



Biofilm: lo stile di vita pluricellulare dei batteri

Massimiliano Lucidi

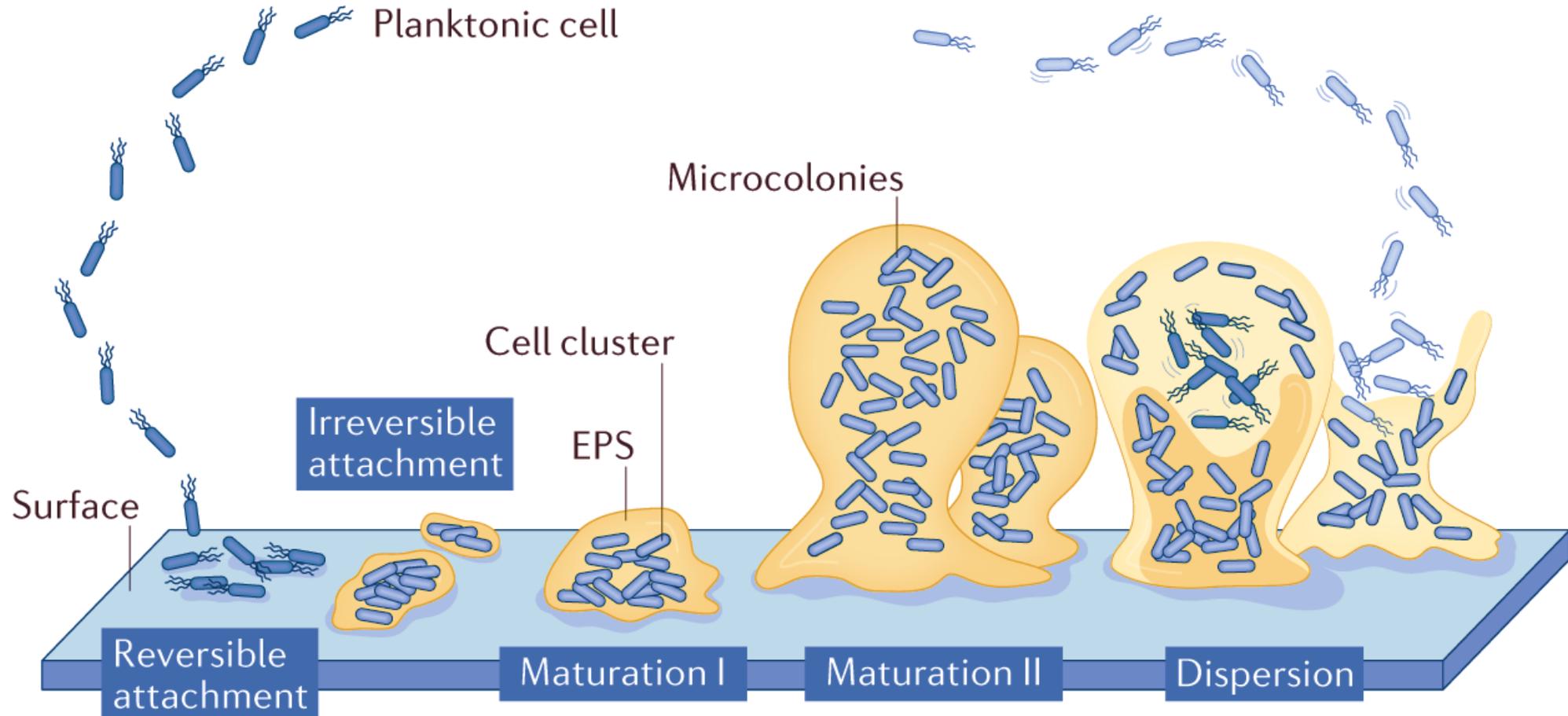
Ricercatore presso il Dipartimento di
Scienze dell'Università degli Studi
RomaTre

Email: massimiliano.lucidi@uniroma3.it

**Il materiale presente in questo documento viene
distribuito esclusivamente per uso personale e a
scopo didattico**

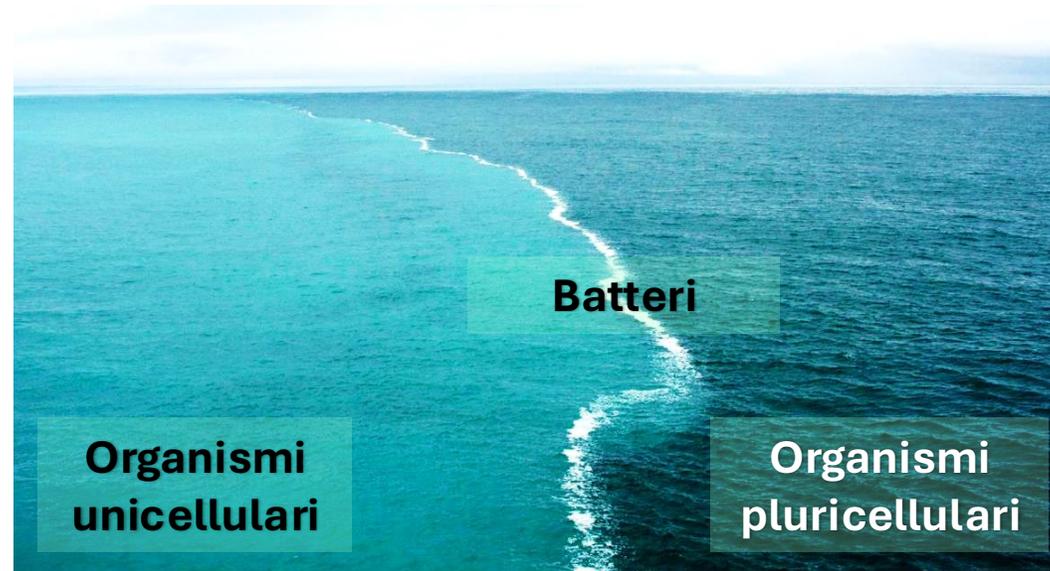
Biofilm: definizione e meccanismi di formazione

Aggregati di microrganismi in cui le cellule sono incorporate in una matrice autogenerata di sostanze polimeriche extracellulari (EPS), aderenti tra loro e/o a una superficie.



Biofilm: definizione e meccanismi di formazione

Aggregati di microrganismi in cui le cellule sono incorporate in una matrice autogenerata di sostanze polimeriche extracellulari (EPS), aderenti tra loro e/o a una superficie.



Punto di incontro tra oceano Pacifico (sx) e Atlantico (dx)

Il biofilm rappresenta una condizione di crescita dei microrganismi unicellulari in cui si osserva un **elevato grado di differenziamento**, in cui **alcune cellule si specializzano** in specifiche funzioni. Pertanto, quando una cellula è presente all'interno di un biofilm, è da considerarsi parti di un **olobionte**.

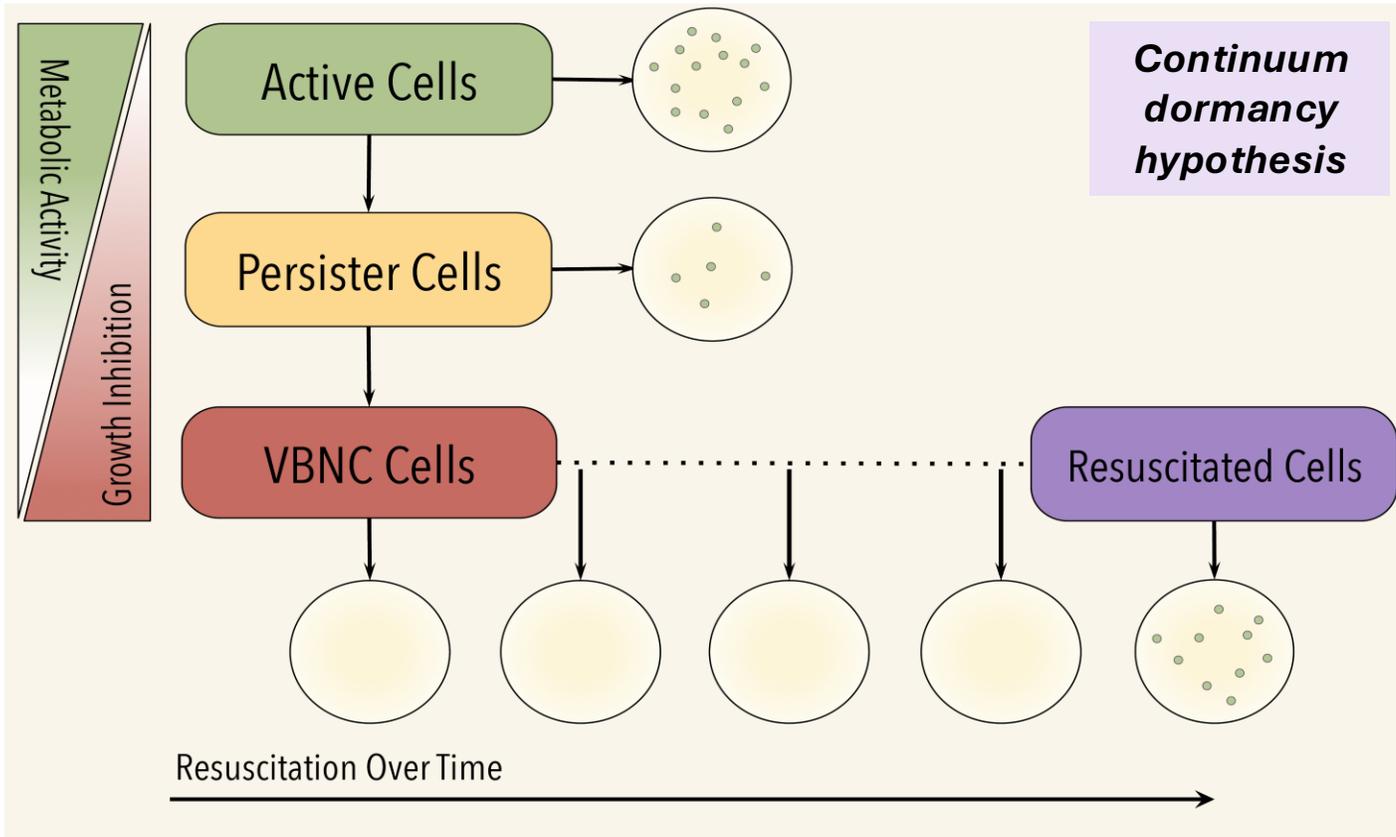
Esempi di differenziamento batterico nel biofilm

«Non importa come sei nato, importa quello che diventi»
Harry Potter e il calice di fuoco



- **Autolisi** (morte cellulare programmata)
- **Dispersione mediante appendici** (pili e flagelli)
- **Incremento o diminuzione dell'attività metabolica**
- **Entrata in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC)**

