

Che cos'è un biofilm?

BIOFILM è una COMUNITA' Microbica costituita da microrganismi adesi ad una superficie ed immersi in una matrice polisaccaridica adesiva secreta dalle cellule stessa

I Biofilm

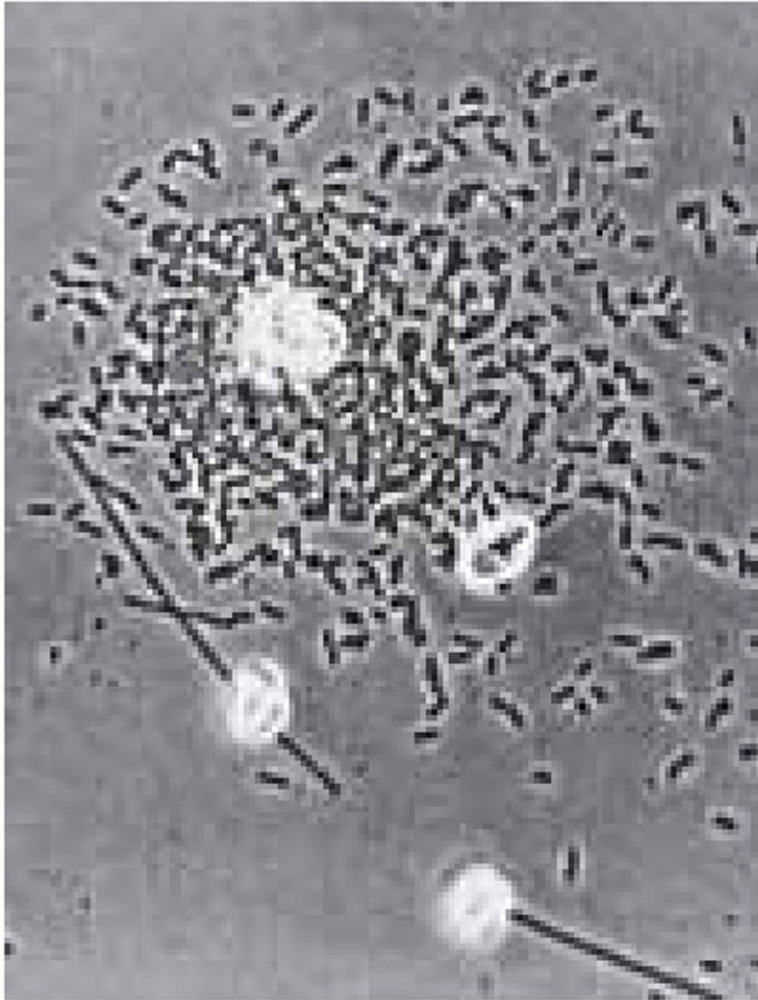
- intrappolano i nutrienti necessari per la crescita della popolazione microbica
- contribuiscono a prevenire il dilavamento delle cellule dalle superfici immerse in un fluido
- La comunicazione tra le cellule presenti nel biofilm è un fattore cruciale per lo sviluppo ed il mantenimento del biofilm stesso.

Le superfici sono habitat microbici molto importanti perché su di esse si possono adsorbire nutrienti

- nel microambiente costituito da una superficie il livello di nutrienti può essere molto più alto di quanto non lo sia in una soluzione

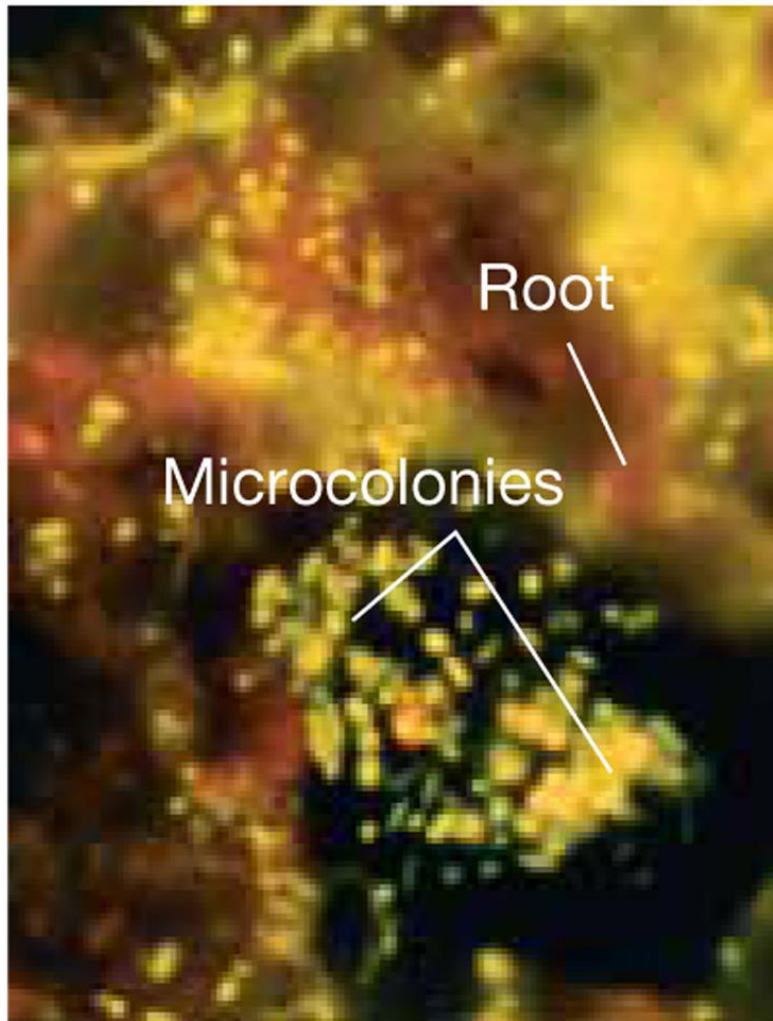
- L'attività ed il numero di cellule microbiche su una superficie è di solito molto maggiore di quanto non lo sia in una soluzione acquosa.

- Una superficie può essere anche essa stessa un nutriente sulla quale i microrganismi adesi catabolizzano direttamente i composti che costituiscono la particella stessa.



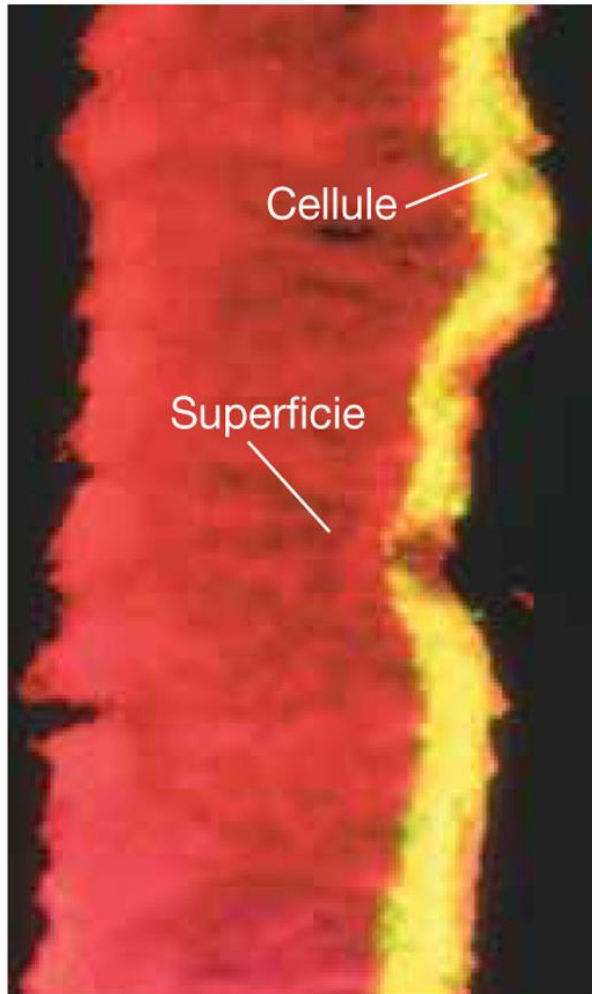
Se si immerge un vetrino in un habitat microbico si osserva lo sviluppo di microrganismi

Su superfici artificiali le microcolonie si sviluppano con la stessa rapidità con cui si sviluppano su superfici naturali



Il materiale vegetale
viene rapidamente
colonizzato dai
microrganismi.

