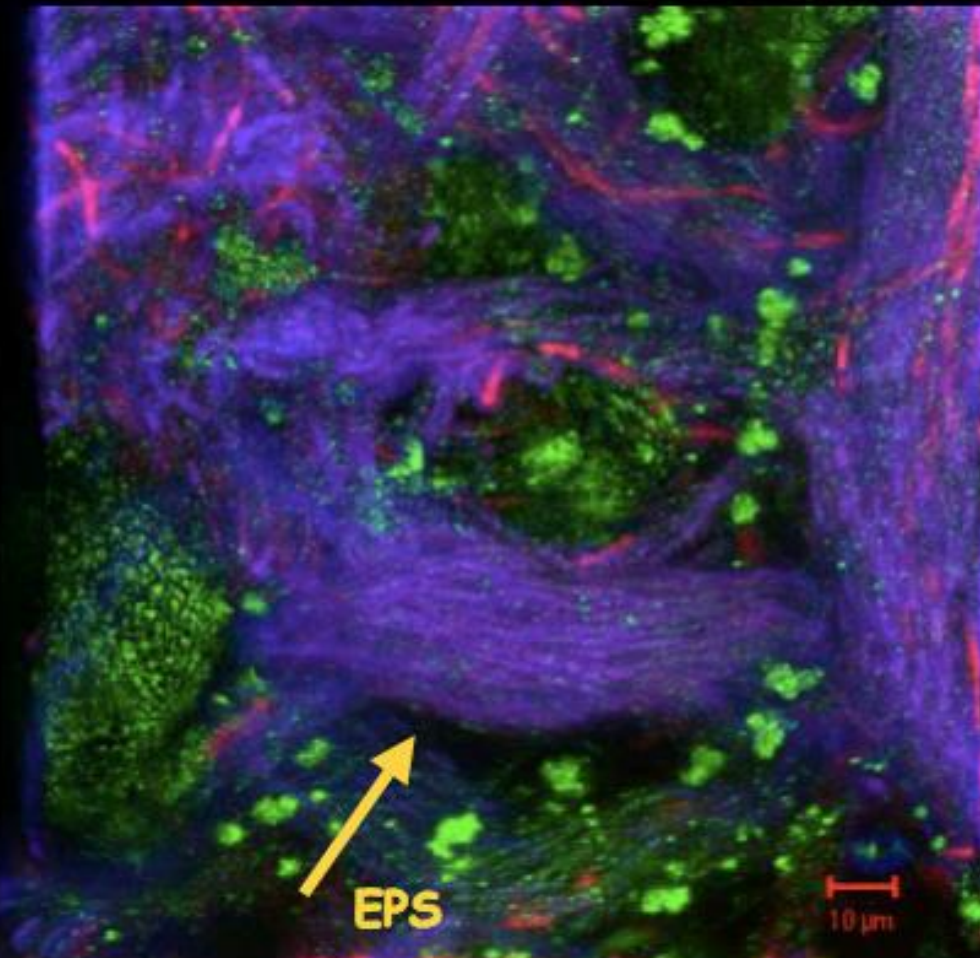


# Biofilms are complex multicellular communities





# La matrice esopolisaccaridica



Circa il 50/90% del Carbonio presente nel biofilm è fornito dall'EPS.

La natura dell'EPS è variabile, in funzione delle specie.

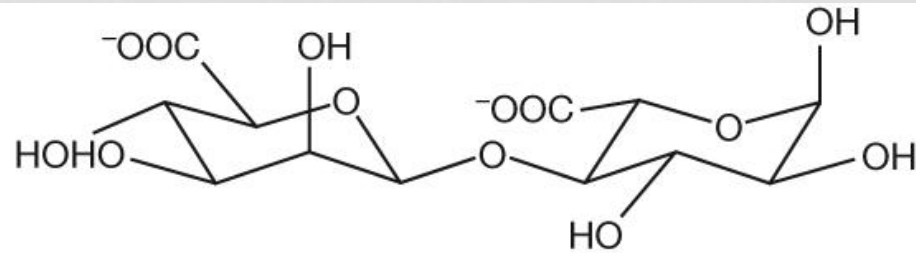
Nei Gram-<sup>+</sup> la presenza di acidi uronici (D-glucuronico eccetera..) e di altre sostanze conferisce proprietà anioniche all'EPS che promuove l'associazione con cationi bivalenti.

L'EPS è altamente idratato e questo gli conferisce notevoli proprietà quali la resistenza all'essiccamento.

La produzione e l'associazione dell'EPS con varie molecole è funzione della crescita batterica e delle condizioni nutrizionali.

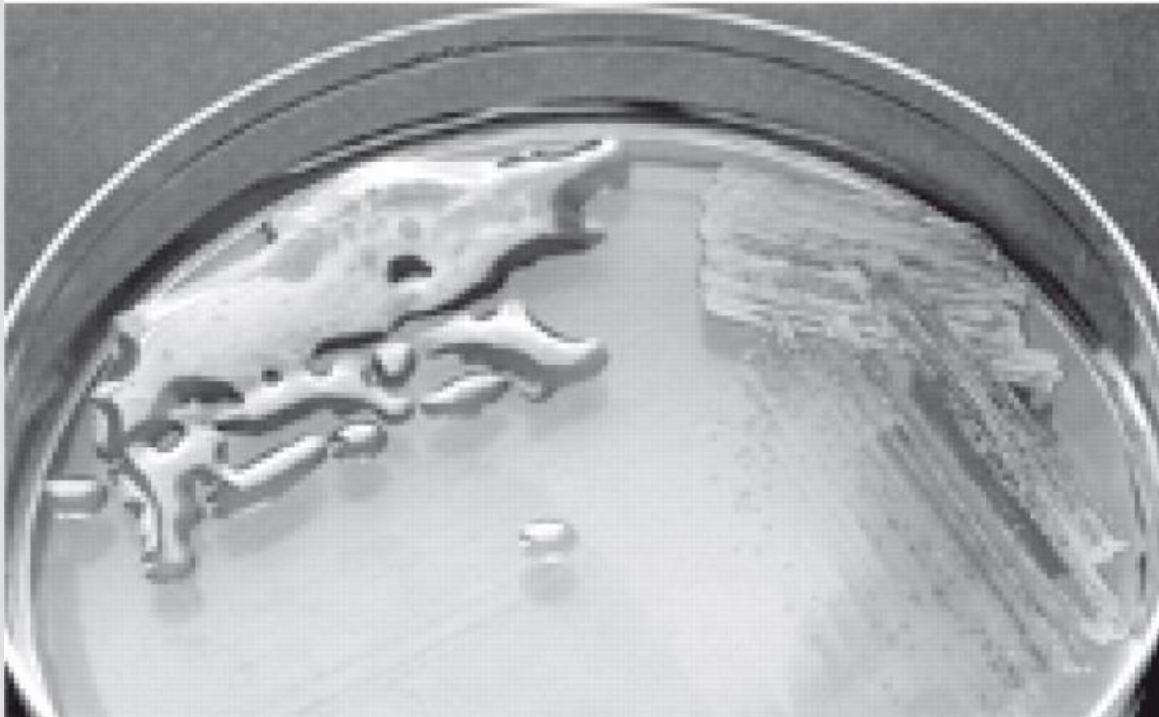
L'EPS può legarsi ad alcune sostanze antimicrobiche prevenendone la diffusione nel biofilm e proteggendo i microrganismi.