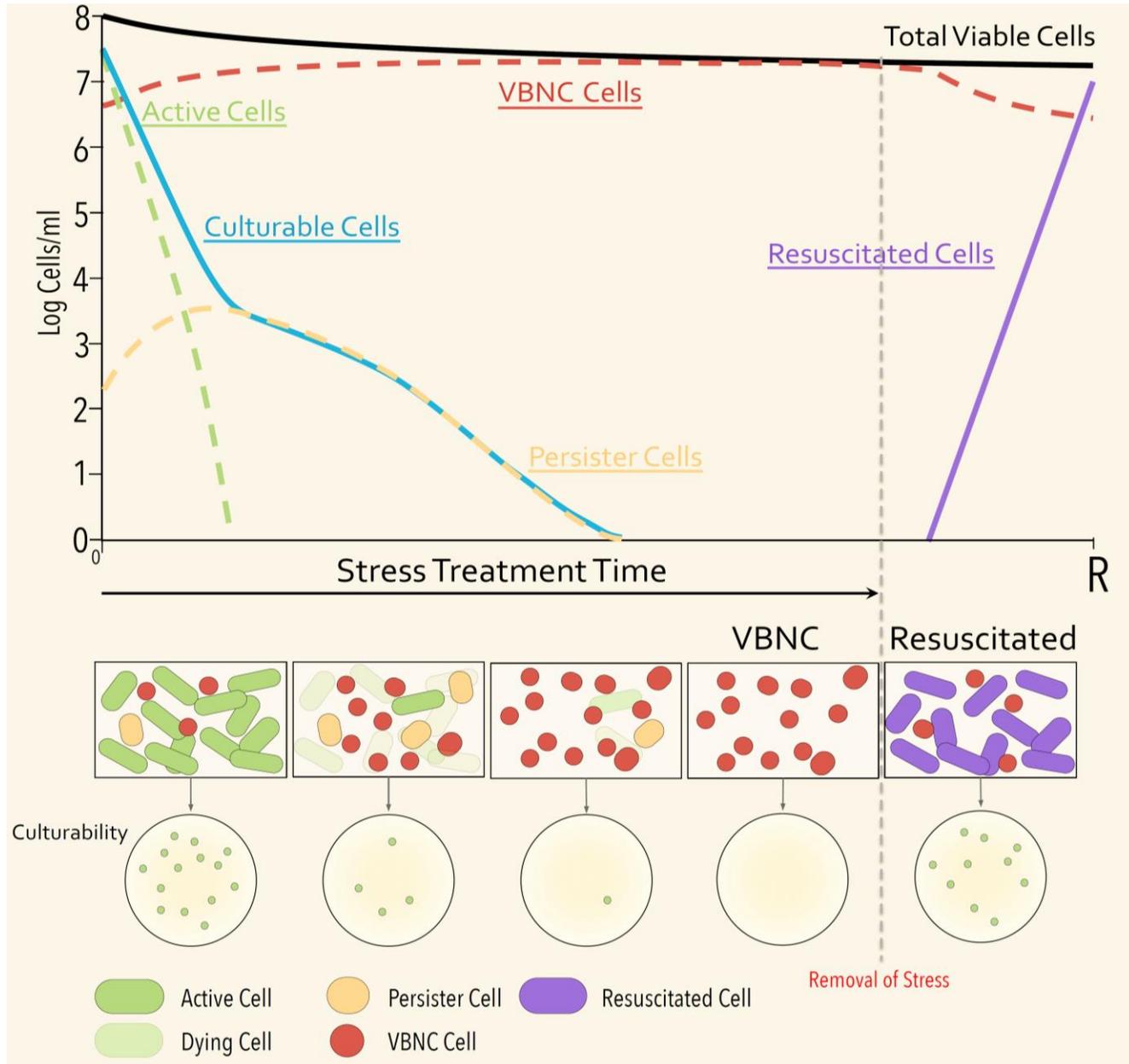
Esempi di differenziamento batterico nel biofilm: lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC)



Le cellule batteriche **possono entrare in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) in condizioni ambientali sfavorevoli**. Quando la fonte di stress viene eliminata e le condizioni ambientali migliorano (ad es. in presenza di nutrienti), **lo stato VBNC può essere revertito**. Questo fenomeno prende il nome di «**resuscitation**». Le cellule resuscitate recuperano la coltivabilità.



Esempi di differenziamento batterico nel biofilm: lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC)



Cellule attive

cellule in grado di dividersi (**clonogeniche**) e, dunque, in grado di formare una colonia su terreno solido (**coltivabili**).

Cellule persistenti

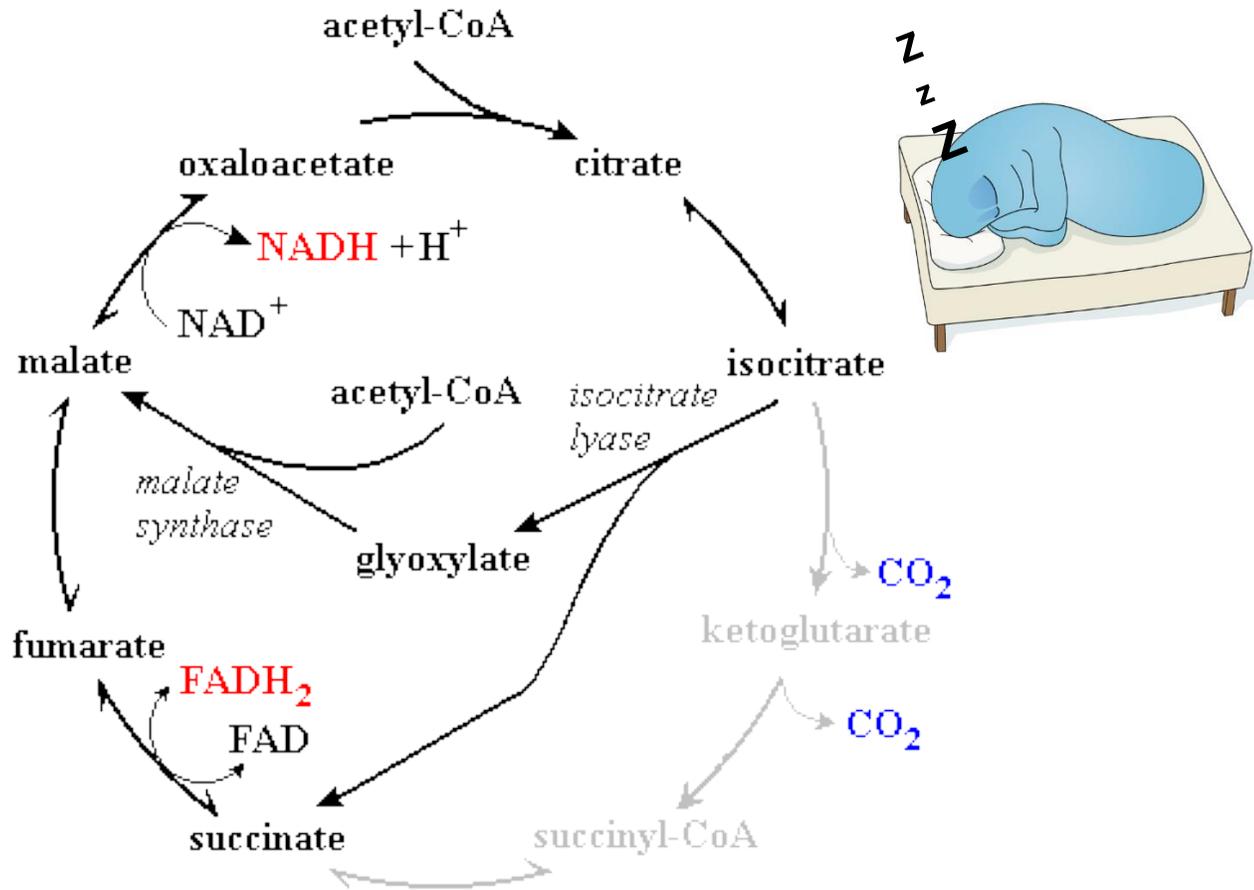
cellule **coltivabili** che, rallentando il proprio metabolismo, risultano essere in grado di sopravvivere ad alcune fonti di stress.

Cellule VBNC

cellule **non coltivabili ma vitali**. Recuperano la coltivabilità quando viene eliminata la fonte dello stress. Questo processo è noto come **resuscitation**.

Cellule dormienti

Esempi di differenziamento batterico nel biofilm: lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC)



Le cellule batteriche entrano in uno stato non coltivabile attivando lo **shunt del gliossilato**. Questo pathway rappresenta un vero e proprio **cortocircuito del ciclo Krebs**, rallentando l'intero metabolismo.

Cellule attive

cellule in grado di dividersi (**clonogeniche**) e, dunque, in grado di formare una colonia su terreno solido (**coltivabili**).

Cellule persistenti

cellule **coltivabili** che, rallentando il proprio metabolismo, risultano essere in grado di sopravvivere ad alcune fonti di stress.

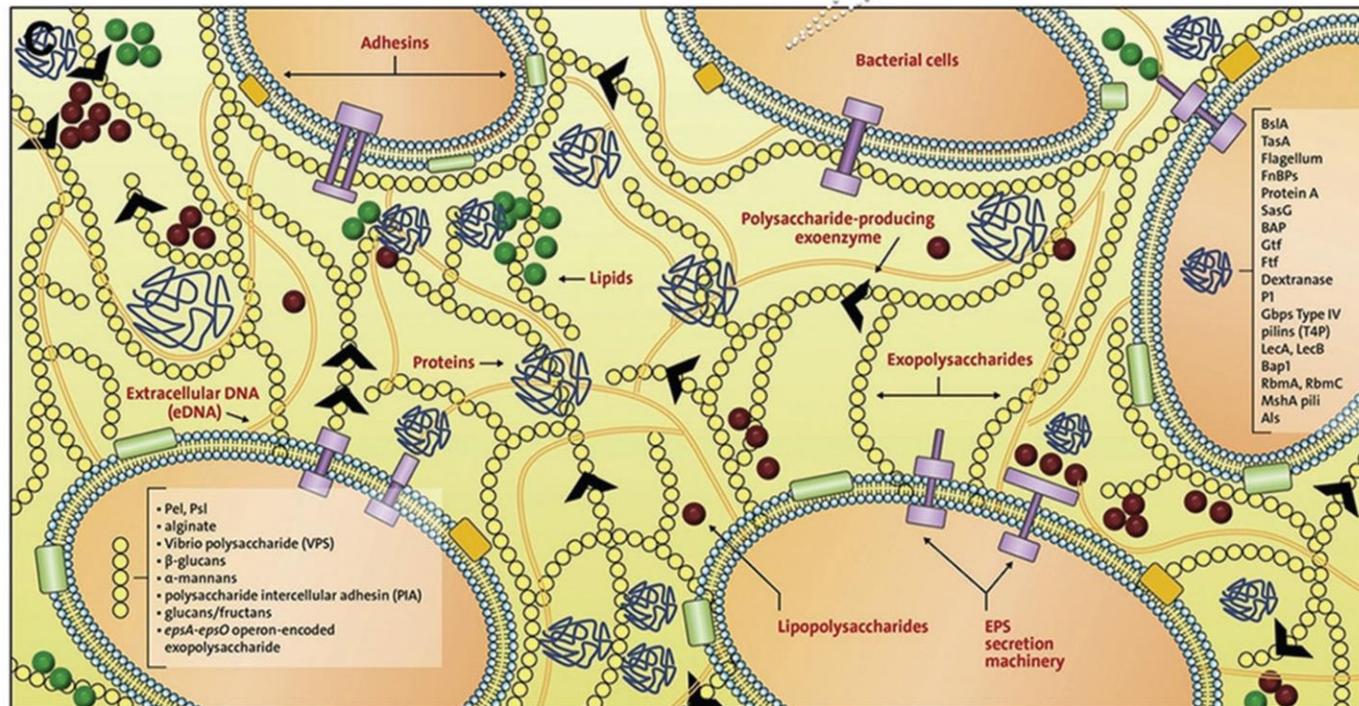
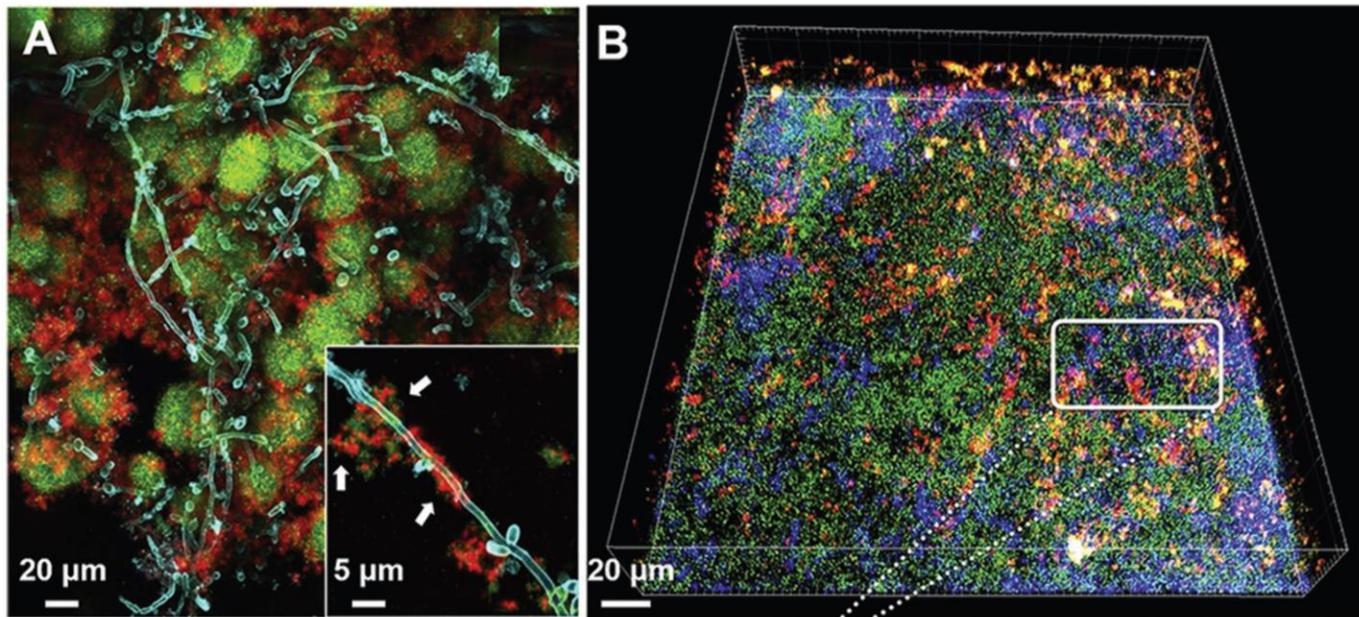
Cellule VBNC