Si può osservare la
formazione di
microcolonie

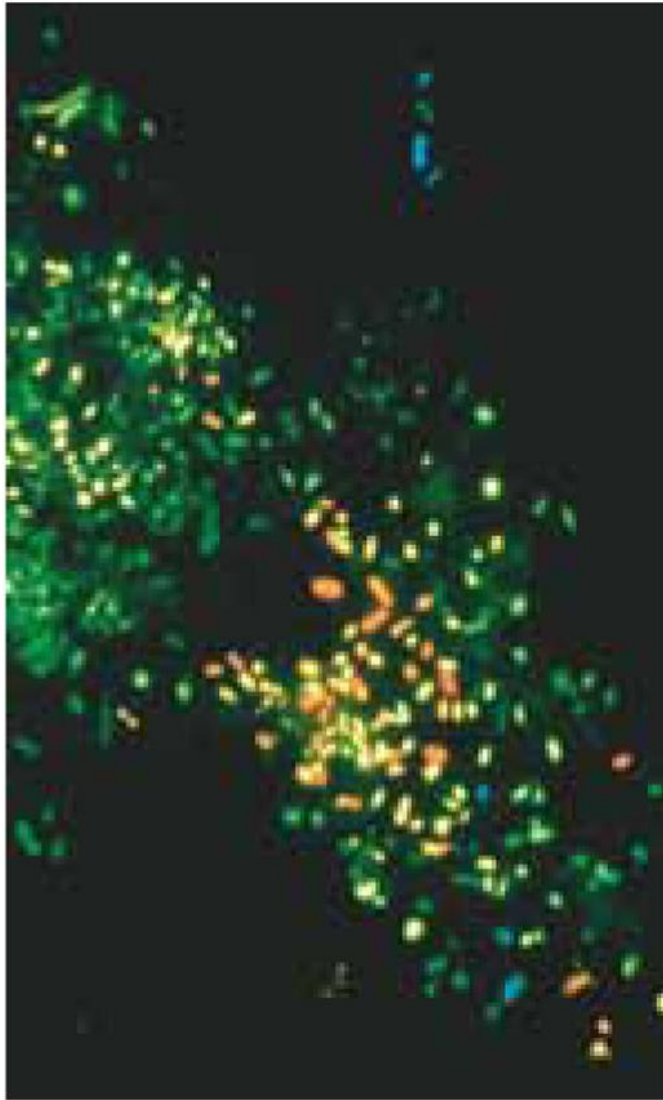


L'adesione delle cellule alla superficie costituisce un segnale per l'espressione di geni specifici per lo sviluppo del biofilm.

Sezione trasversale di un biofilm generato da cellule di un batterio Gram - *Pseudomonas aeruginosa*.

Mediante un cromoforo che evidenzia l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina vengono evidenziate le cellule batteriche (zona gialla)

La zona rossa è invece la matrice organica prodotta dalle cellule batteriche



Con il microscopio laser confocale si possono mettere in evidenza i vari strati di un biofilm naturale sviluppatosi sulla superficie di una matrice vegetale (foglia)

Rosso sono cellule in superficie

Verde profondità di 9 micron

Blu profondità di 18 micron

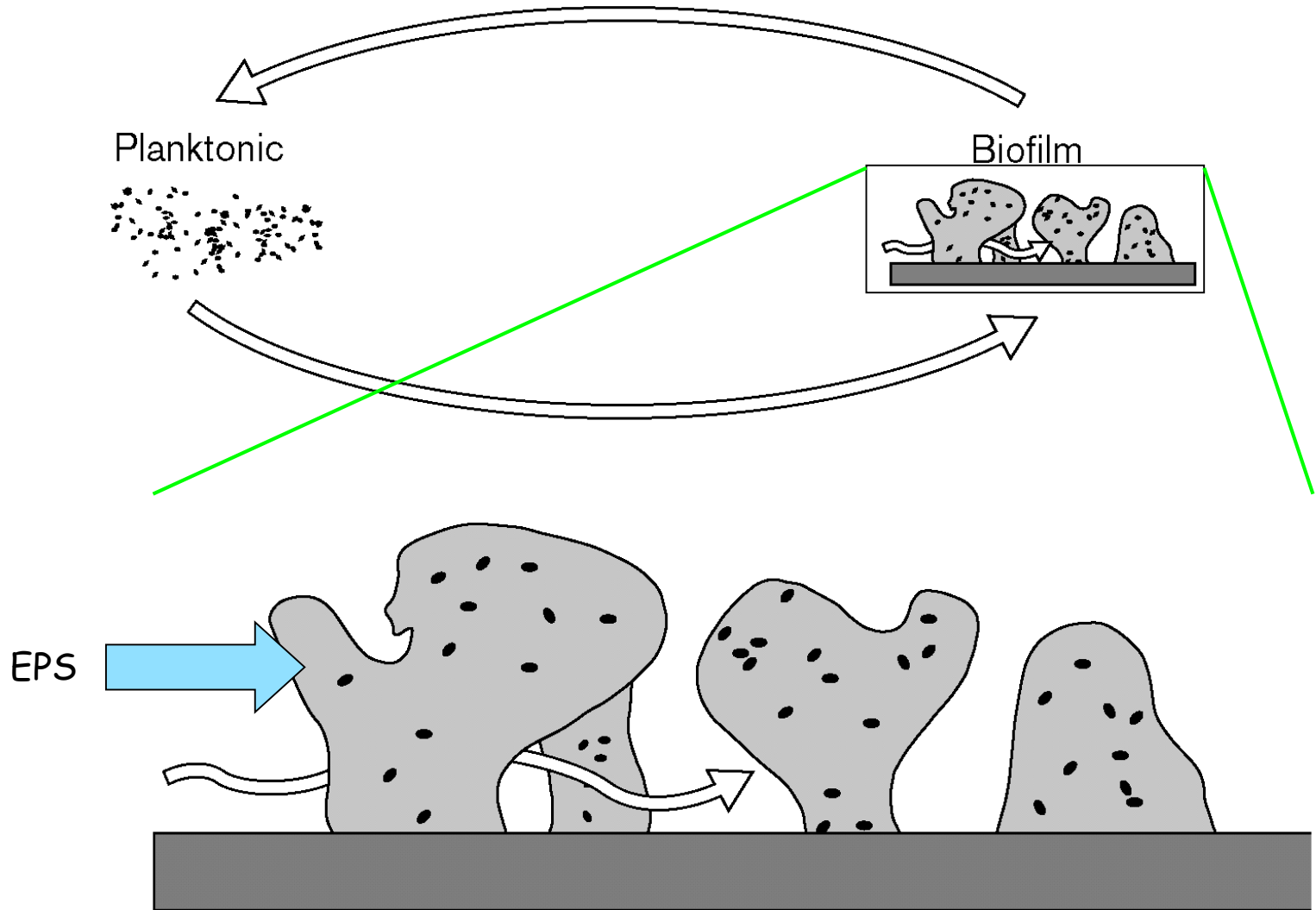
Costituenti di un biofilm

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

I costituenti fondamentali sono

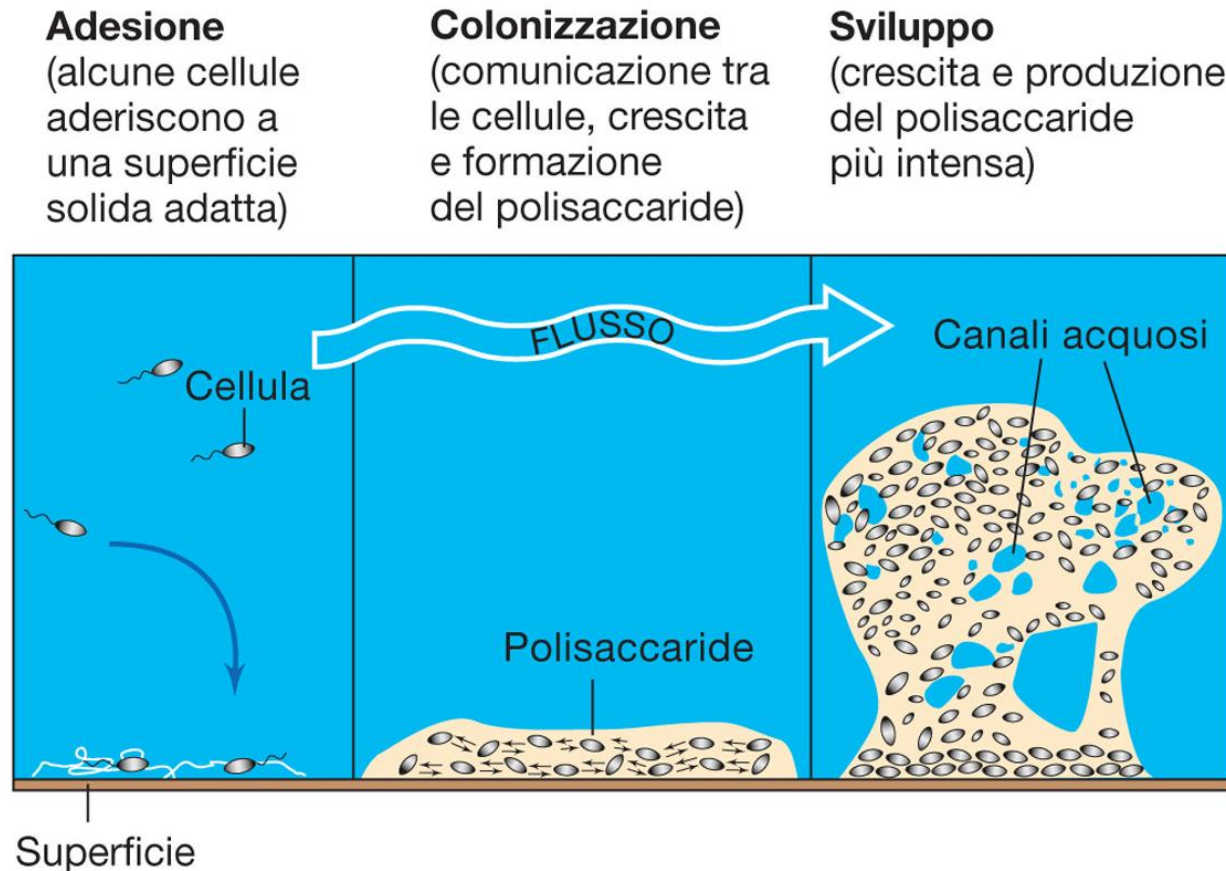
- i microrganismi che formano microcolonie
- le sostanze organiche (glicoproteine e polisaccaridi) definite EPS (Extracellular polymeric substances) nelle quali sono immersi i batteri
- l'acqua che forma canali tra le microcolonie favorendo la circolazione di nutrienti

Struttura di un biofilm



Lo sviluppo di un biofilm batterico inizia con l'adesione di poche cellule ad un substrato.