a)



**Acido  $\beta$ -D-mannuronico- $\alpha$ -L-guluronico**  
(precursore del polisaccaride alginato)

b)



L'EPS può essere costituito da omopolisaccaridi, come la cellulosa o il 1,4,beta-glucano o eteropolisaccaridi come l'acido colanico prodotto da *E.coli*, costituito da glucosio, fucosio e D-glucuronide.

La sintesi di quest'ultimo è alternativa alla repressione dei geni flagellari.

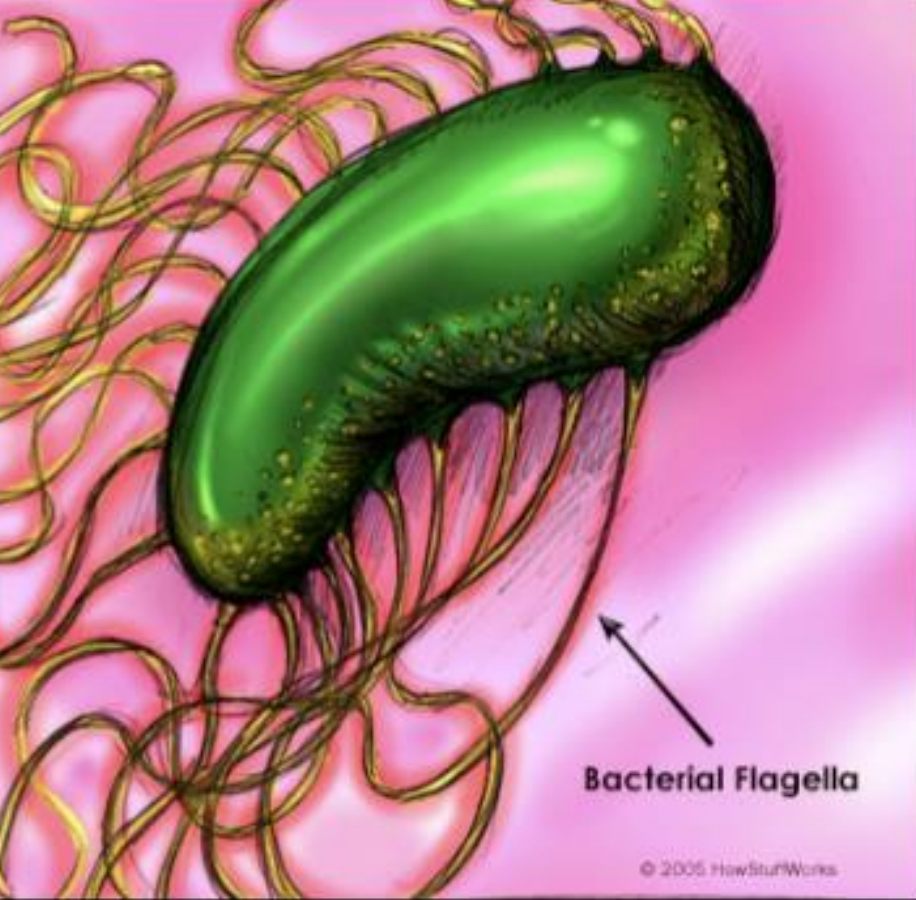




Strato di cellulosa ottenuto dalla sintesi  
di *Gluconacetobacter xylinus*







- Il ruolo dei flagelli e del movimento è stato approfondito mediante lo studio di mutanti di *E.coli*.
- Si è giunti alla conclusione che la motilità , ma non la chemiotassi ha un ruolo importante nello sviluppo del biofilm

I flagelli possono quindi avere un ruolo sia nelle prime fasi di adesione sia nella fase finale di dispersione.

Tuttavia, in assenza di flagelli altre strutture quali fimbrie o pili possono mediare le prime fasi dello sviluppo del biofilm.