cellule **non coltivabili ma vitali**. Recuperano la coltivabilità quando viene eliminata la fonte dello stress. Questo processo è noto come **resuscitation**.

Cellule dormienti

Componenti strutturali del biofilm

- **Cellule** (spesso appartenenti a specie diverse)
- **Acidi nucleici** (provenienti da cellule morte)
- **Proteine**
- **Esopolisaccaridi (EPS)**
- **Lipopolisaccaridi (LPS)**
- **Lipidi**
- **Batteriofagi**
- **Minerali e altre componenti inorganiche**



A) Biofilm dentale sviluppato all'interno della matrice extracellulare (in rosso); l'ingrandimento mostra le interazioni tra *Streptococcus mutans* (verde) e *Candida albicans* (ciano) mediate dalla matrice (frecche bianche). **B)** Ricostruzione 3D di immagini di microscopia confocale di biofilm orali dopo colorazione della matrice. **C)** Rappresentazione schematica dei principali componenti della matrice del biofilm e delle loro funzioni. La matrice del biofilm, composta da una vasta gamma di biomolecole funzionali, funge da impalcatura per il supporto strutturale e da ambiente dinamico che fornisce segnali chimici e fisici variabili alle comunità microbiche, promuovendo uno stile di vita da biofilm.

Dove si sviluppano i biofilm?

- **Suolo e ambienti acquatici:** sulle rocce nei fiumi e nelle sorgenti termali.
- **Cibo:** su differenti matrici alimentari.
- **Dispositivi medici:** su impianti come le valvole cardiache e nei cateteri.
- **Tessuti viventi:** sullo smalto dei denti, nei polmoni, nell'orecchio medio, nelle vie respiratorie e gastrointestinali, e sulle superfici mucose come gli occhi.
- **Altre superfici abiotici:** in aree umide come cucine e bagni, e nei sistemi idrici domestici come i condizionatori d'aria.



Biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* causa di una grave cheratocongiuntivite. Il ceppo è stato isolato da un lavabo (doi: 10.1186/1756-0500-6-245)



Biofilm di *Klebsiella pneumoniae* su catetere urinario (doi: 10.3390/pathogens11010042)



Biofilm polimicrobico in un lavandino di ospedale (doi: 10.1016/j.ajic.2019.04.048)

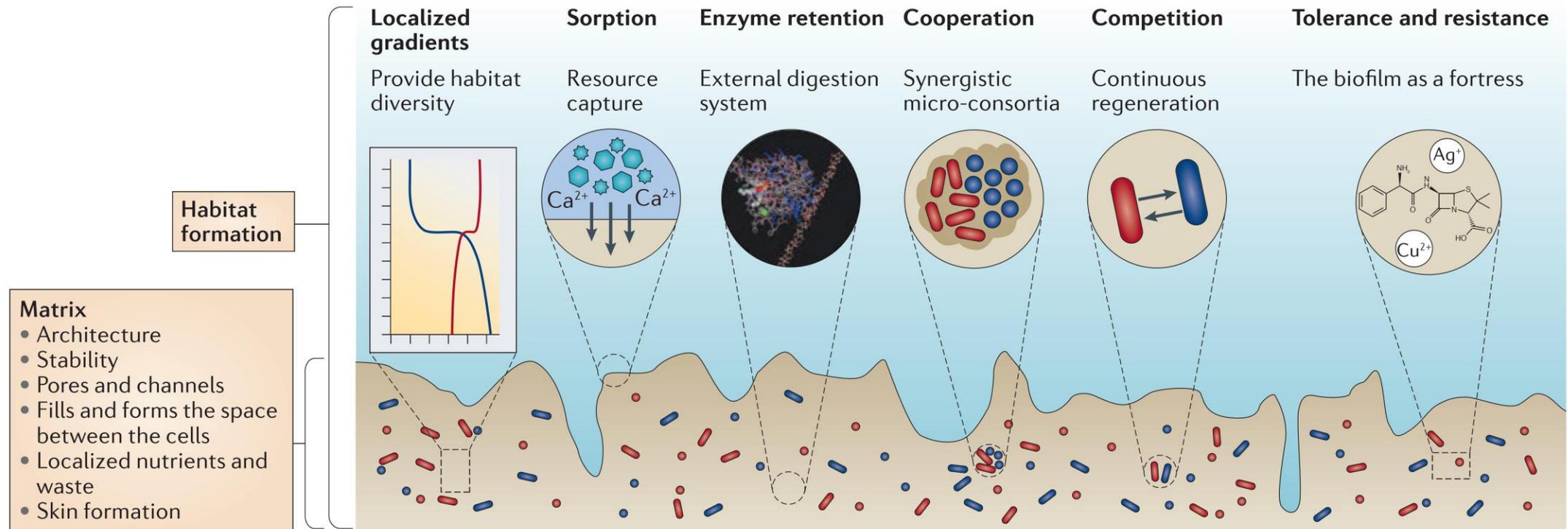


Slime verde responsabile di fenomeni *off-odor*, *off-colour* e *off-flavour* delle carni ad opera di *specific spoilage organisms* (SSO)



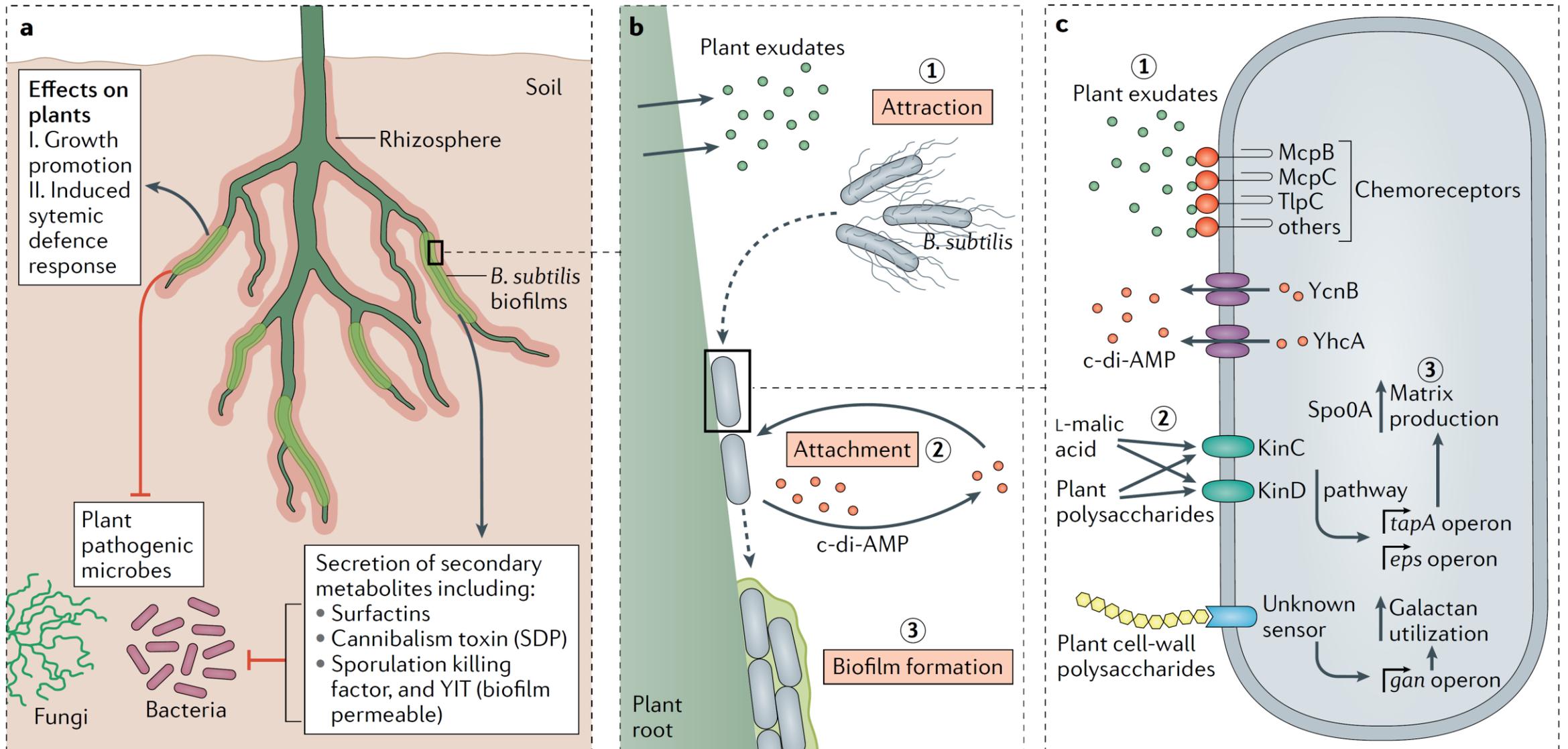
Il tartaro è un biofilm polimicrobico formato da diversi agenti cariogeni tra cui *Streptococcus mutans*