L'adesione dà un segnale per l'espressione di geni specifici che codificano per la sintesi di molecole che fungono da segnali di comunicazione tra le cellule

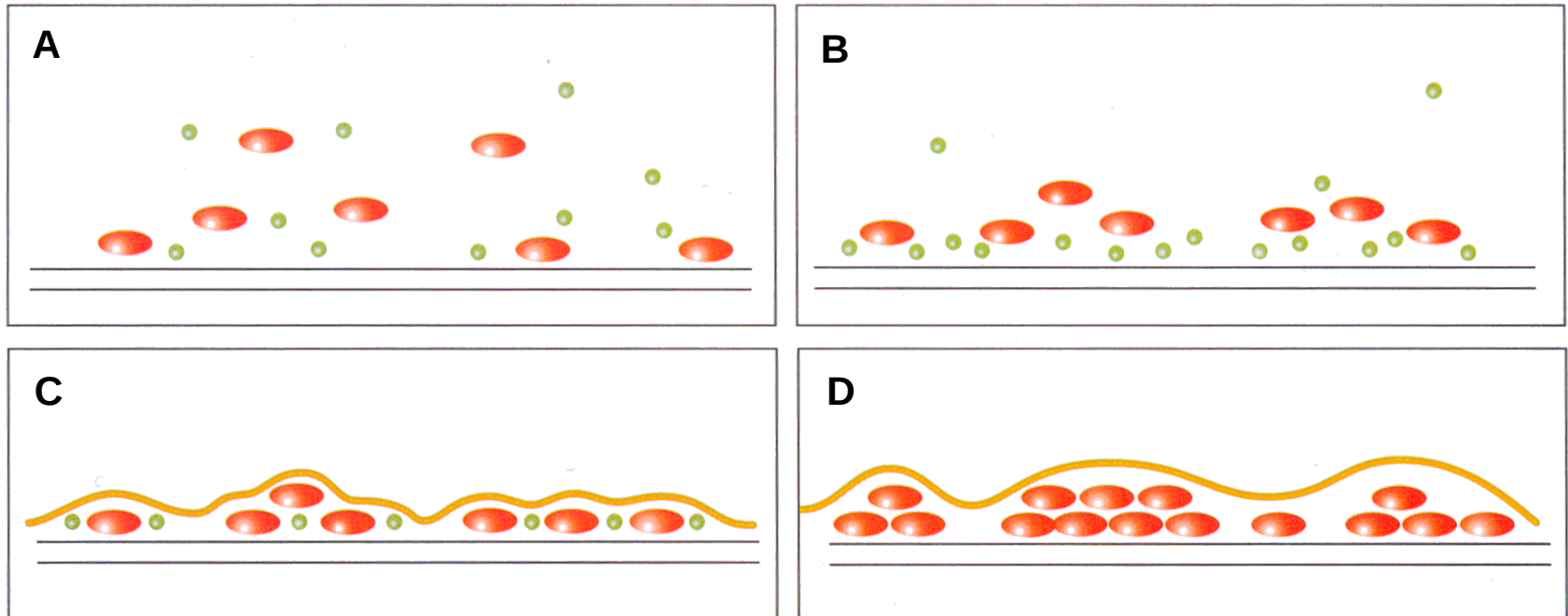


La formazione di un biofilm

Le tappe fondamentali sono:

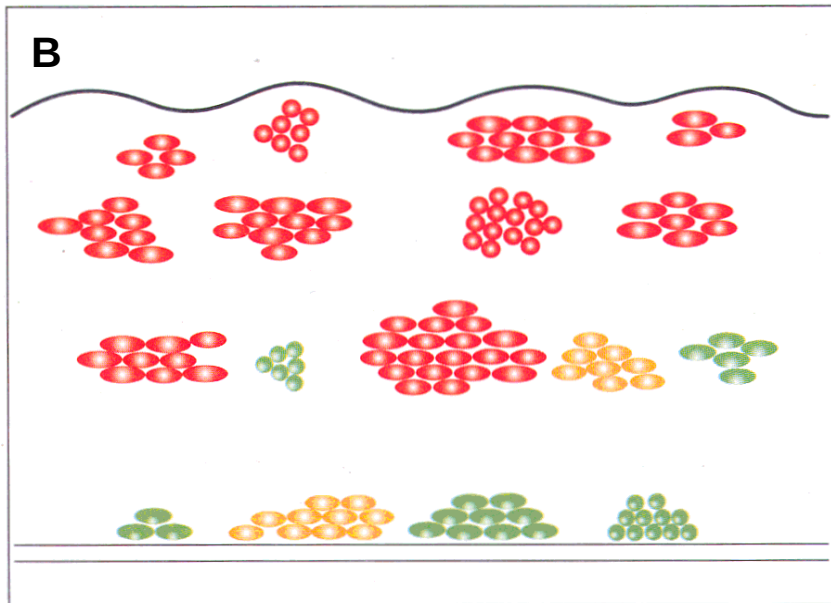
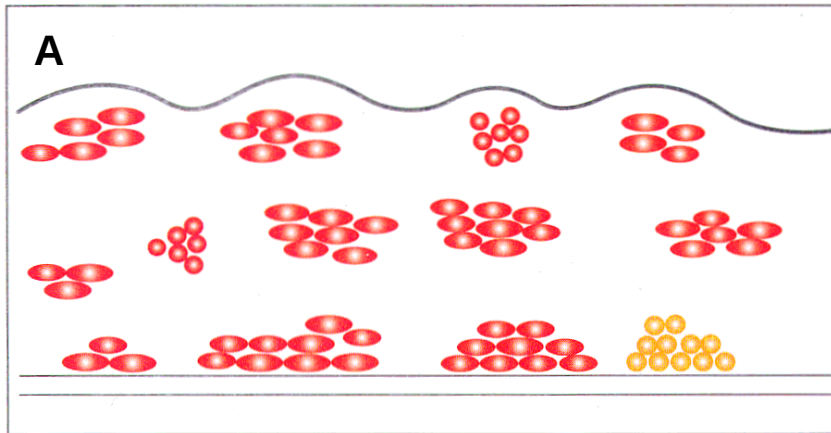
- Movimento dei microrganismi favorito da strutture di superficie (flagelli)
- Assorbimento di molecole
- Adesione dei microrganismi (pili, sintesi di EPS)
 - adesione reversibile
 - adesione irrisversibile
- Colonizzazione

Nascita di un biofilm



- 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 sino a desquamare dal substrato di crescita

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)

Le molecole segnale svolgono il ruolo di agenti chemiotattici :
Richiamano le cellule circostanti che aumentano di numero
ed iniziano a sviluppare un biofilm.