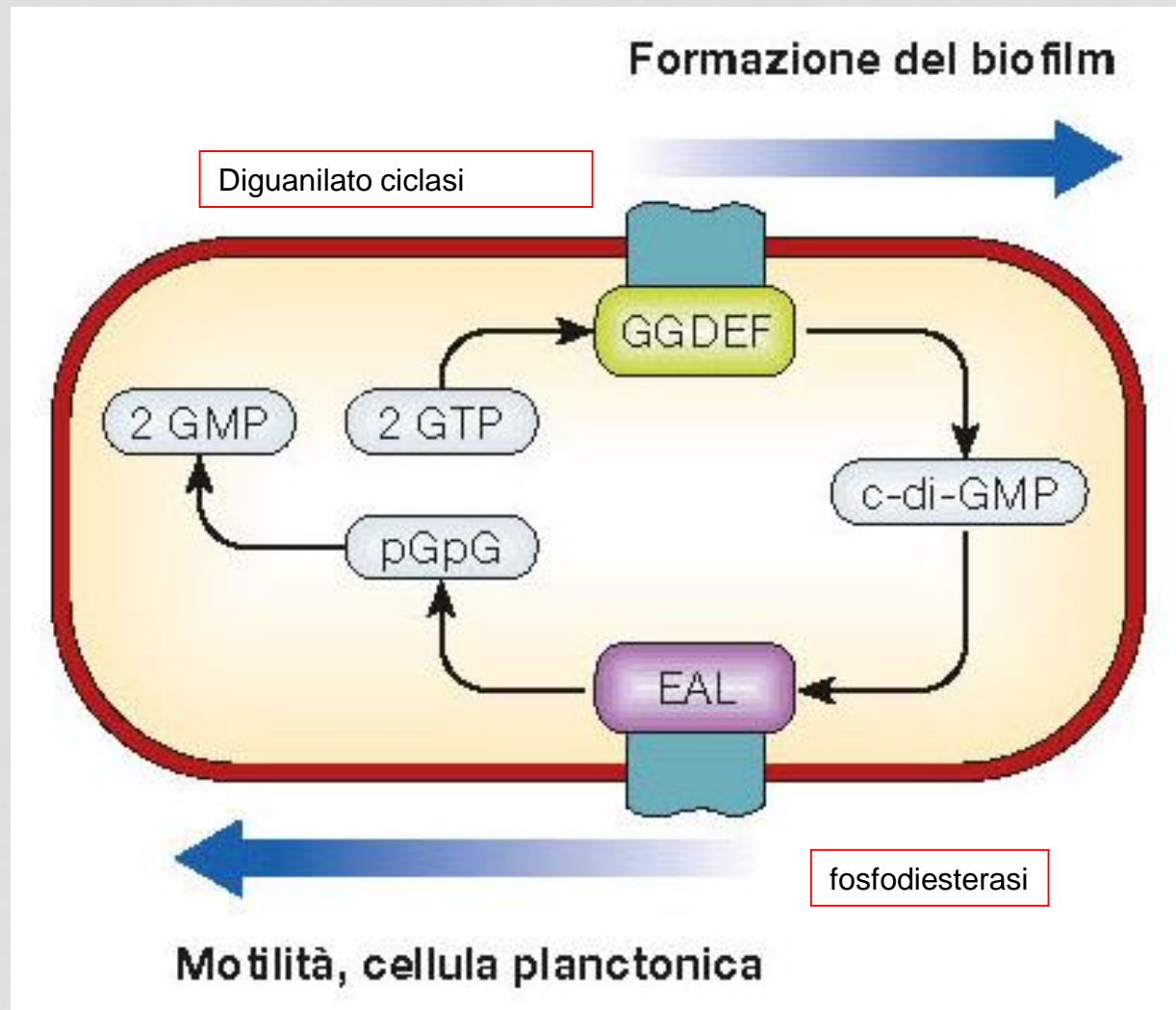
**c-di-GMP**

Nc1nc2c(ncn2C3O[C@H](COP(=O)([O-])OC[C@H]4O[C@H](COP(=O)([O-])OC[C@H]5O[C@H](c6cnc7c(=O)[nH]cnc76)[C@@H](O)[C@H]5O)O4)O[C@H]3)c(=O)[nH]1

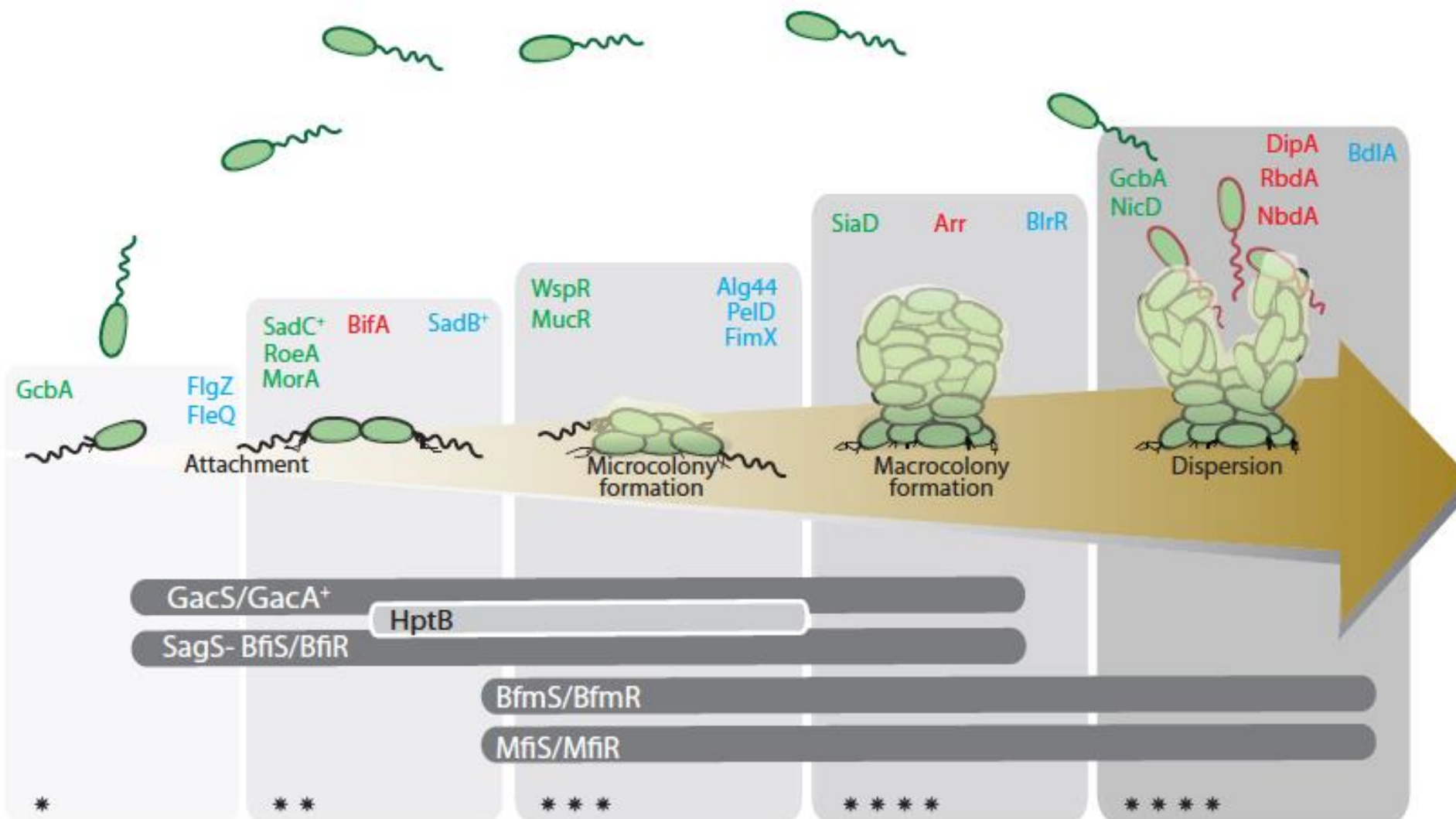
monofosfato dimero ciclico della guanosina



Il c-di-GMP è sintetizzato da due molecole di GTP da enzimi noti come diguanilato ciclastasi (DGC), che portano un dominio GGDEF conservato. A sua volta il c-di-GMP può essere degradato da due famiglie di fosfodiesterasi (PDE); quelli con un dominio EAL linearizzano la molecola per produrre pGpG e le proteine con un dominio HD-GYP generano 2 molecole di GMP.