Ruoli ecologici: i biofilm come plasmatori di habitat

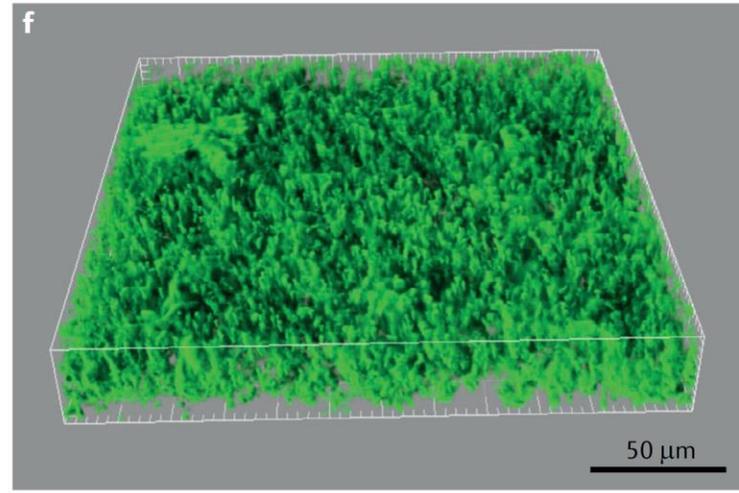
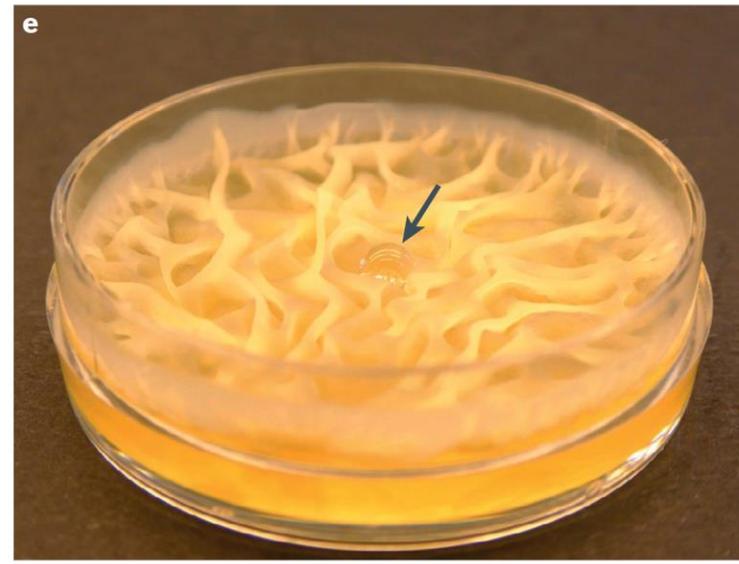
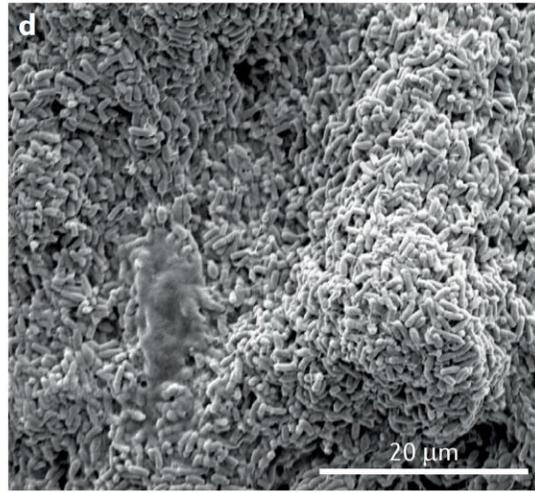
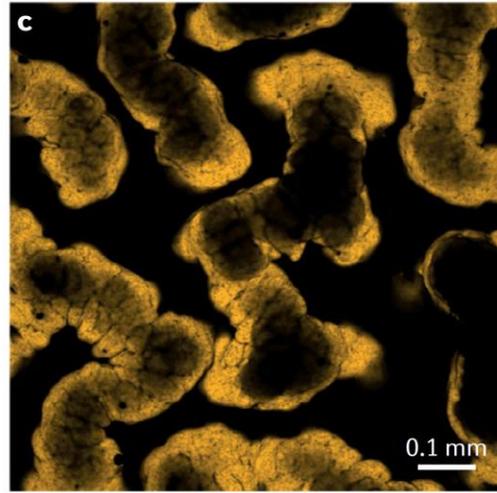
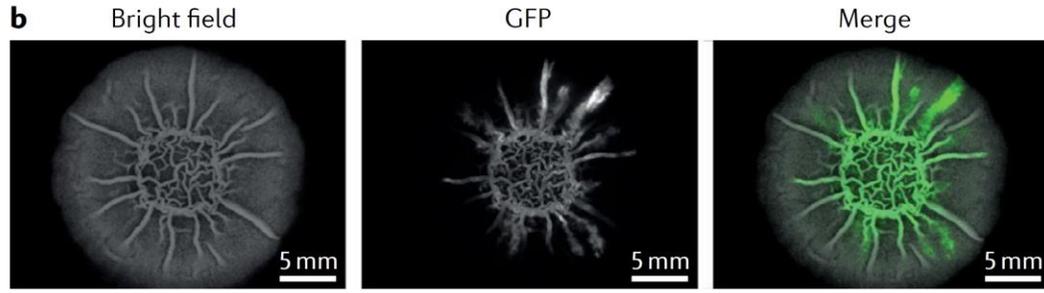
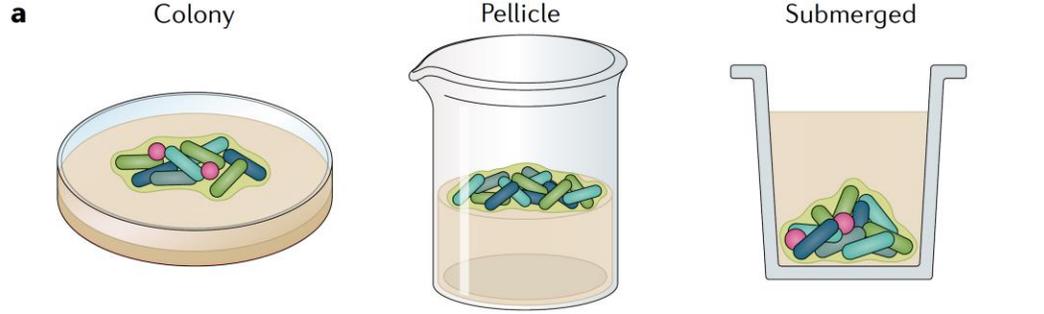


Le cellule batteriche nei biofilm possono essere considerate **formatori di habitat**, grazie alla produzione di una matrice che costituisce la base fisica del biofilm. I **nutrienti e altre molecole possono essere intrappolati** sia per adsorbimento alle molecole EPS sia nei pori e nei canali della matrice, mentre la formazione di una pellicola da parte di molecole EPS idrofobe aumenta la capacità del biofilm di **sopravvivere alla disidratazione**. I biofilm acquisiscono diverse proprietà emergenti (proprietà che non sono prevedibili studiando le singole cellule batteriche in forma planctonica) grazie alla matrice. Queste proprietà includono: **gradienti localizzati** che creano diversità di habitat, **ritenzione di enzimi che fornisce capacità digestive**, **interazioni sociali**, e la capacità di **sopravvivere all'esposizione di composti antibatterici attraverso tolleranza e/o resistenza**.

Ruoli ecologici: i biofilm come plasmatori di habitat



Tipologie di biofilm che si possono studiare *in vitro*



a) Schema delle tre modalità di crescita del biofilm di *Bacillus subtilis*: colonia, pellicola superficiale (*pellicle*) e biofilm sommerso aderente alla superficie. **b)** Biofilm di colonia di 48 ore formato da un ceppo che esprime costitutivamente la proteina fluorescente verde (GFP). **c)** Immagine di microscopia confocale della regione centrale rugosa del biofilm in **b**. **d)** Immagine al SEM di cellule individuali di *B. subtilis* in un biofilm. **e)** Biofilm di pellicola all'interfaccia aria-liquido. Una goccia d'acqua posizionata sulla pellicola nella regione centrale (freccia) rivela l'idrofobicità del biofilm. **f)** Immagine di microscopia confocale di un biofilm sommerso formato da *B. subtilis* che esprime costitutivamente la GFP.

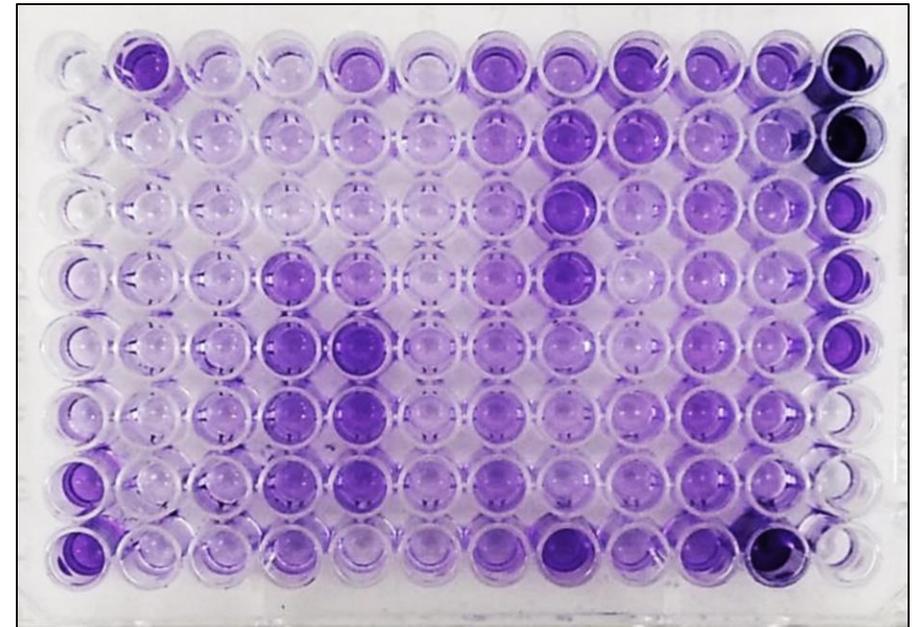
Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: il saggio del cristal violetto

È il metodo più comunemente impiegato per lo studio del biofilm in condizioni di adesione (***submerged***).

La procedura si articola nei seguenti passaggi:

- 1) **Crescita del biofilm** della specie in esame all'interno di micropiastre;
- 2) **Rimozione della fase planctonica** (cellule non adese);
- 3) **Colorazione** delle cellule aderenti mediante **cristal violetto**;
- 4) Eliminazione dell'eccesso di colorante attraverso ripetuti **lavaggi** con acqua sterile o soluzione fisiologica (NaCl 0,9%);
- 5) **Asciugatura** all'aria della micropiastre;
- 6) **Solubilizzazione** del colorante legato al biofilm mediante solventi organici, come etanolo o acetone;
- 7) **Lettura spettrofotometrica** dell'assorbanza (es. a 595 nm), per quantificare l'intensità della colorazione viola, proporzionale alla biomassa del biofilm formato.

Esempio di micropiastre a 96 pozzetti colorata con il metodo del cristal violetto, utilizzata per la crescita di biofilm di diversi ceppi batterici.



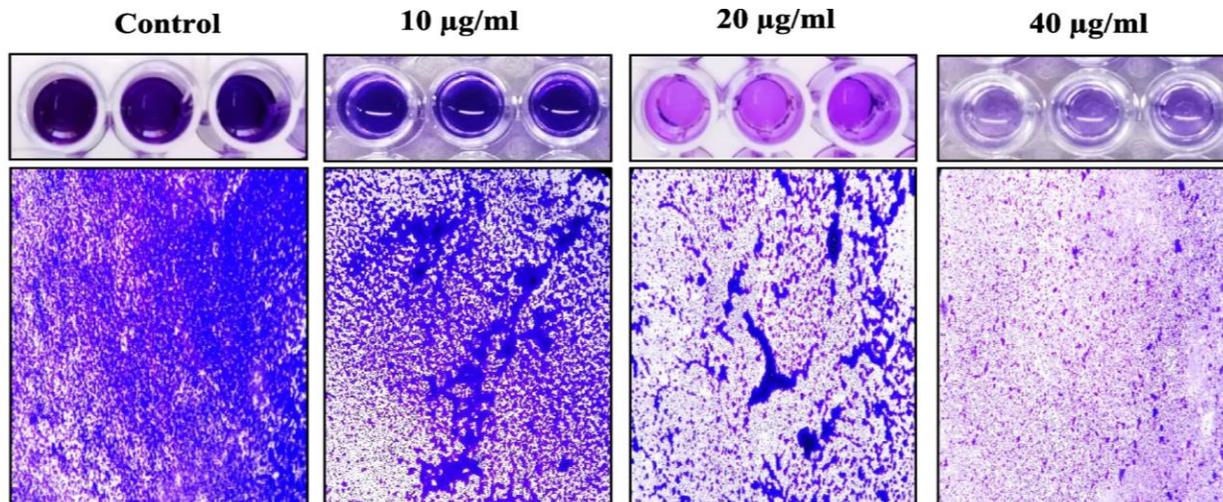
Sapreste riconoscere i ceppi iperproduttori di biofilm e distinguerli da quelli che ne producono poco?

Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: il saggio del cristal violetto

Esempi di applicazioni:

- **Classificazione dei ceppi batterici in base alla loro capacità di formare biofilm**, distinguendo tra ipo- e iper-produttori;
- Valutazione dell'efficacia di composti antimicrobici nell'**inibire la formazione** del biofilm o nel **disgregare** biofilm già formati (*disruption*).

Concentrazione di composto in grado di inibire la
formazione del biofilm



Vantaggi:

Metodo ad **alta processività** (*high-throughput*), **economico e rapido**.



Svantaggi:

Alcuni microrganismi sono in grado di formare sia un **biofilm aderente alla superficie** che una **pellicola** (*pellicle*) flottante. Tuttavia, quest'ultima **viene rimossa** prima della quantificazione e non viene inclusa nel calcolo della biomassa totale.



Pozzetti di una micropiastra in cui sono stati cresciuti dei biofilm di *Staphylococcus aureus* in presenza di differenti concentrazioni di un composto dotato di attività antibatterica



I vari pozzetti sono stati poi osservati mediante microscopia ottica

Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: il saggio del cristal violetto utilizzando il Calgary biofilm device

Il Calgary biofilm device (CBD) è un **coperchio con 96 pin** (pinnacoli), ognuno dei quali si immerge in un pozzetto e funge da superficie solida per la crescita del biofilm



Vantaggi:

Distinzione chiara tra fase planctonica e biofilm: il biofilm si sviluppa solo sui pin e può essere facilmente separato dalla fase liquida.

Standardizzazione elevata: consente una **crescita uniforme del biofilm** su supporti identici, migliorando la riproducibilità dei risultati



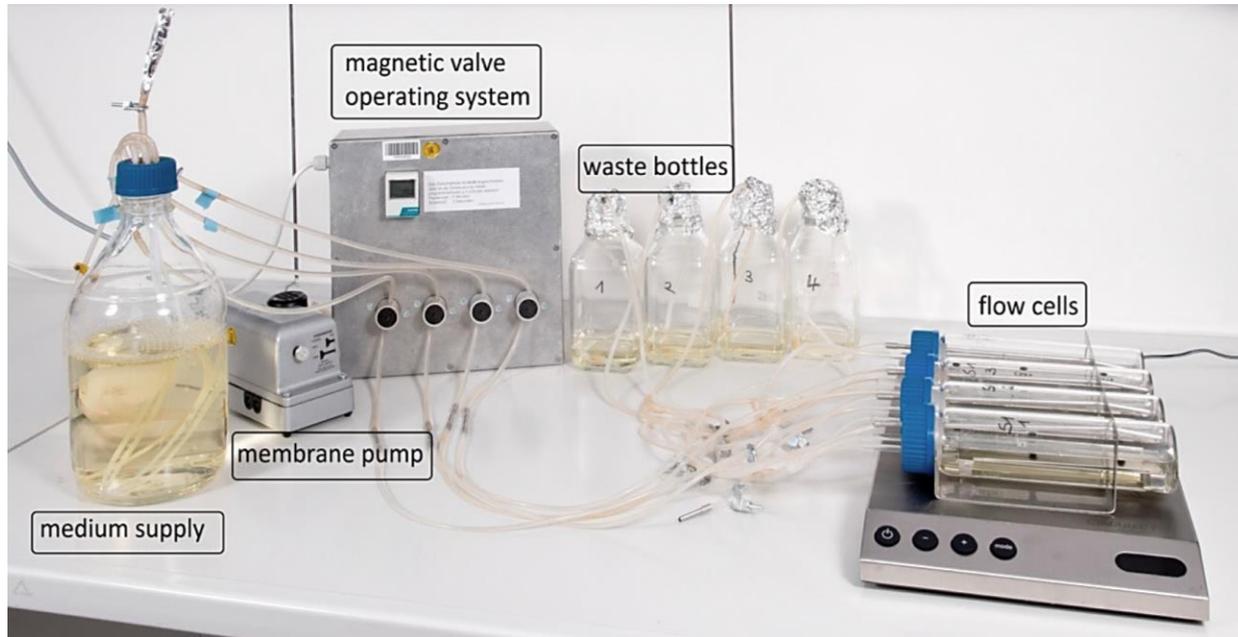
Svantaggi:

Costi più elevati rispetto a metodi tradizionali come il saggio con cristal violetto.

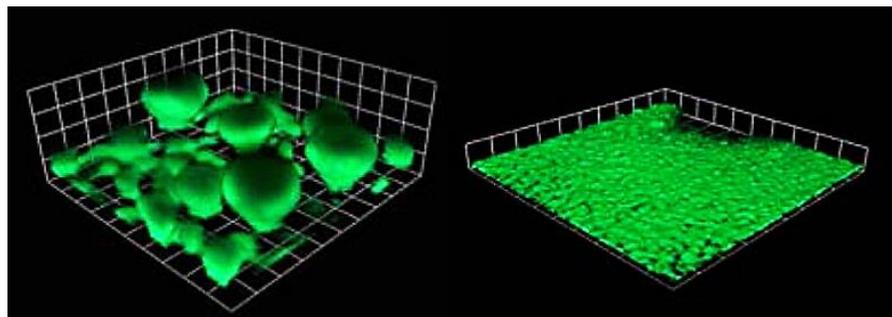
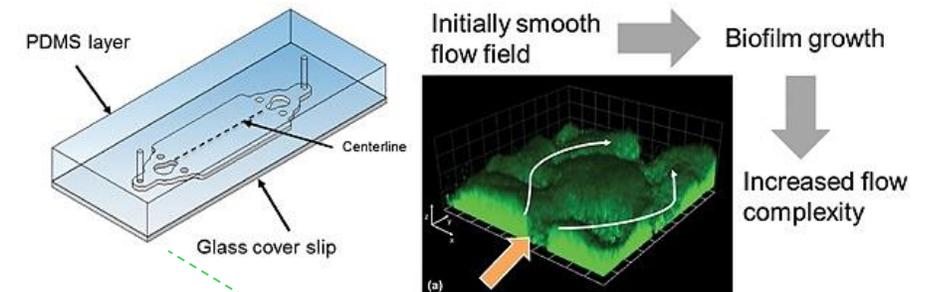
Tipo di superficie limitato: il **biofilm cresce solo su materiali plastici specifici** (i pin), che potrebbero non riflettere condizioni reali (es. tessuti o dispositivi medici).

Non adatto a tutti i microrganismi: **alcune specie batteriche non formano biofilm efficacemente su questo supporto.**

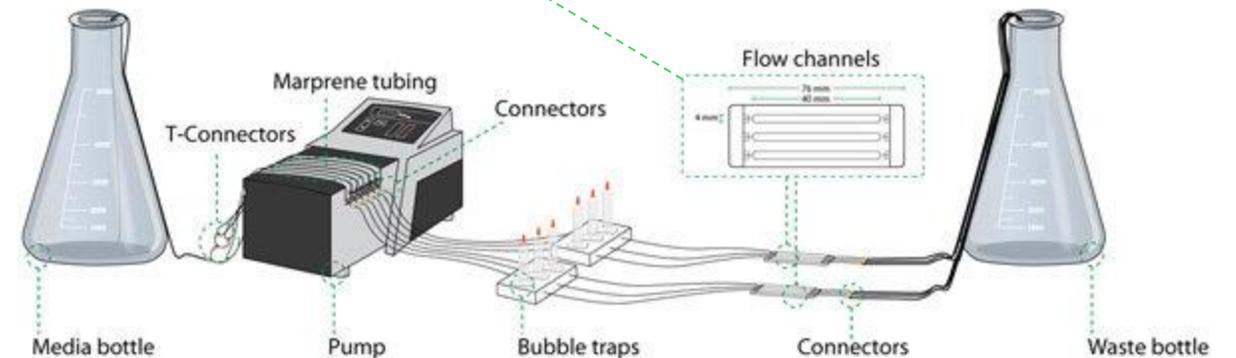
Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: le flow-chamber o flow cell



Questi sistemi permettono di **simulare un passaggio continuo di nutrienti**, permettendo il rimodellamento del biofilm che normalmente avverrebbe in natura.



Biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* visualizzato mediante microscopia confocale cresciuto in una flow chamber (sx) e in una micropiastre in statico (dx)



Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: quantificazione delle microcolonie mediante processamento di immagini di microscopia ottica

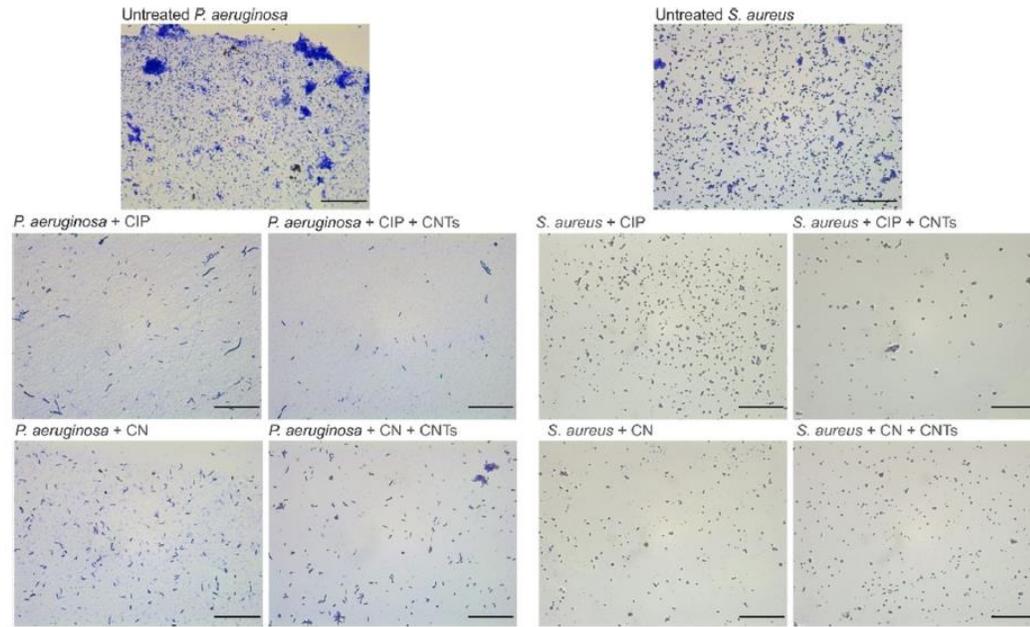


Figure 5. Brightfield microscopy images of *P. aeruginosa* and *S. aureus* planktonic cells treated with CNTs, alone or in combination with CIP or CN. Untreated samples were used as a control. Scale bars: 40 μm .

Vantaggi:

Permette di studiare la formazione del biofilm sia sulla fase sessile che su quella planctonica. Stessi vantaggi del metodo del cristal violetto.