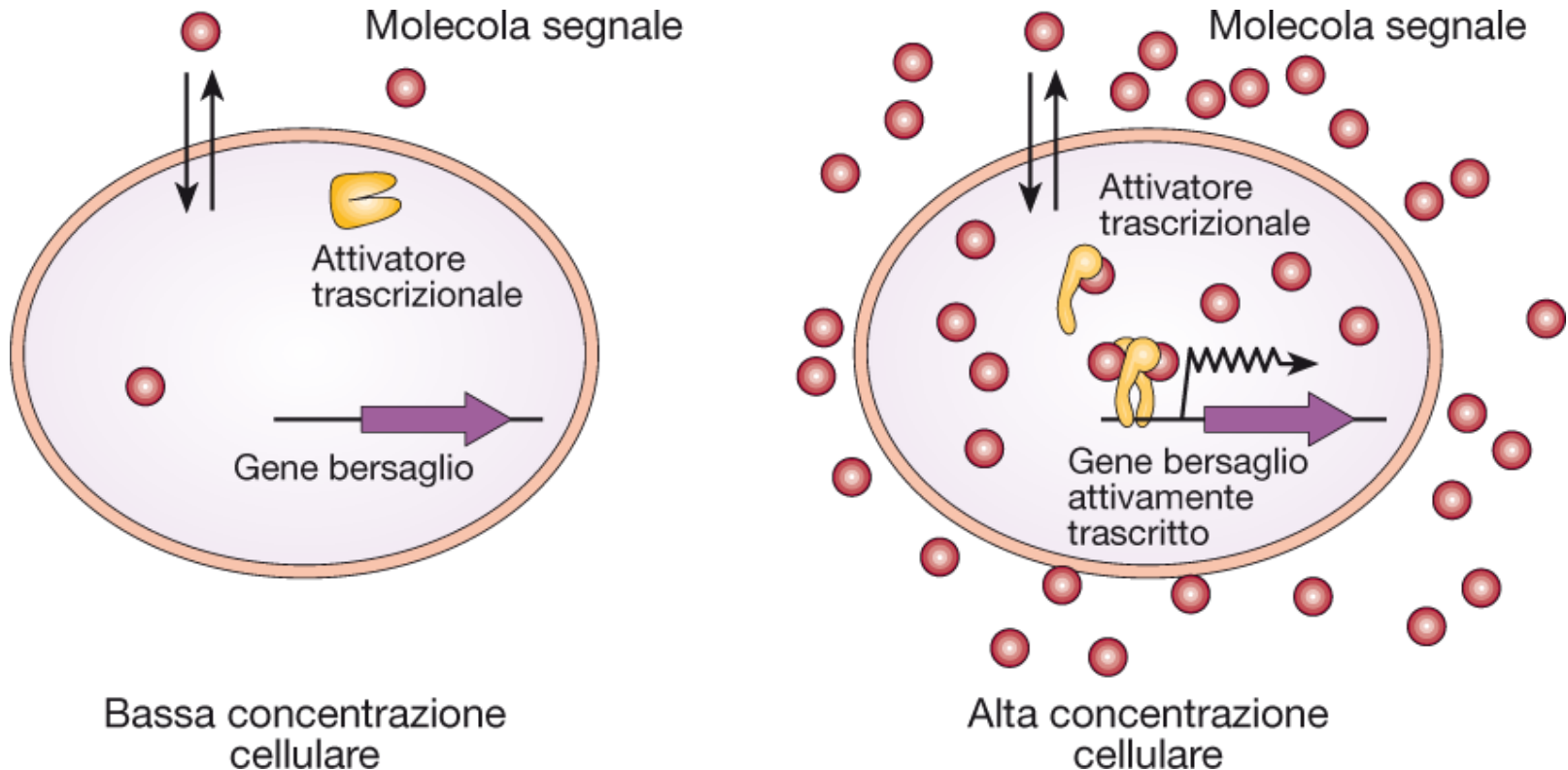
Il meccanismo con il quale le cellule comunicano tra di loro per formare biofilm
prende il nome di

QUORUM SENSING

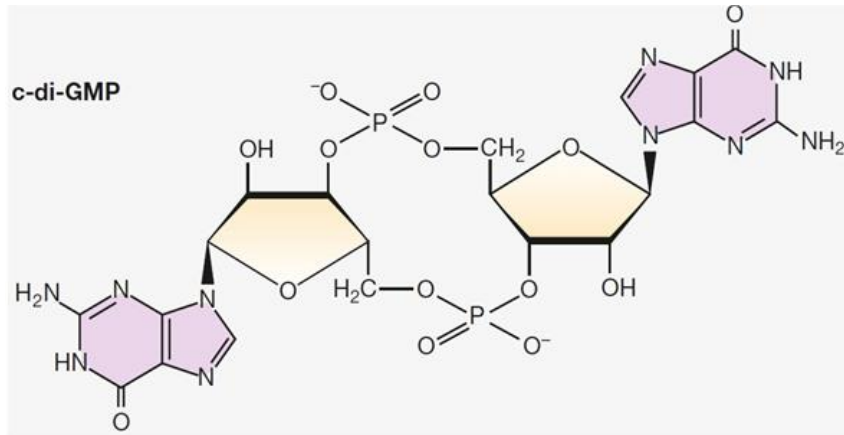
QUORUM SENSING

Nel quorum sensing la molecola segnale viene sintetizzata dal batterio stesso che dispone anche del sensore

La secrezione della molecola segnale fa sì che questa raggiunga una concentrazione funzionale solo quando la densità cellulare raggiunge elevati livelli



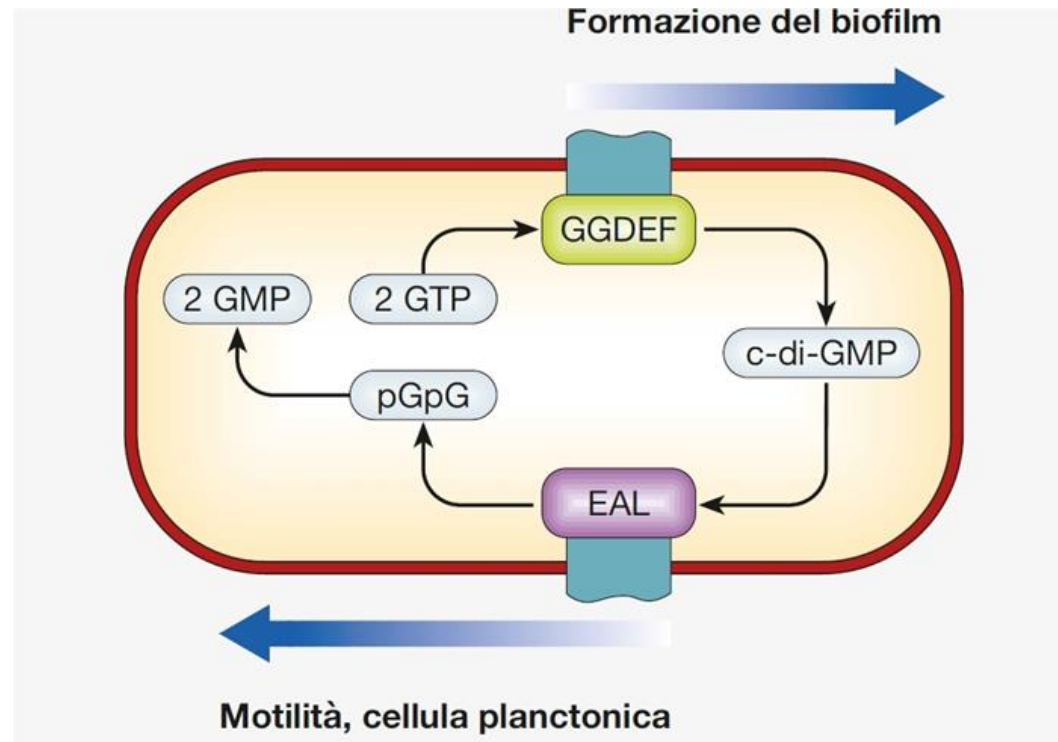
Molecola segnale di-GMP-Ciclico



La concentrazione viene determinata dall'attività di due enzimi con funzione opposta:

- **GGDEF** Diguanilato ciclastasi che sintetizza c-di-GMP a partire da 2 molecole di GTP

- **EAL** c-di-GMP fosfodiesterasi che degradano c-di-GMP a due molecole GMP



Identificazione di una nuova molecola segnale c-di-GMP



c-di-GMP è stato identificato originariamente in *Gluconobacter xylinus* dove funge da attivatore allosterico per una subunità del complesso enzimatico della cellulosa sintasi.