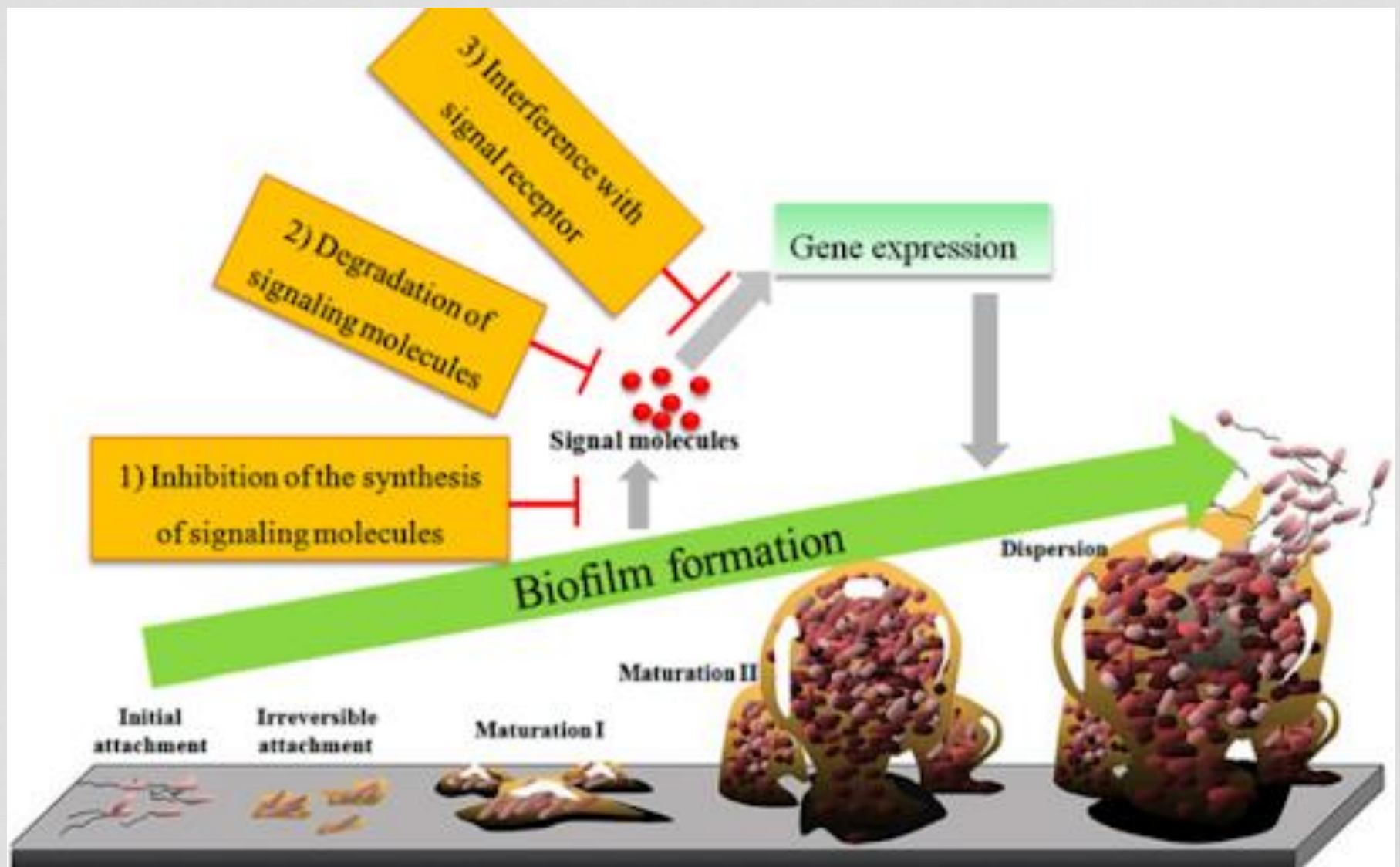
Le cellule planctoniche, biofilm e disperse possiedono stadi fisiologici distinti (contorno verde, nero e rosso, rispettivamente).

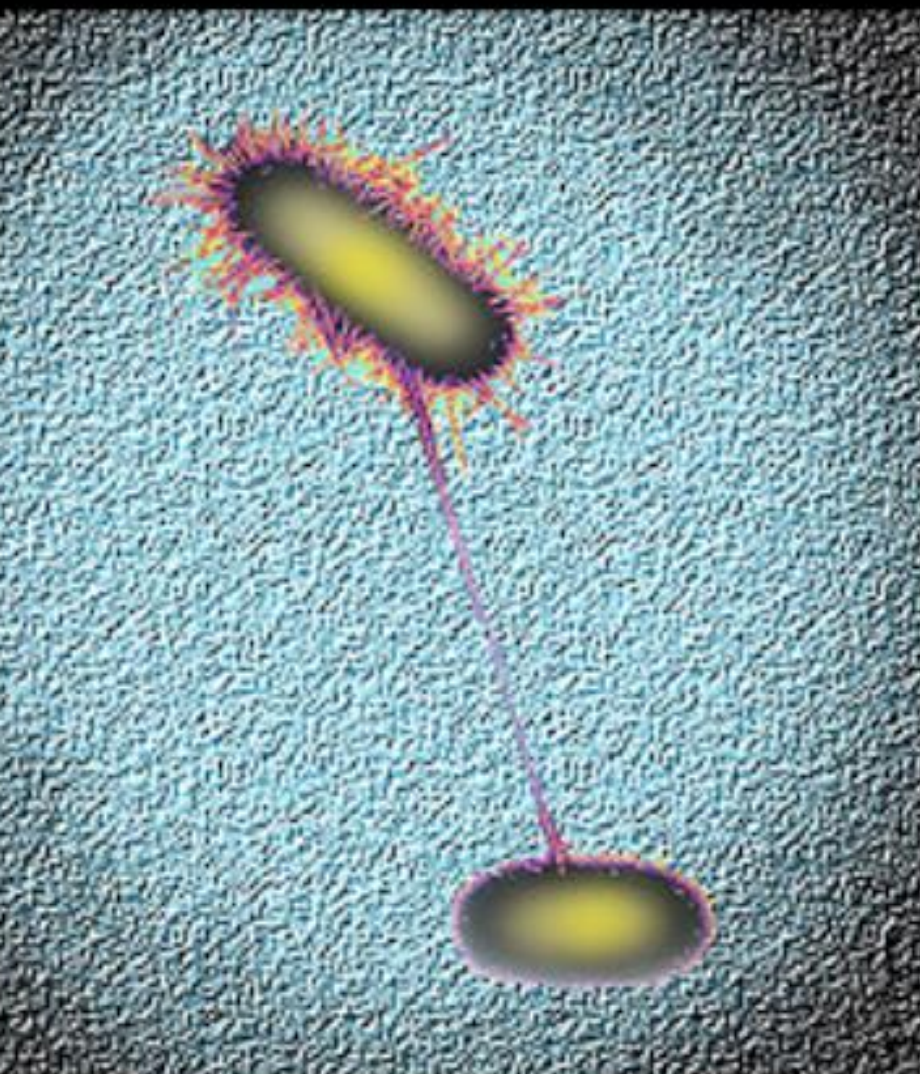
Il pannello superiore illustra i recettori/effettori DGC (verde), PDE (rosso) e c-di-GMP (blu) e la fase di sviluppo in cui agiscono.