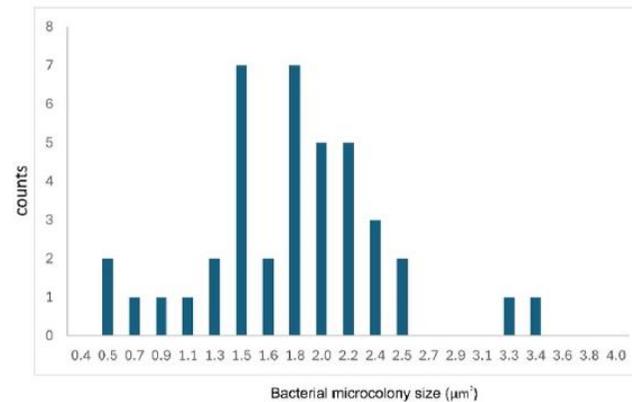
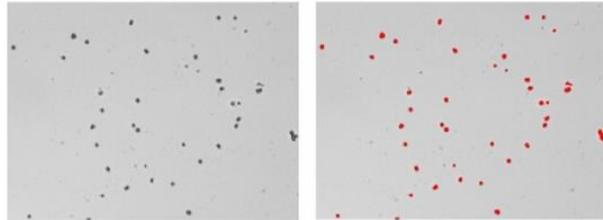


Svantaggi:

Metodo non ancora consolidato.

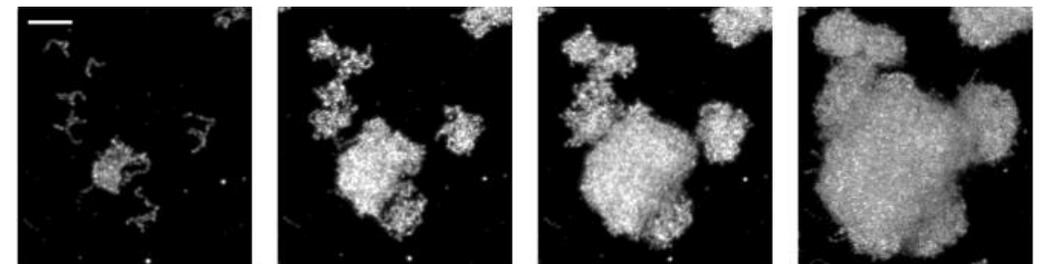


1. BM image converted to 8-bit grayscale 2. segmentation by thresholding



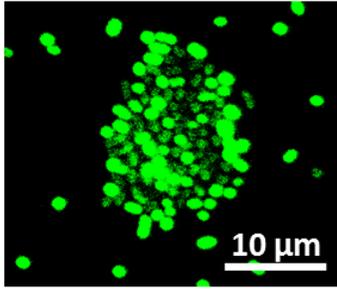
3. binarization to discard background 4. bacterial colony counting and dimension extraction

Figure 6. Workflow for quantitative evaluation of brightfield microscopy (BM) images collected on *P. aeruginosa* and *S. aureus* samples in the evaluated configurations.

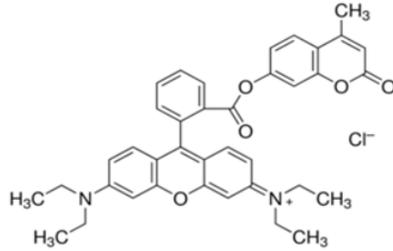


Processo di formazione di microcolonie fluttuanti o flottanti (*floating microcolonies*) di *P. aeruginosa*

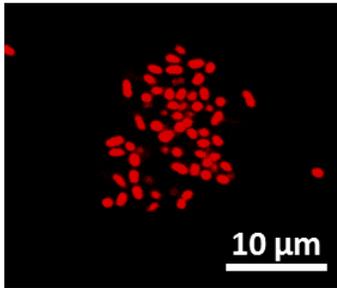
Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: la colorazione LIVE/DEAD per la determinazione della vitalità dei biofilm



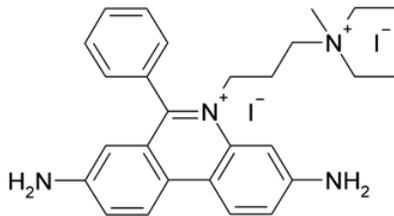
SYTO 9



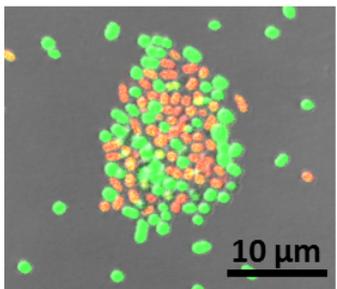
Colorante in grado di permeare le membrane di tutte le cellule, indipendentemente dalla vitalità



Ioduro di propidio (PI)



Colorante non in grado di penetrare le membrane. Penetra solo se presenti discontinuità della membrana



Verde + rosso = giallo
(**cellule con membrana danneggiata**)
Rosso= **cellule estremamente danneggiate**



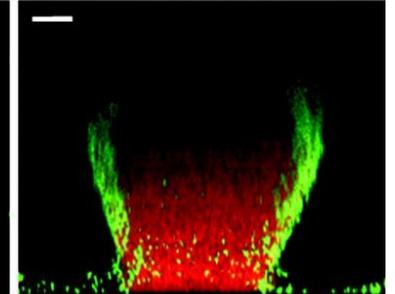
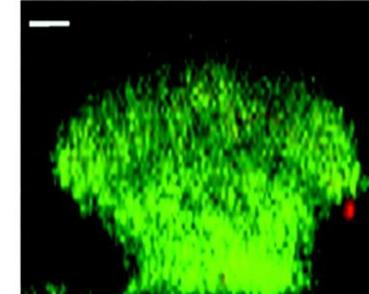
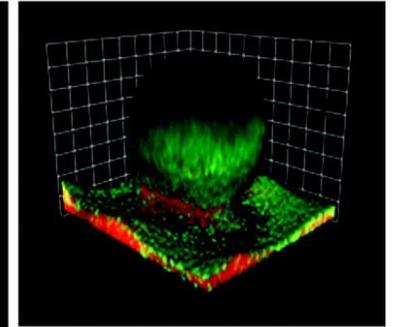
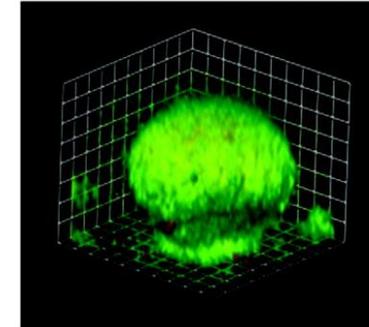
LIVE/DEAD ratio

Green cells

Red cells

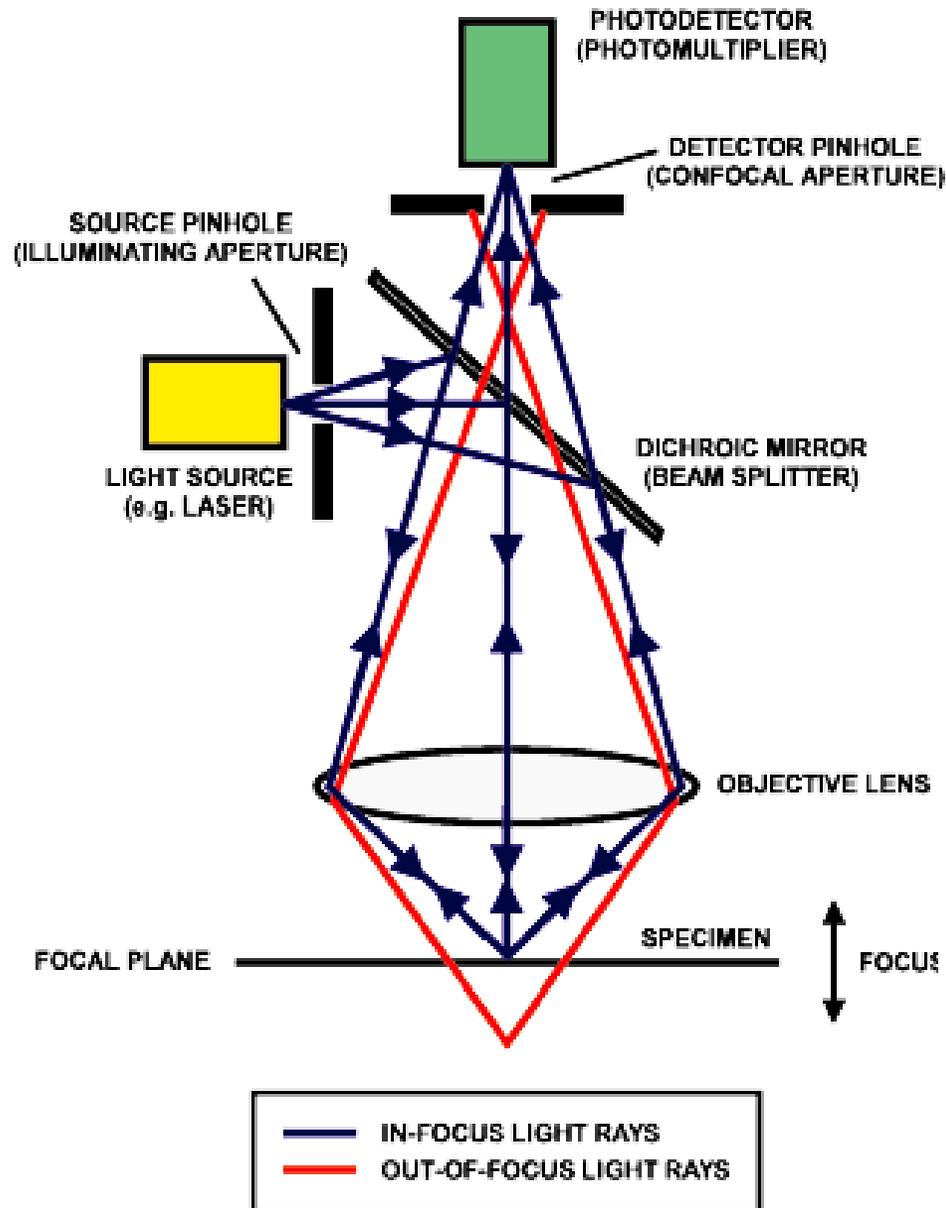
-EDTA

+EDTA



Biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* visualizzato mediante microscopia confocale non trattato (sx) e trattato con il chelante EDTA (dx) e poi colorato con la combinazione di SYTO 9 e PI.