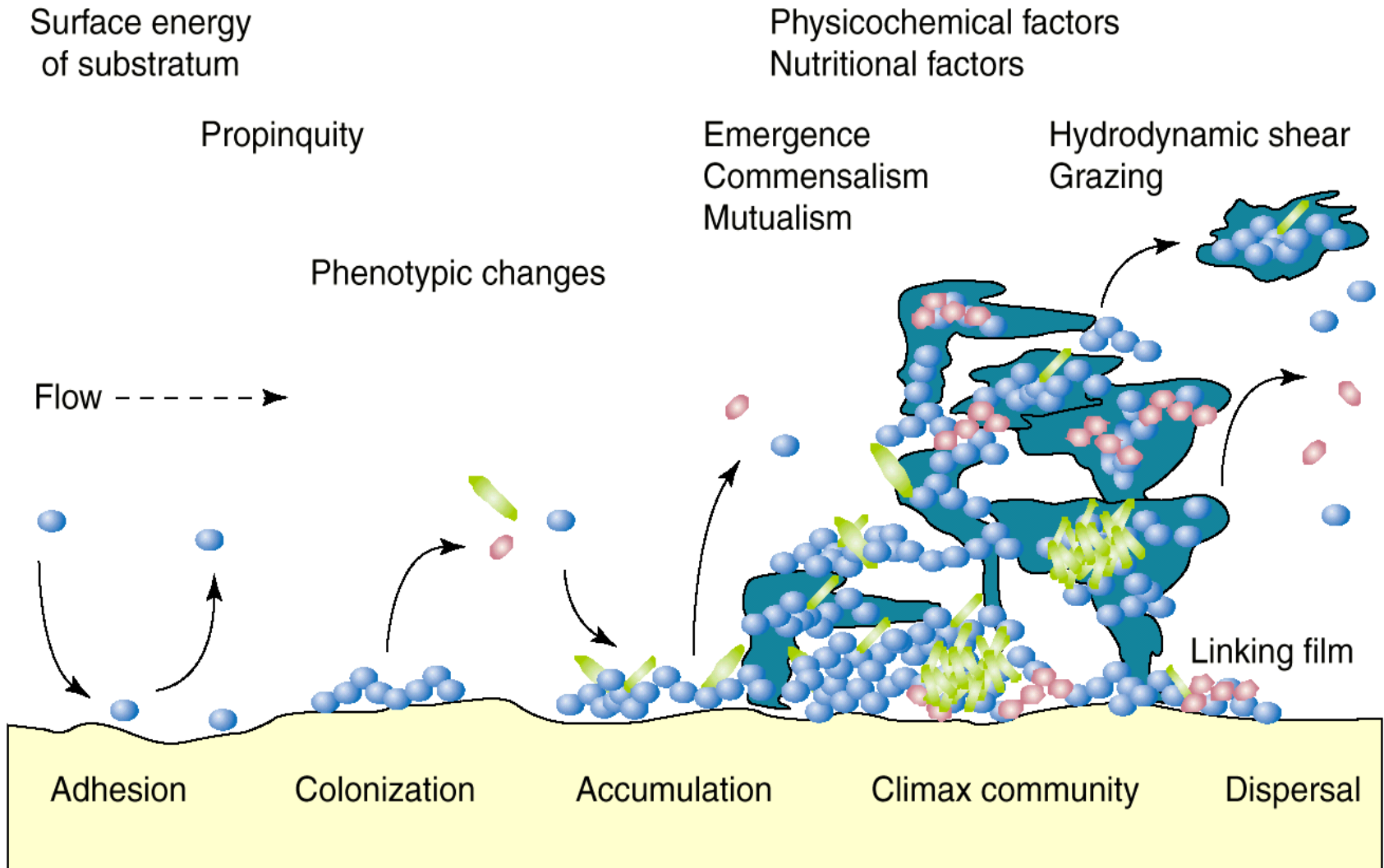
Batterio aerobio che comincia a produrre cellulosa quando si trova in ambienti acquosi poveri di ossigeno

Il livello di cellulosa prodotta è regolato da livelli di c-di-GMP che a loro volta dipendono dall'attività delle c-di-GMP ciclasie e dalle fosfodiesterasi.

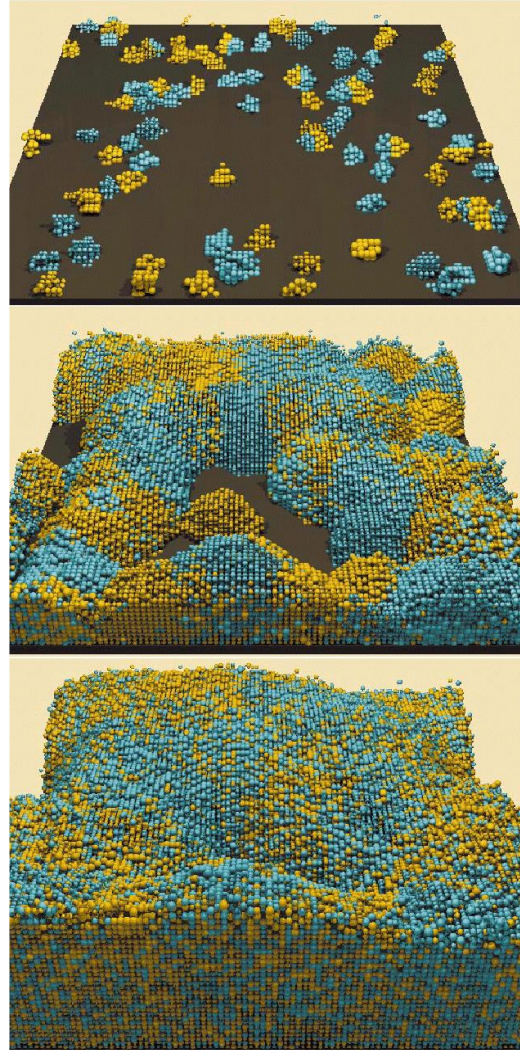
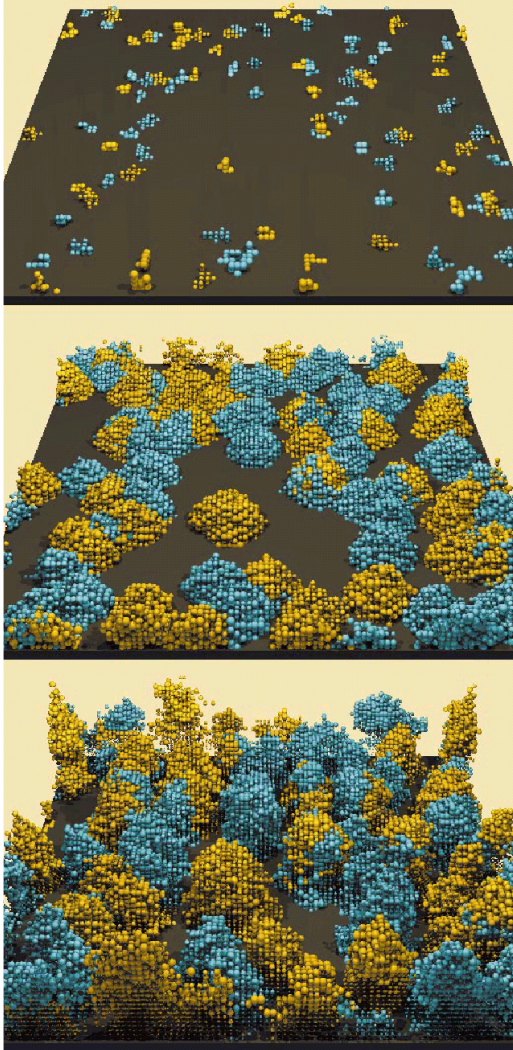
Si è visto che questa molecola, come cAMP, è un regolatore importante di numerosi fenomeni tra i quali la produzione di biofilm in numerosi batteri.

Le proteine deputate alla sintesi e degradazione del c-di-GMP possono contenere domini coinvolti nella trasduzione del segnale segnalando al batterio l'ambiente ed attivando classi di geni ambiente-specifiche.

Ciclo di sviluppo di un biofilm

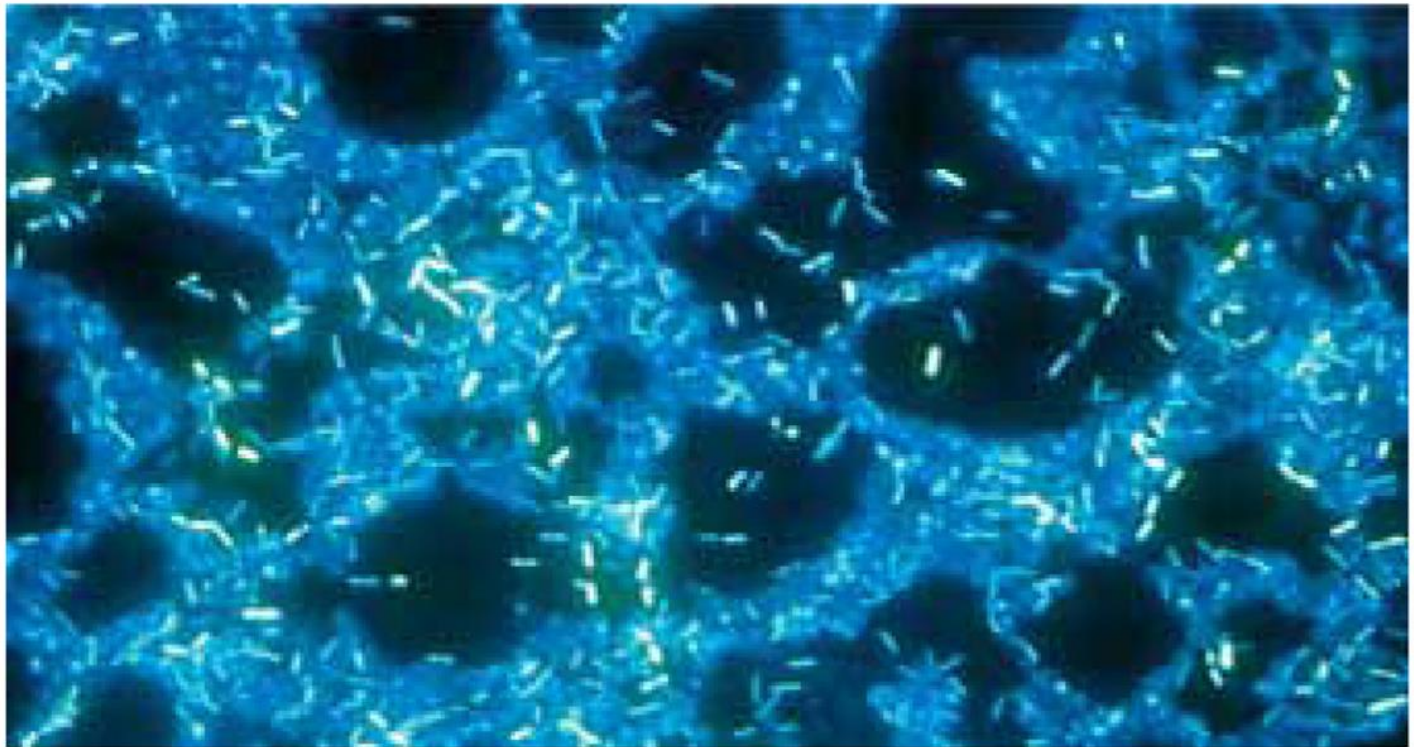


Biofilm virtuali



Simulazione al computer della crescita di un biofilm contenente due specie (blue e giallo). Quando i nutrienti scarseggiano e sono distribuiti in modo non omogeneo (a sinistra) la crescita non porta alla formazione di un biofilm liscio e compatto, come accade invece in presenza di nutrienti abbondanti e distribuiti uniformemente (a destra).