Il pannello inferiore illustra i sistemi regolatori a due componenti specifici per lo stadio del biofilm.

Il gradiente dei pannelli grigi sullo sfondo della figura indica l'aumento dei livelli intracellulari di c-di-GMP (indicati anche con \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\*).







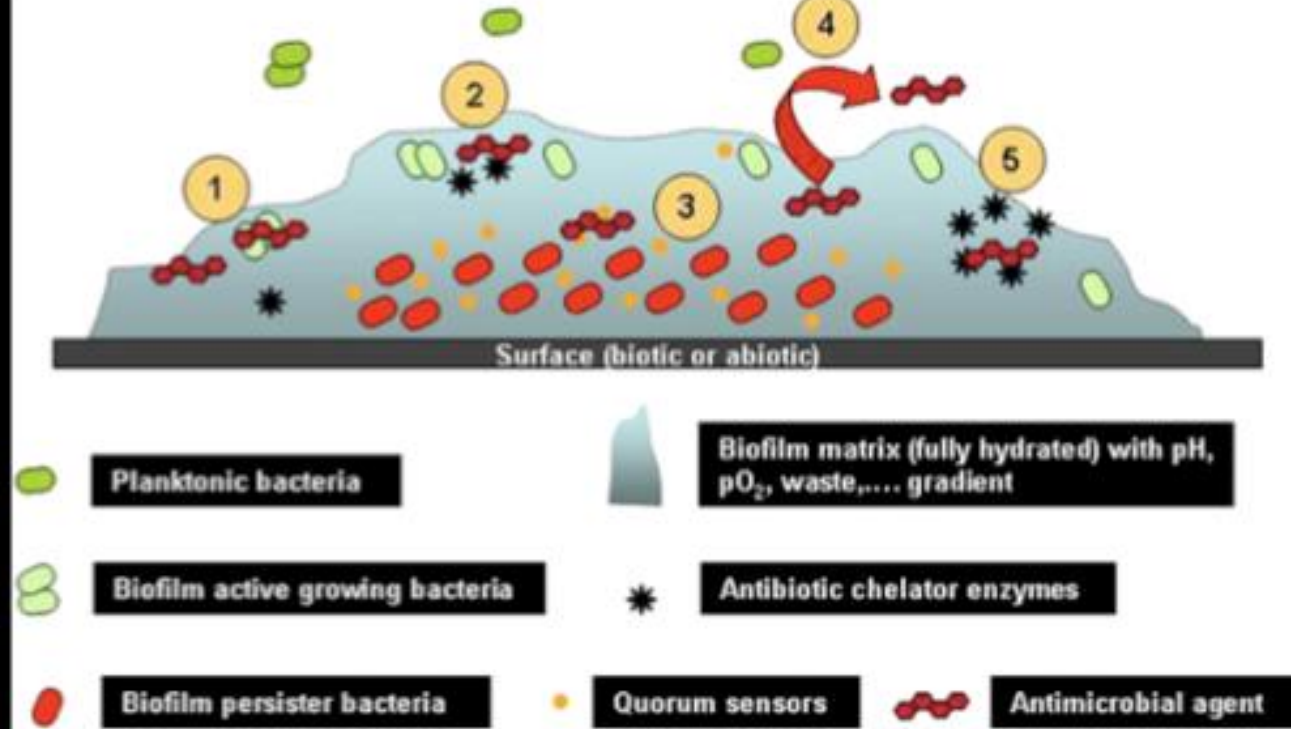
- Anche i pili coniugativi giocano un ruolo importante nello sviluppo del biofilm.
- Come per le fimbrie i pili possono avere un ruolo sia nelle fasi di adesione che nella fase di maturazione del biofilm.
- E' stato descritto che la proteina TraA la maggiore proteina del pilo F ha un ruolo importante nella maturazione del biofilm formato da *E.coli*.



# Perché la vita in un biofilm è vantaggiosa per un microrganismo?

- è protetto da radiazioni U.V. e dal calore
- minimizza gli effetti di cambiamenti di pH
- è protetto da sostanze inibitorie
- essendo immerso in una matrice acquosa è protetto dalla disidratazione
- è meno sensibile all'attacco di virus batterici (batteriofagi)
- è meno esposto all'attacco di microrganismi predatori