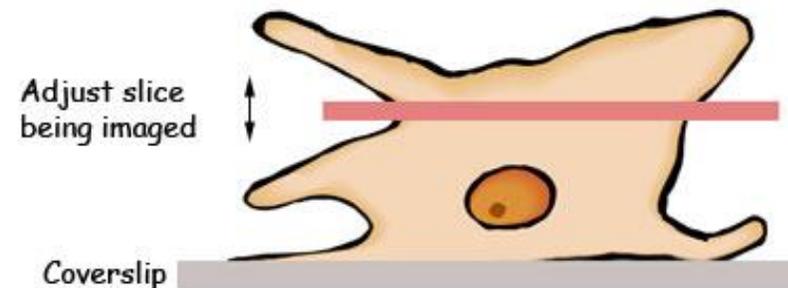
Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: La microscopia confocale



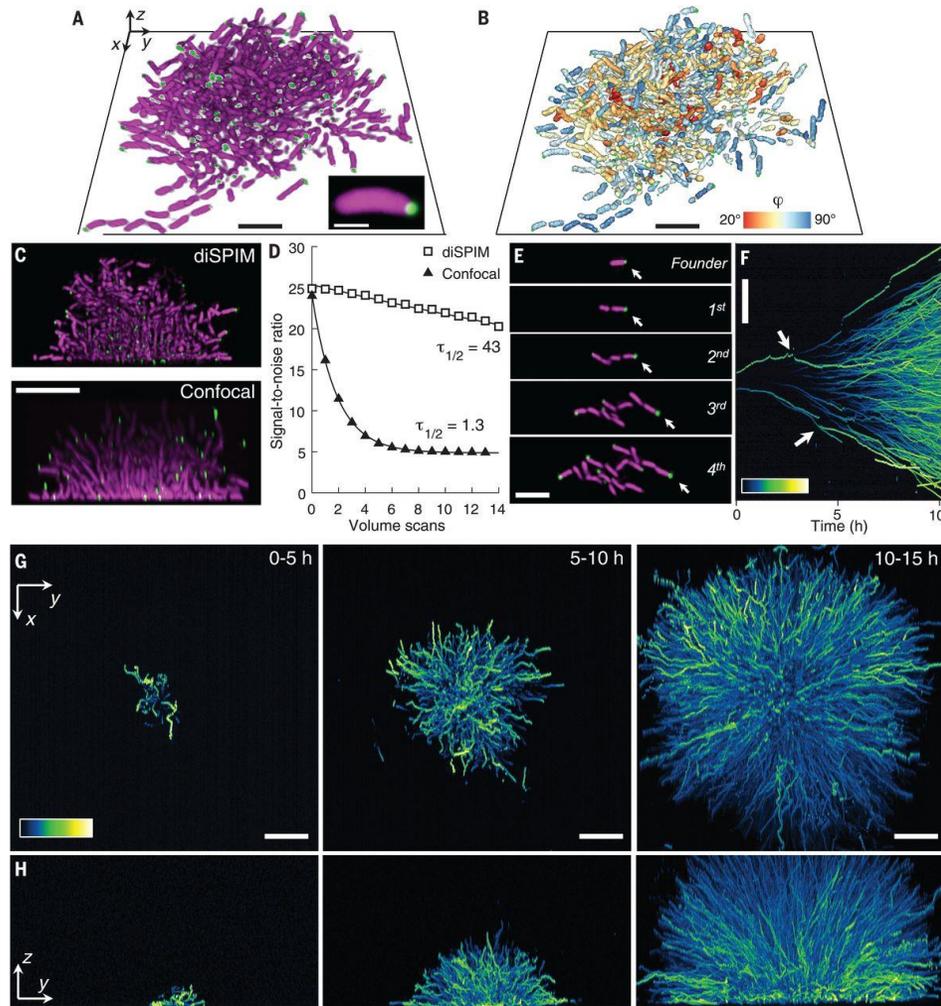
Il *pinhole* è un **filtro spaziale regolabile** (diaframma) posto davanti al rivelatore che consente di acquisire **solo la luce proveniente dal piano focale, bloccando la fluorescenza fuori fuoco**. Questo permette di ottenere immagini nitide, particolarmente utili nei campioni spessi come i biofilm.

La dimensione del *pinhole* influisce sulla luminosità (cioè sulla quantità di luce raccolta), sullo spessore ottico della sezione e sulla risoluzione. Un pinhole più aperto **aumenta la luminosità, ma riduce la risoluzione**.

Questa tecnologia ha permesso di ottenere **immagini più nitide** dei biofilm batterici e di ottenere **informazioni volumetriche** su di essi.



Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: esempi di applicazione della microscopia confocale (I)

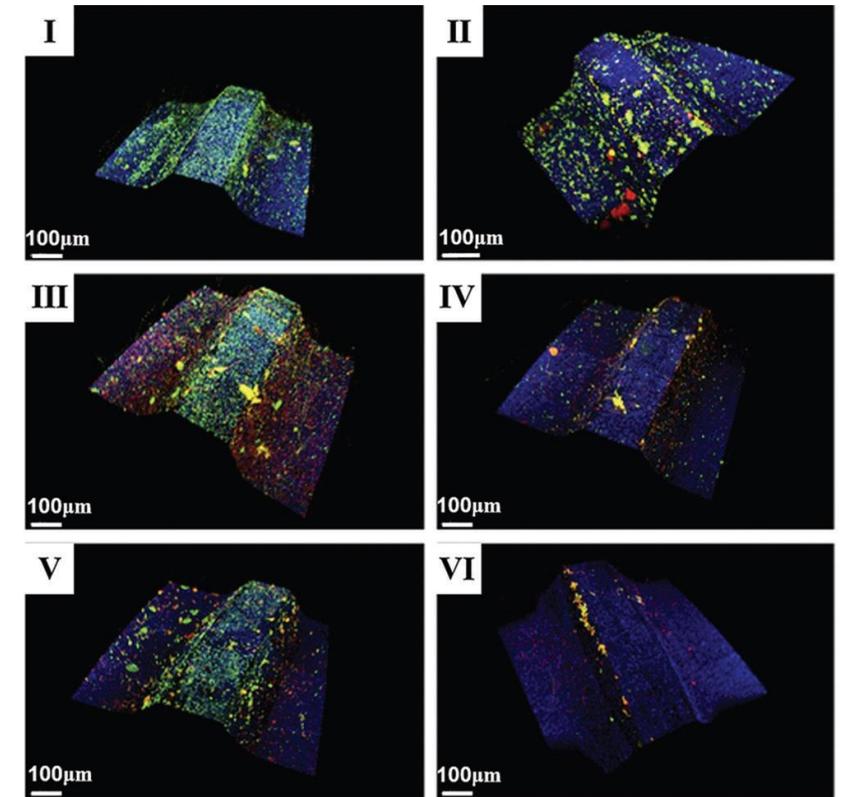


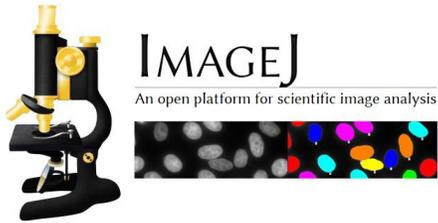
Studio delle traiettorie di movimento di cellule di *Vibrio cholerae* all'interno del biofilm (doi: 10.1126/science.abb8501)



Immagine di sinistra: fotografia che mostra uno stent in metacrilato di 10 x 7 mm per supportare gli impianti dentali.

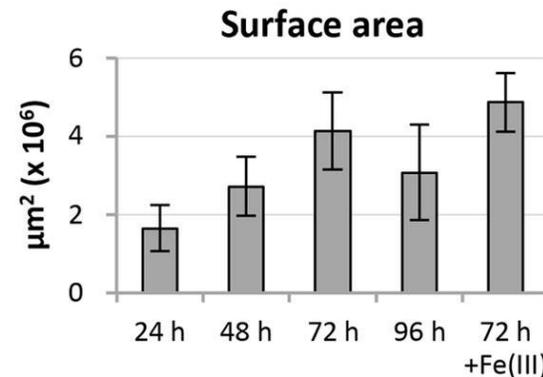
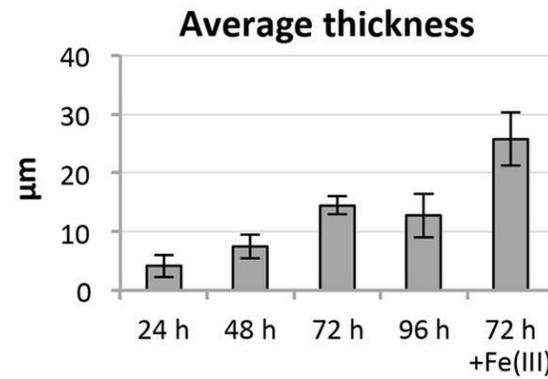
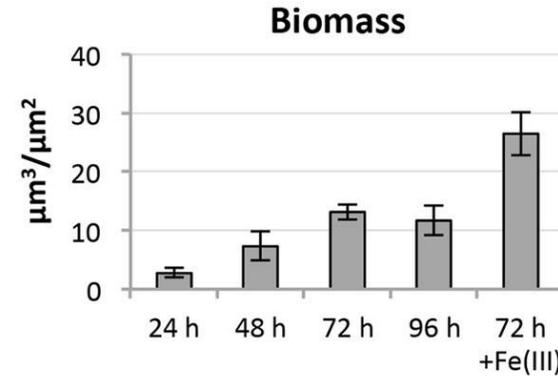
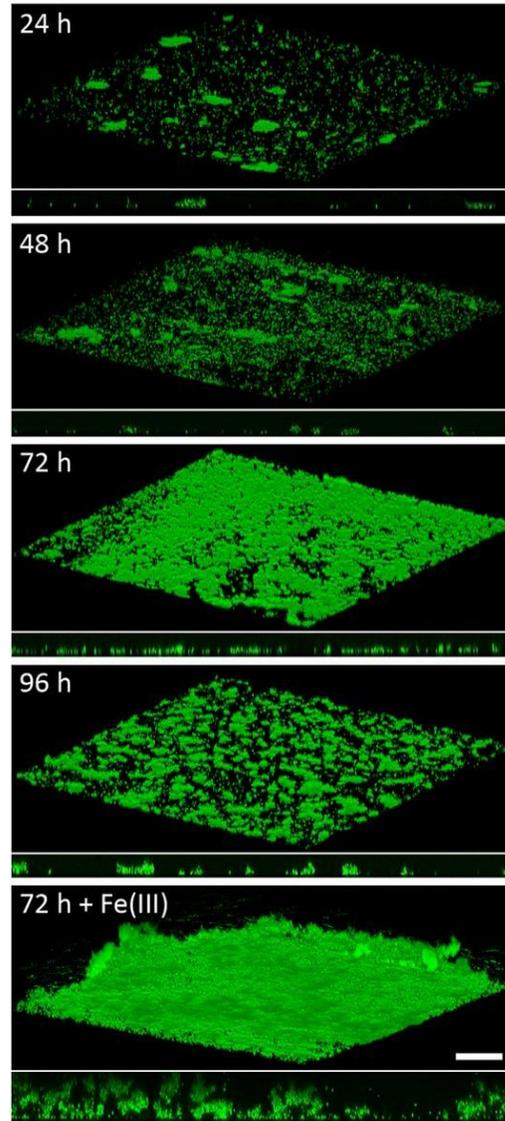
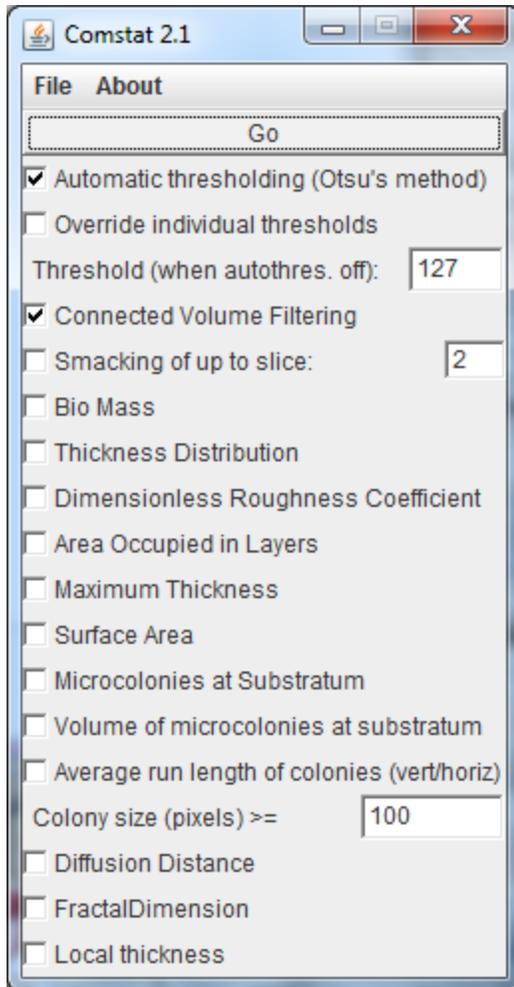
Pannello di destra: immagini di microscopia confocale ottenute dopo 12 (I), 24 (II), 48 (III), 72 (IV), 96 (V) e 120 (VI) ore di incubazione dei biofilm su impianti dentali interi, colorati mediante LIVE/DEAD: batteri vivi in verde, batteri morti in rosso e superficie dell'impianto in blu. Doi: 10.1002/advs.202203291.