Cellule che formano biofilm
sviluppatosi su una superficie di metallo.
Vi sono canali per il passaggio dell'acqua.



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

I batteri formano un biofilm perché questo stile di vita

- aumenta la possibilità di sopravvivenza
- migliora la crescita di un microrganismo .

I BIOFILM rappresentano un sistema di DIFESA

- dai flussi che dilavano i batteri
- dalla fagocitosi
- dalla penetrazione di composti tossici

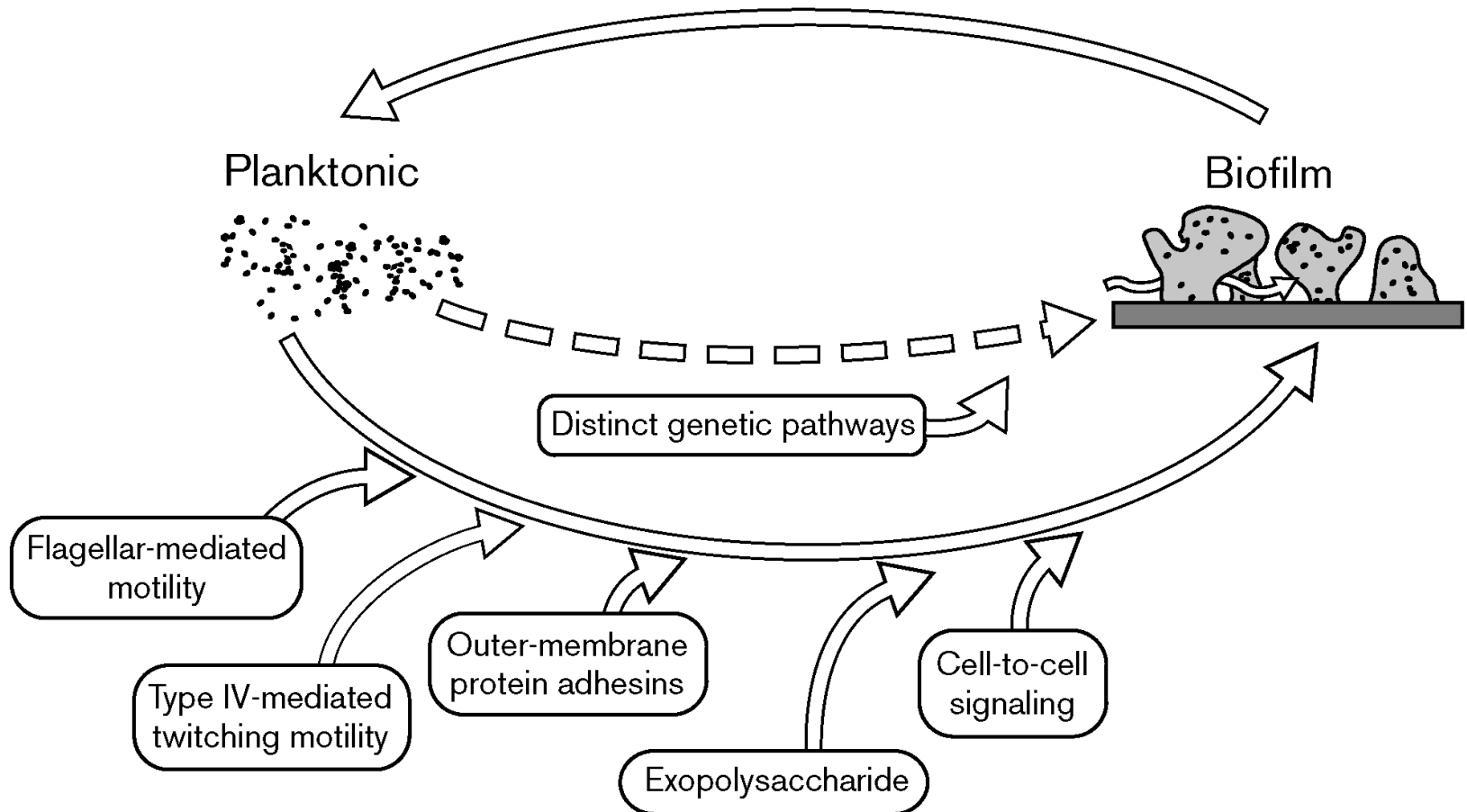
I BIOFILM permettono ai Batteri di rimanere in una nicchia a loro favorevole

- una volta colonizzata una superficie il microrganismo può rimanere adeso
- Se la nicchia è ricca di sostanze nutritive od idonee alla sopravvivenza questo è un vantaggio

• I BIOFILM permettono alle cellule di vivere in stretta associazione

• I BIOFILM sono la tipica modalità di crescita delle cellule batteriche negli ambienti naturali

Fattori genetici coinvolti nella formazione di un biofilm



Per chi volesse approfondire e fare esercizio di inglese scientifico

Bonnie Bassler: Quorum sensing e comunicazione tra i batteri

<https://www.youtube.com/watch?v=KXWurAmtf78>

Breve lezione

<https://www.youtube.com/watch?v=saWSxLU0ME8>

<https://www.youtube.com/watch?v=k-CkqIePaqI>

Lezione in 2 parti con sottotitoli

QUORUM SENSING

Quorum sensing svolge un ruolo importanti in molti fenomeni

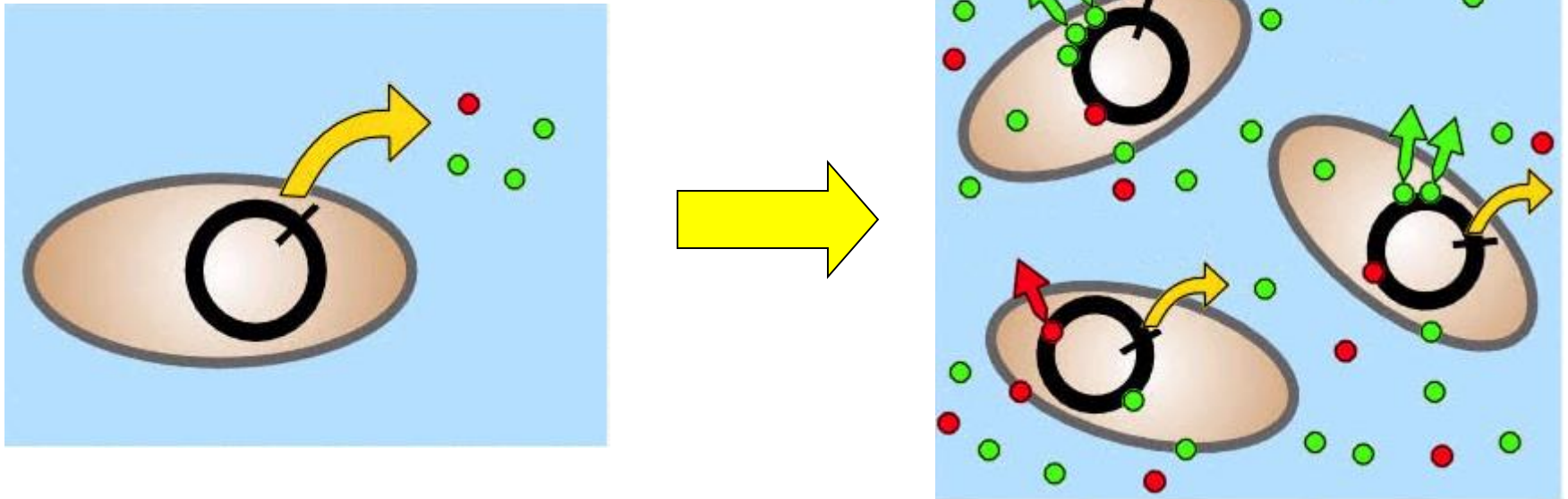
- Espressione della virulenza
- Simbiosi
- Produzione di biofilm
- Coniugazione
- Sporulazione
- Trasformazione

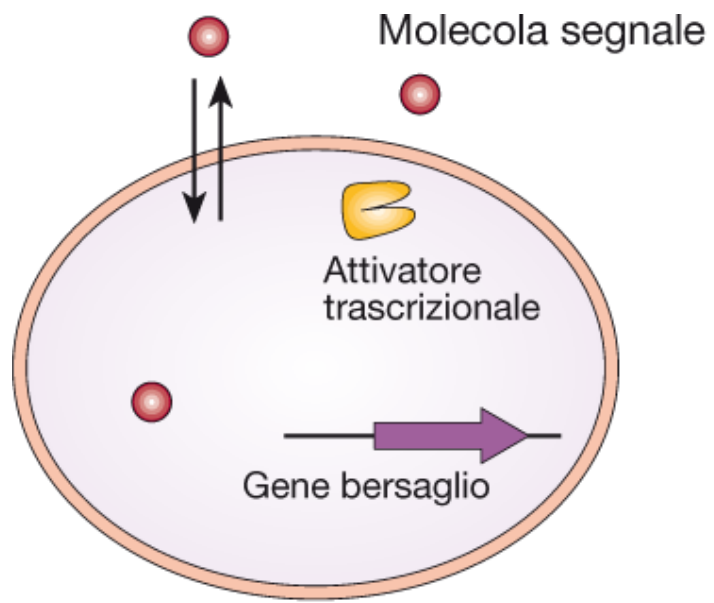
Il sistema del quorum sensing è stato molto studiato in *Vibrio fischeri* un batterio in grado di emettere luminosità ad alta densità cellulare.