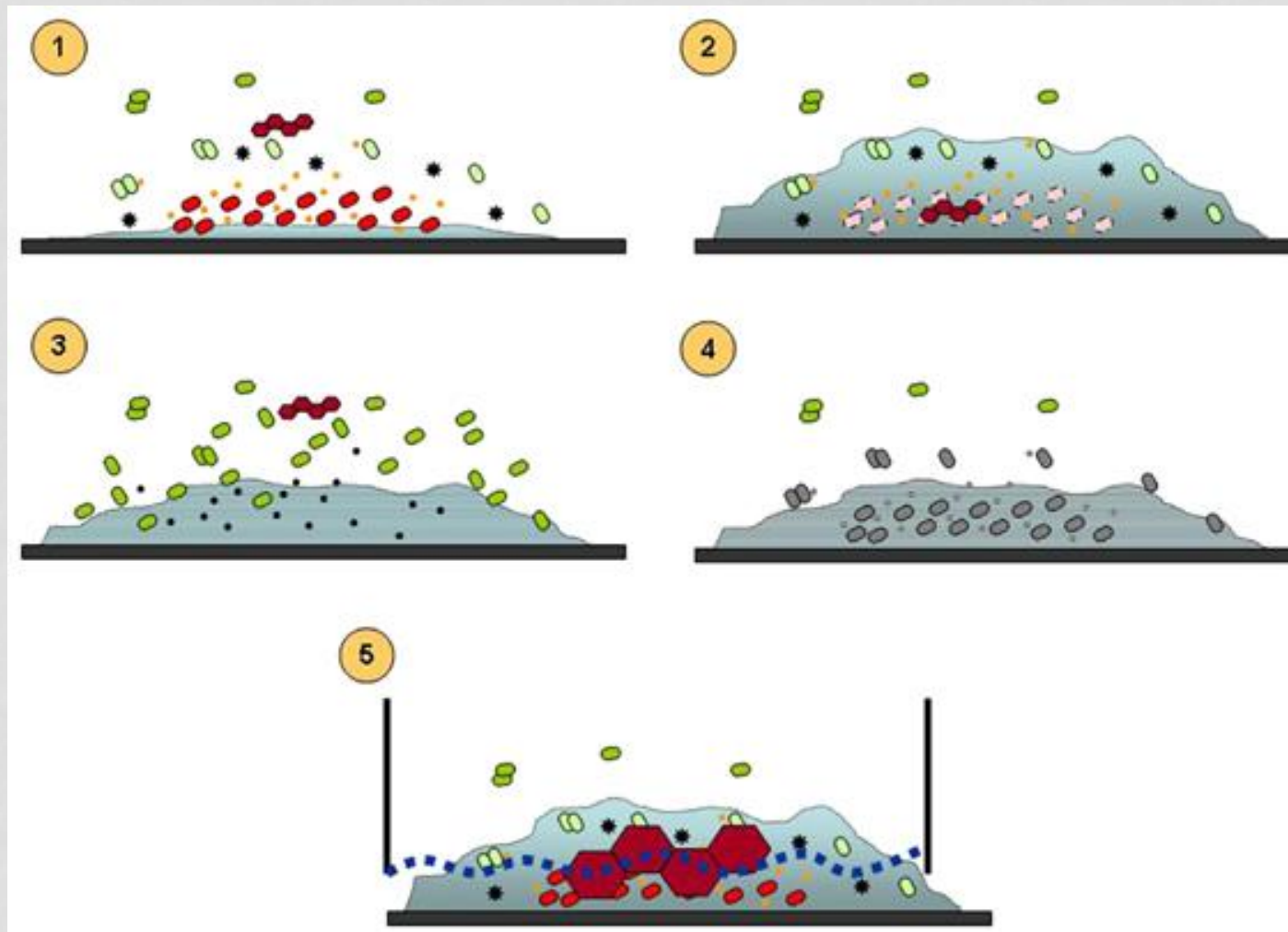




## Altri fattori importanti nel biofilm..

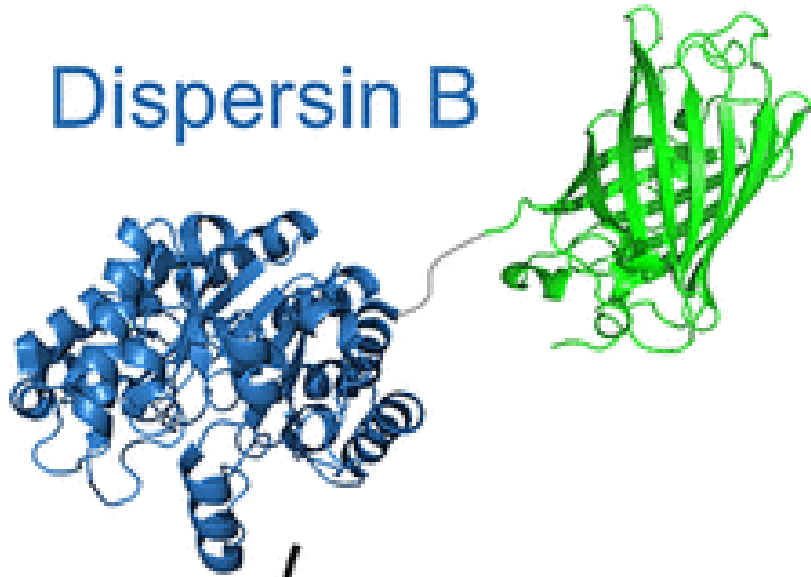
- Lo scambio del materiale genetico
- La protezione dai predatori (es. *Bdellovibrio*)
- Il QS
- Il ruolo della batteriolisi
- Etc..



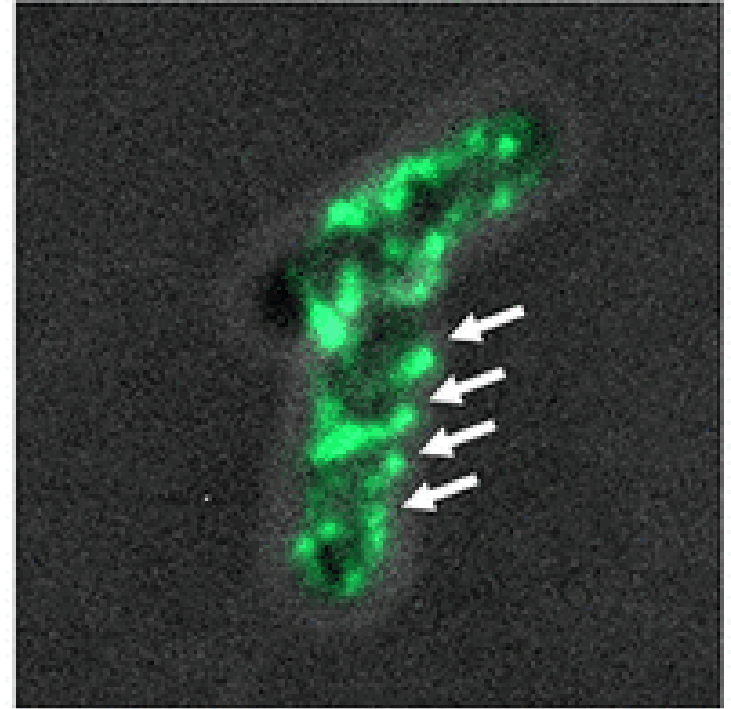
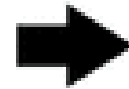
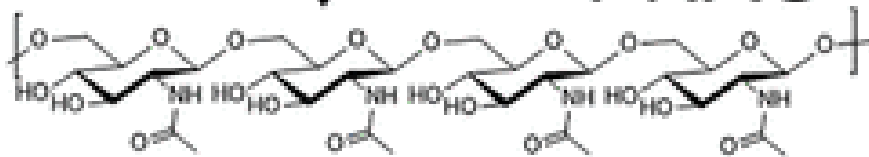


Possible strategies to treat biofilm-associated infections. (1) Substances able to destroy the biofilm matrix (e.g., dispersin B). (2) Substances which destroy persister cells. (3) Quorum-quenching enzymes. (4) Substances which cause biofilm self-destruction. (5) Strategies to boost antimicrobial agent action (e.g., electrical current).