QUORUM SENSING

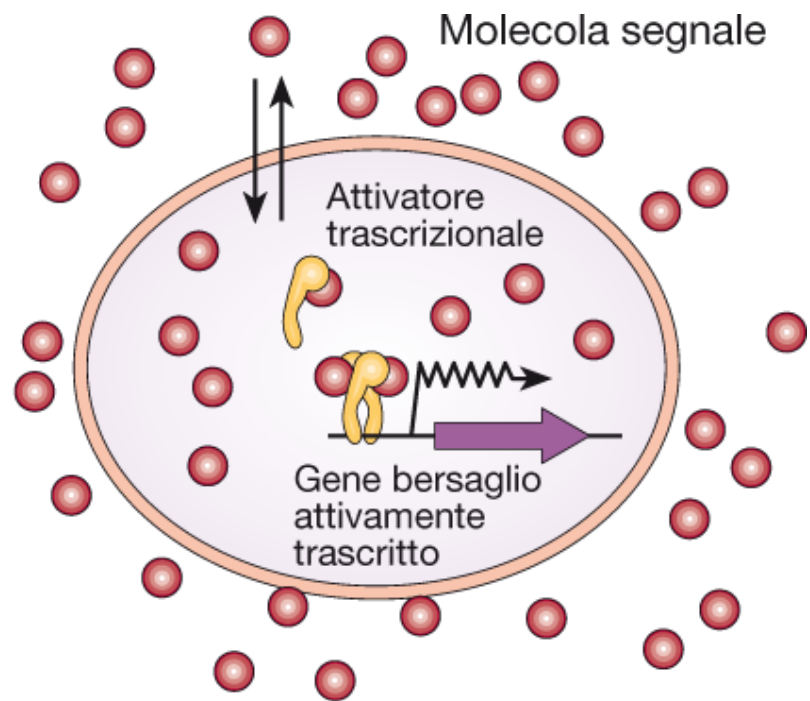
Nel quorum sensing la molecola segnale viene sintetizzata dal batterio stesso che dispone anche del sensore

La secrezione della molecola segnale fa sì che questa raggiunga una concentrazione funzionale solo quando la densità cellulare raggiunge elevati livelli.

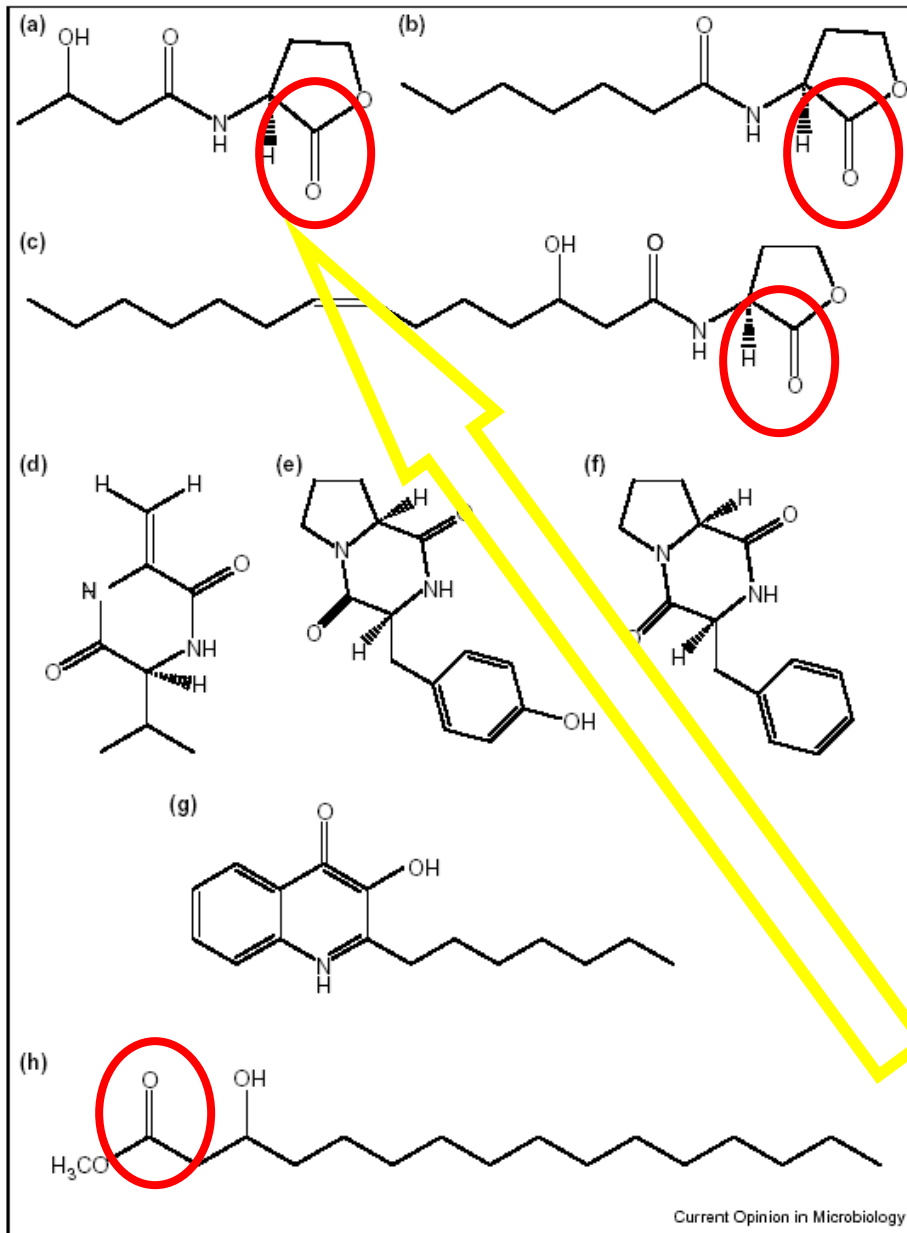




Bassa concentrazione
cellulare



Alta concentrazione
cellulare



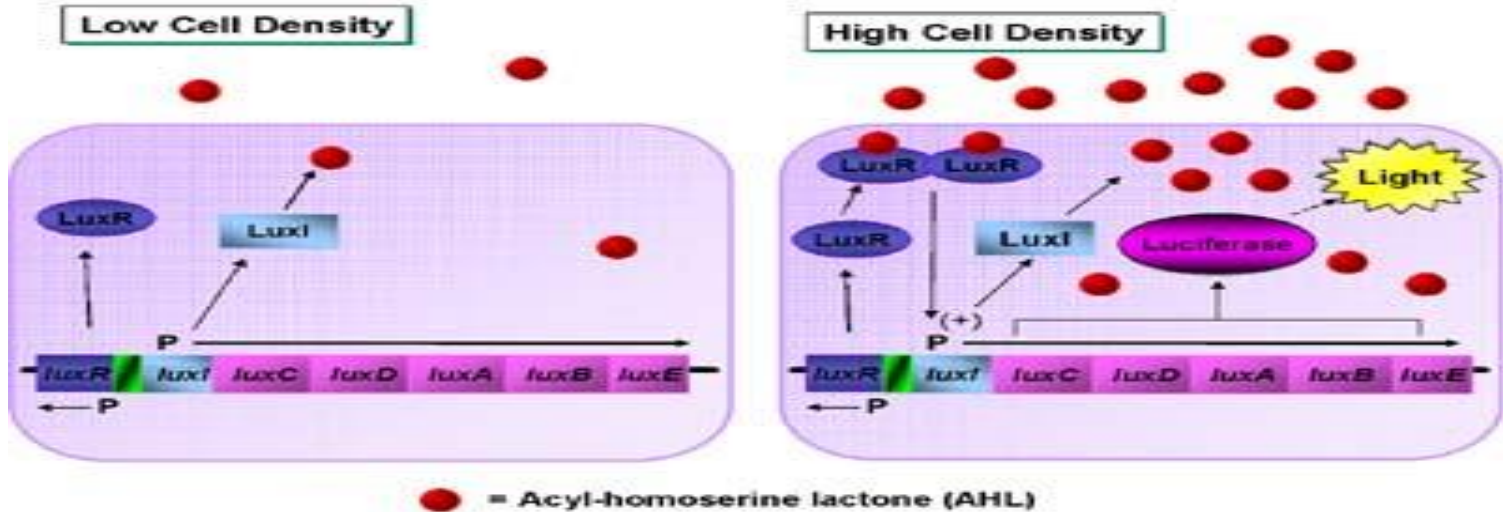
Le molecole segnale tipiche dei gram negativi (*Vibrio fischeri* e *harveyi*) sono molecole organiche caratterizzate spesso da uno o più gruppi lattonici.

La più famosa è la AHL (omoserina-lattone acilato)

Questa molecola diffonde all'esterno della cellula.
La concentrazione diventa elevata solo quando ci sono
altri batteri che la producono nelle vicinanze.
AHL sono induttori che si combinano con un
attivatore.

Operone lux è sotto il controllo di LuxR che è indotto
quando la concentrazione di AHL (sintetizzato dal
gene luxI)diventa elevata.

Quorum Sensing



La sintesi di AHL è catalizzata dalla AHL sintetasi prodotta dal gene luxI.

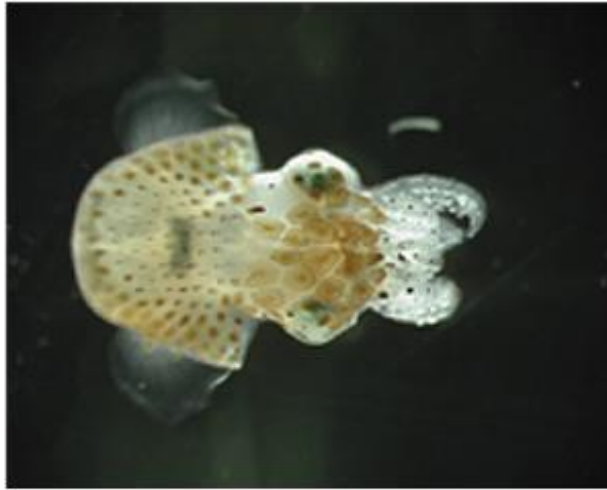
LuxI è regolato positivamente da LuxR , un attivatore trascrizionale attivo in presenza di AHL

In assenza di LuxR-AHL luxI è trascritto a basso livello
AHL diffonde al di fuori della cellula.

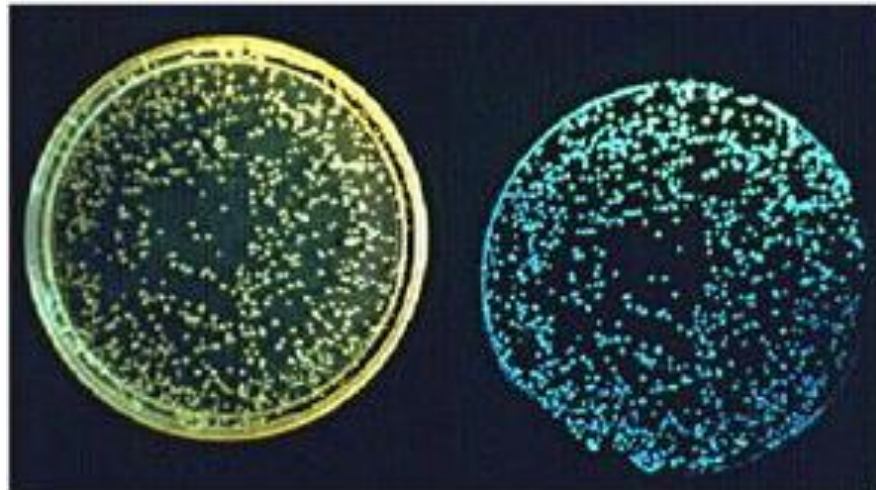
Man mano che la densità cellulare aumenta la concentrazione di AHL prodotta dalla popolazione batterica aumenta.

Se la concentrazione di AHL esterna è superiore a quella interna AHL fluisce verso l'interno della cellula e attiva LuxR provocandone la dimerizzazione.

Il dimero di LuxR-AHL riconosce una sequenza di 20 nucleotidi sul promotore dei geni lux che contiene, oltre a luxI i geni coinvolti nella bioluminescenza, attivandone così la trascrizione da parte della RNA polimerasi

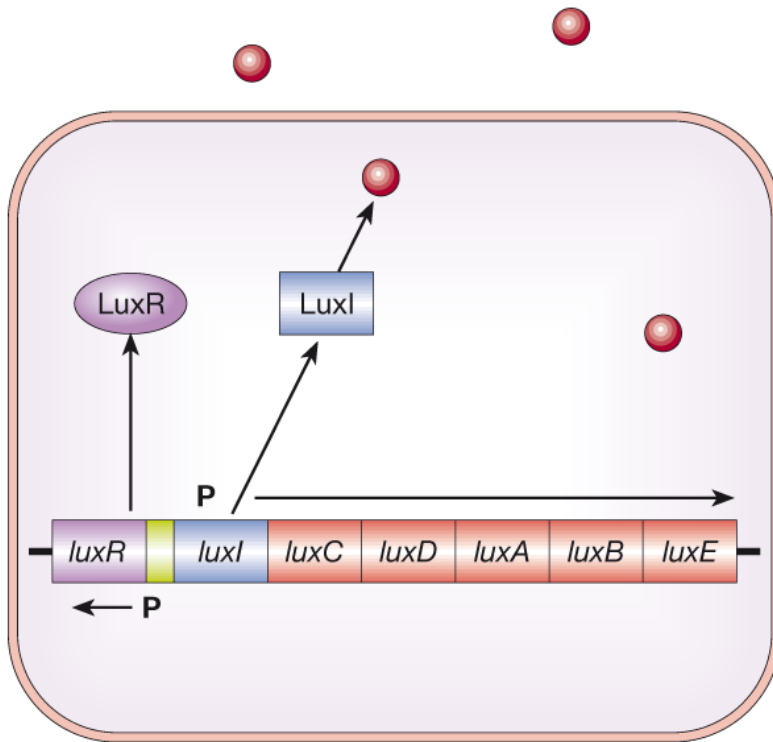


La seppia, *Euprymna scolopes*, è un piccolo invertebrato marino notturno che caccia le sue prede durante la notte in acque torbide.



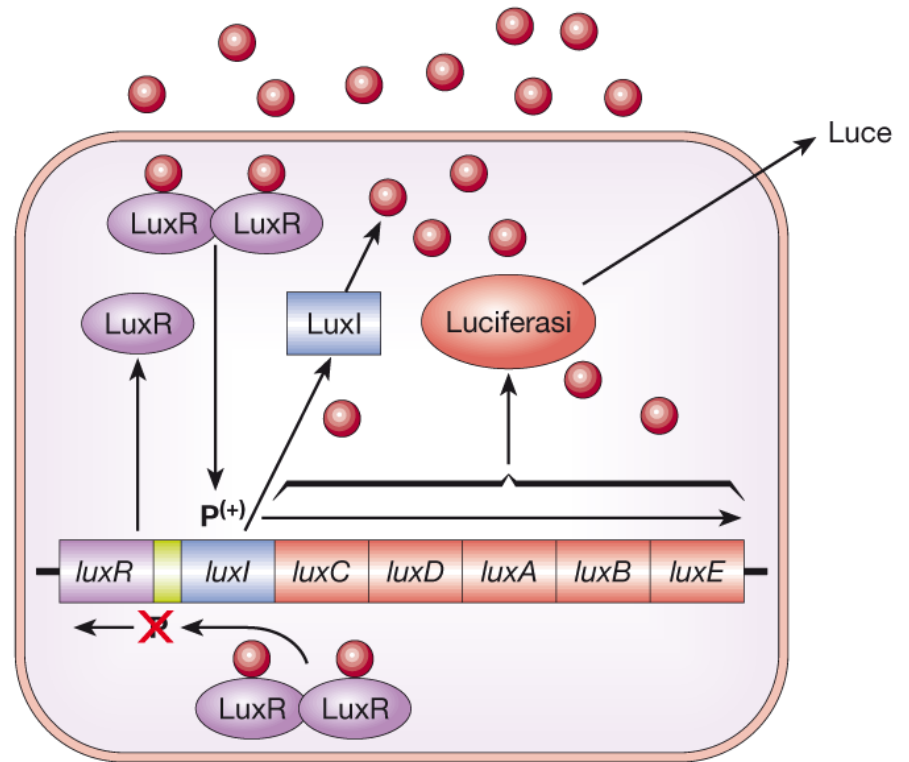
Vibrio fischeri colonies on an agar plate under normal light (left) and in the dark (right), demonstrating bioluminescence. Credit: J. W. Hastings, Harvard University, through E. G. Ruby, University of Hawaii. [1] [↗](#) [↗](#)

Bassa densità cellulare



 = acil-omoserin-lattone

Alta densità cellulare



Il sistema del quorum sensing visione complessiva