Dispersin B



PNAG



poly- $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosamine

$\beta$ -1,6 glycoside hydrolase



# Strategies to prevent biofilm formation depend on context

## Medical (small scale)

**Chemical approaches:** antibiotics, biocides etc.

**Physical approaches:** Use of acoustic energy, ultrasound, vibration, Piezo electric elements

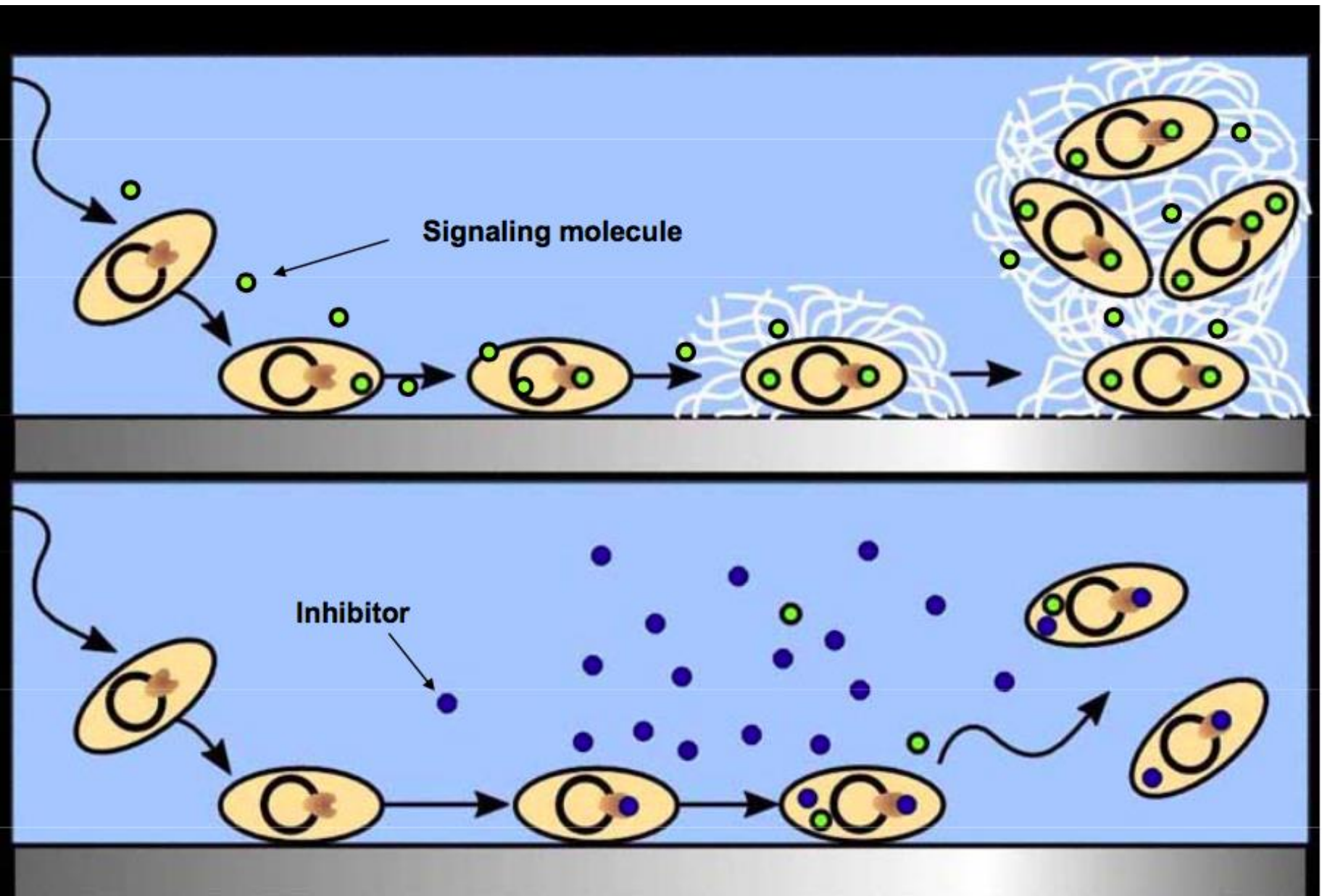
**Biological approaches:** Lytic bacteriophages, interference with inter-bacterial signaling, interference with genetic programs that control biofilm formation

## Industrial (large scale)

**Chemical approaches:** chlorine, ozone, ionization, hydrogen peroxide, various biocides

**Physical approaches:** choice of material that inhibits attachment, vibration, mechanical cleaning (e.g. high pressure flushing), UV

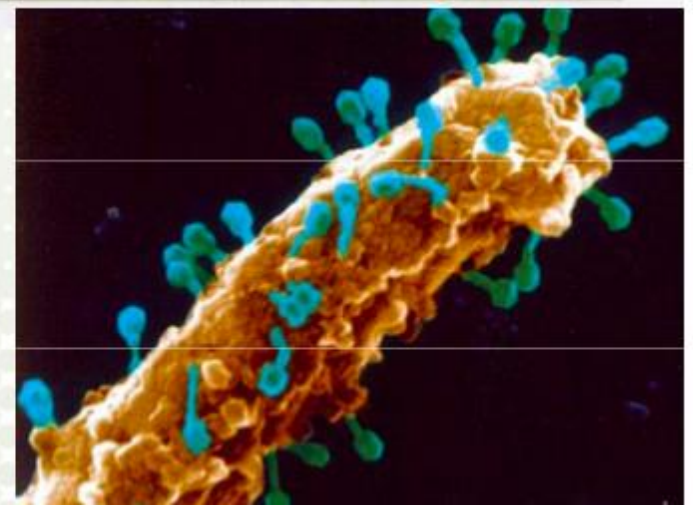
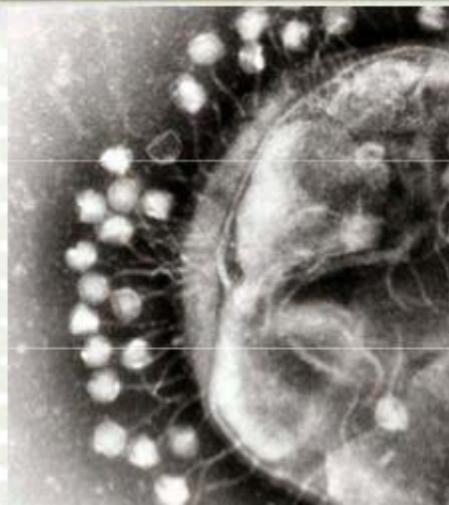
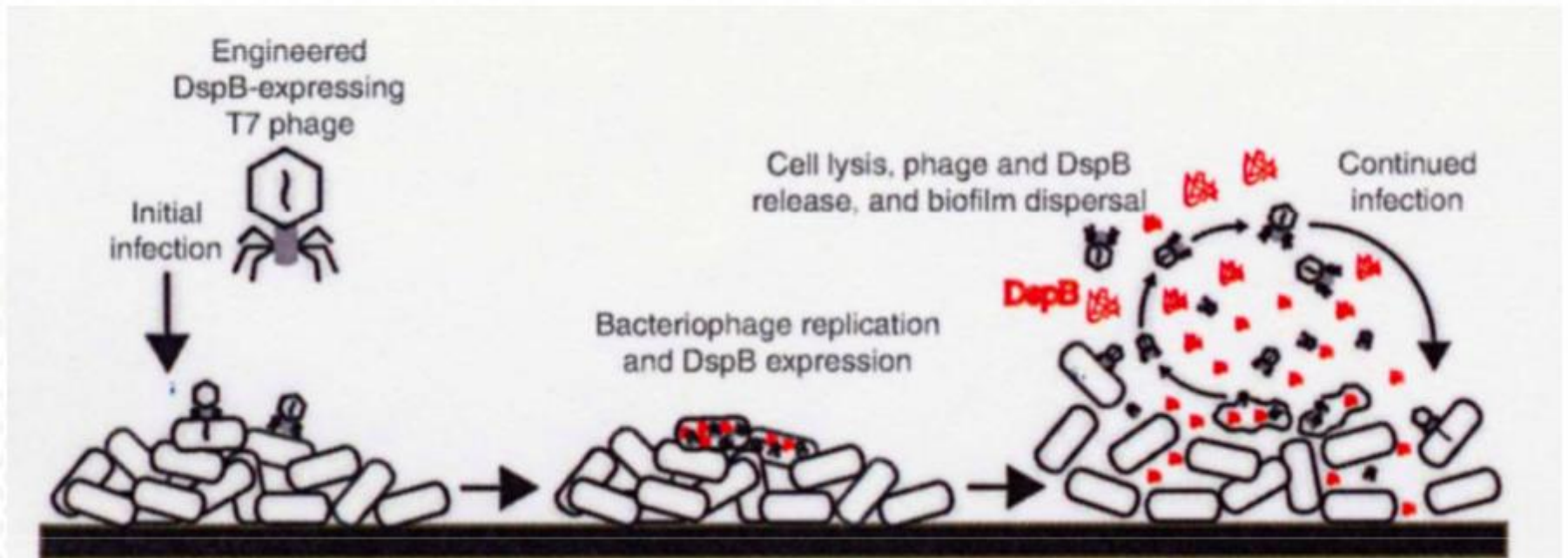
**Biological approaches:** alteration of growth conditions?,



**Interference with cell-cell communication:  
Common strategy to combat biofilm associated**



# Controlling biofilms with bacteriophages





# APPLICAZIONI INDUSTRIALI DEL BIOFILM

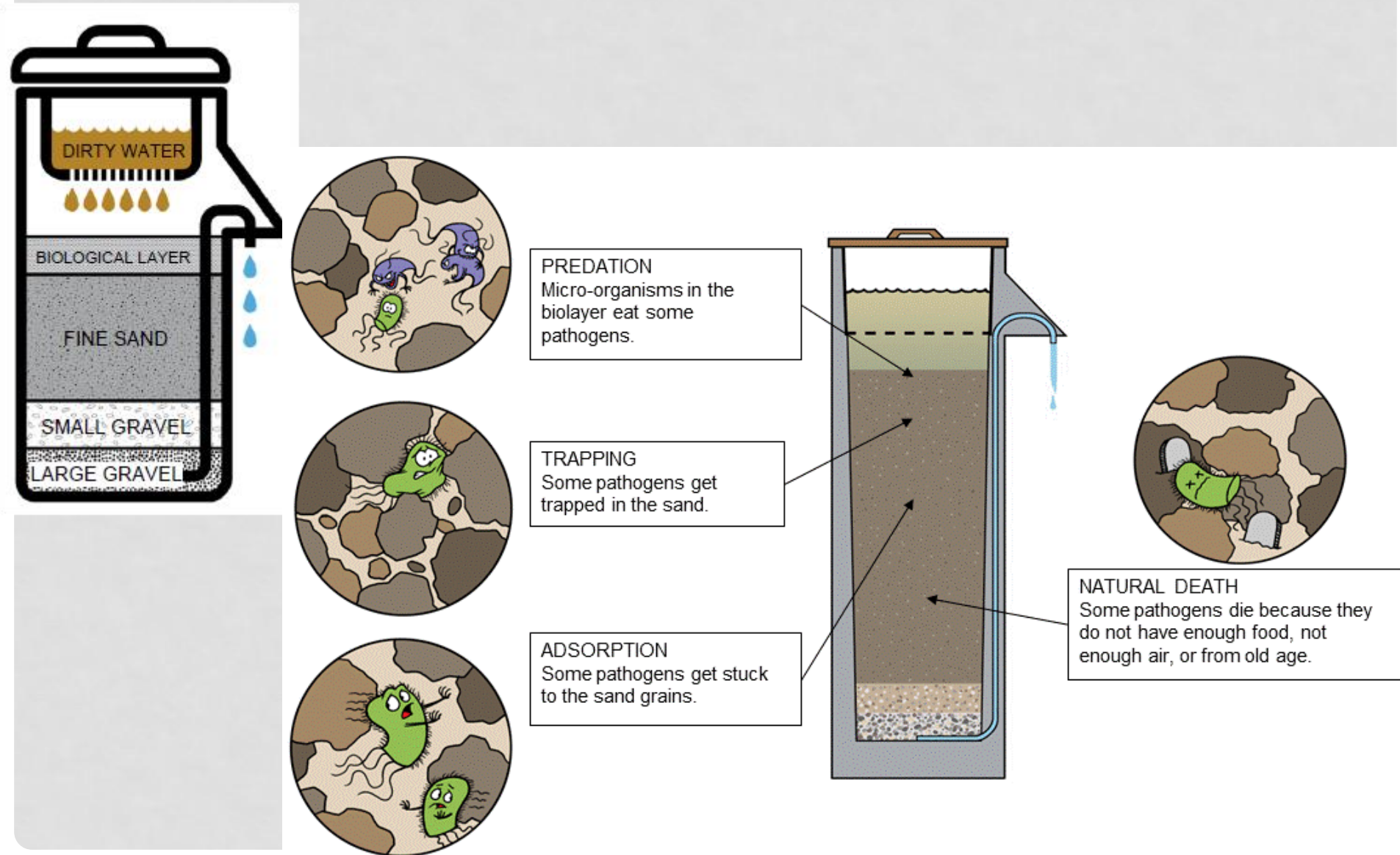
Bioremediation: Degradazione batterica di ambienti contaminati

Biofiltrazione: Rimozione selettiva di molecole chimiche dalle soluzioni

Biobarriera: Protezione di oggetti usando biofilms dotati di spessi strati di polisaccaridi

Bioreattori: Produzione di molecole usando biofilms specificamente ingegnerizzati.

# Come il biofilm può essere utile.....il BIOSAND





Gli agenti patogeni e i solidi sospesi vengono rimossi da processi biologici e fisici che avvengono nel biostrato e nello strato di sabbia. Questi processi includono: Intrappolamento meccanico: i solidi sospesi e gli agenti patogeni sono intrappolati negli spazi tra i granelli di sabbia. Predazione: i patogeni vengono consumati dai microrganismi nel biostrato. Adsorbimento: Gli agenti patogeni vengono adsorbiti l'uno nell'altro e nei solidi sospesi nell'acqua e nei granelli di sabbia. Morte naturale: gli agenti patogeni terminano il loro ciclo di vita o muoiono perché non c'è abbastanza cibo o ossigeno.