ImageJ
An open platform for scientific image analysis

Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: esempi di applicazione della microscopia confocale (II)



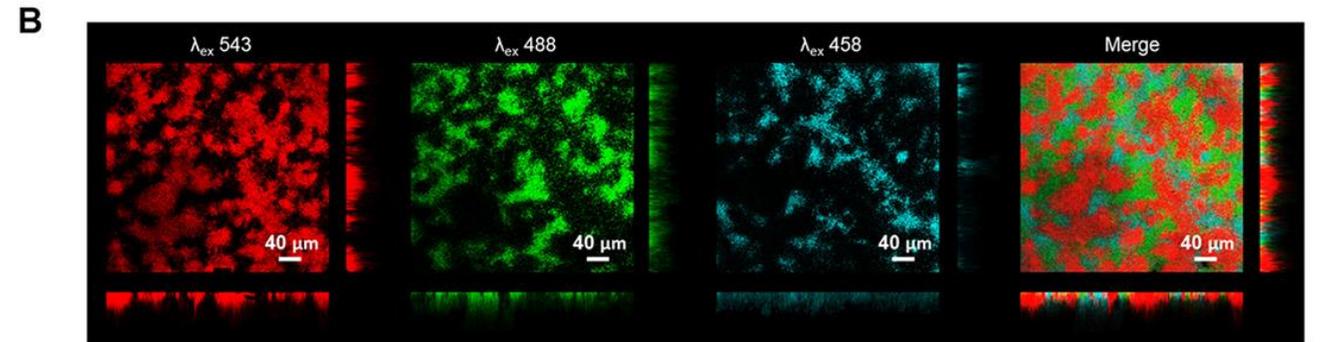
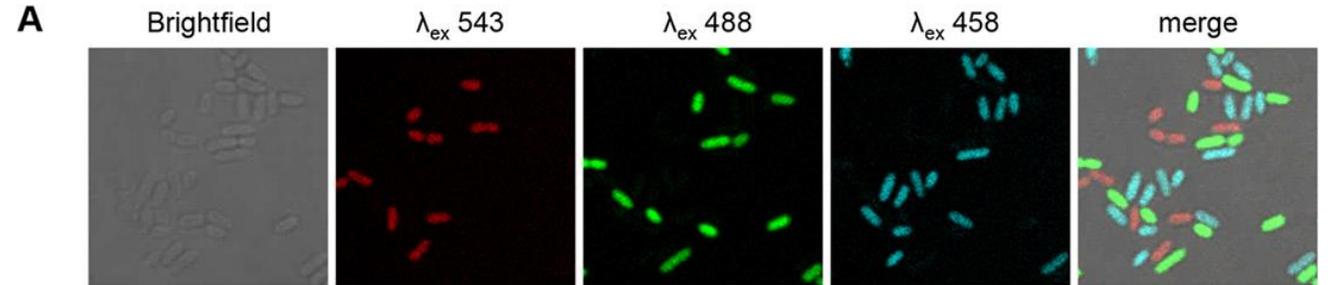
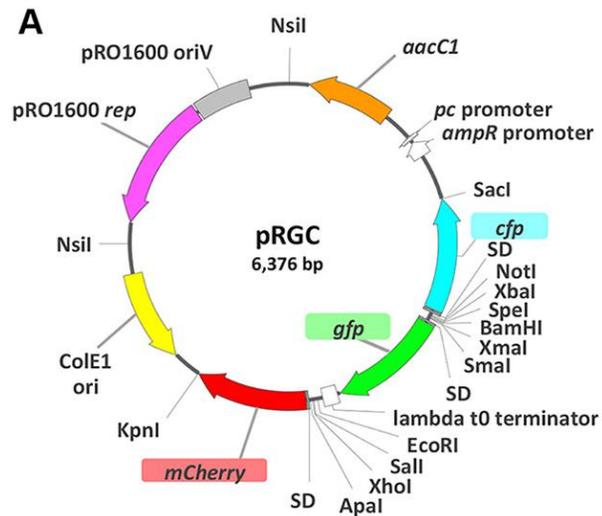
Esistono software, come il plugin Comstat per ImageJ, che permettono di **analizzare immagini di microscopia confocale per quantificare e caratterizzare i biofilm**. Questi strumenti consentono di ottenere dati su parametri quali biomassa, superficie coperta, numero di microcolonie, spessore e altre caratteristiche strutturali del biofilm.

Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: l'ingegneria genetica dei microorganismi come strumento essenziale per lo studio dei biofilm



Generation of Genetic Tools for Gauging Multiple-Gene Expression at the Single-Cell Level

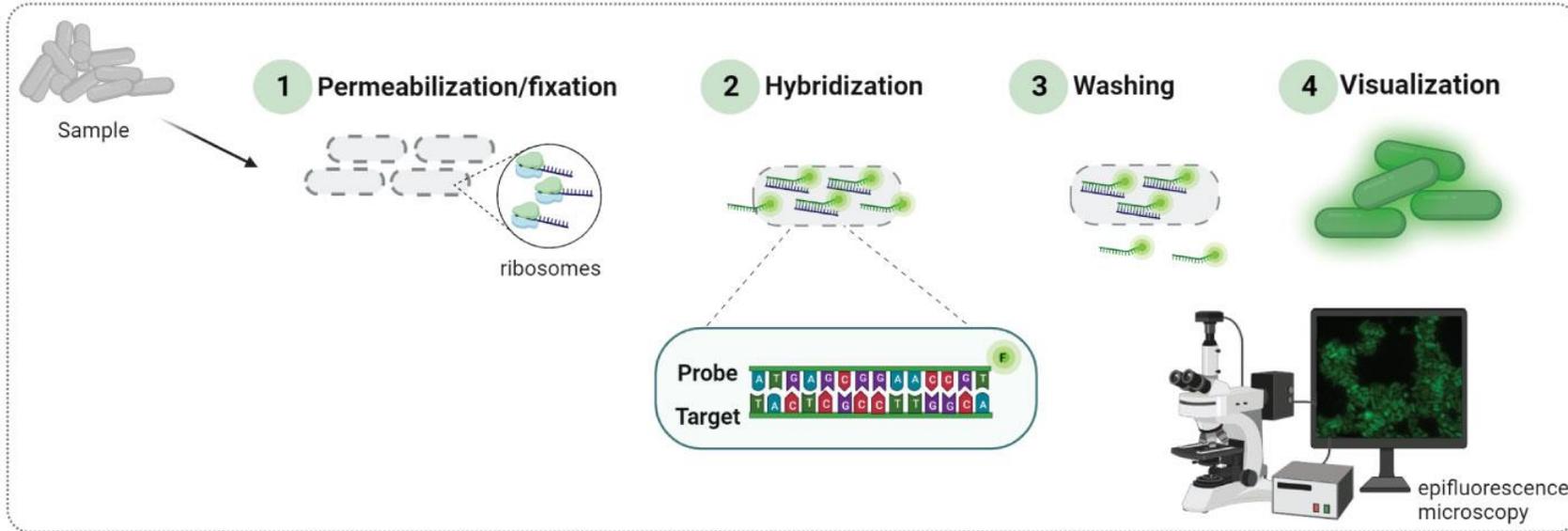
Marta Mellini,^a Massimiliano Lucidi,^b Francesco Imperi,^{a,c} Paolo Visca,^{a,c} Livia Leoni,^a Giordano Rampioni^{a,c}



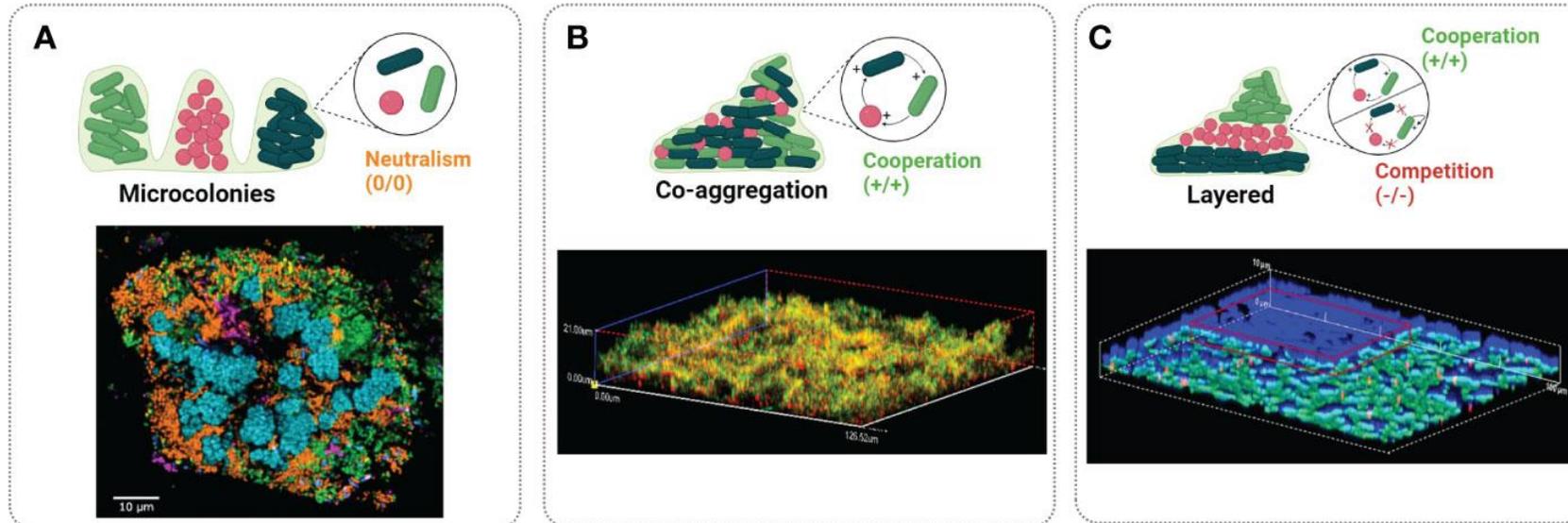
Validazione funzionale della serie di vettori promoter-probe pRGC. (A e B) Imaging mediante microscopia confocale di una co-coltura mista di *P. aeruginosa* PAO1 contenente alternativamente mini-RGC-Pkm::mCherry, mini-RGC-Pkm::gfp o mini-RGC-Pkm::cfp (A) e di un biofilm in flow cell (B) formato dalla stessa co-coltura mista mostrata nel pannello A.



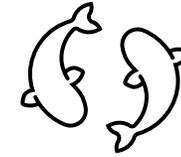
I Fluorescence *in situ* hybridization protocol



II Spatial organization of biofilm



Metodiche di studio del biofilm *in vitro*: Fluorescence *In Situ* Hybridization



La FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) consente la visualizzazione dei microrganismi tramite microscopia a fluorescenza o confocale **senza la necessità di ingegnerizzare geneticamente i microrganismi per fargli esprimere proteine fluorescenti**. Tuttavia, si tratta di una tecnica **complessa da eseguire e dai costi elevati**.

Metodiche di studio del biofilm *ex vivo*: Un modello normotermico di co-perfusione fegato-milza



Portal vein
Hepatic artery
Splenic artery



THE LANCET Microbe

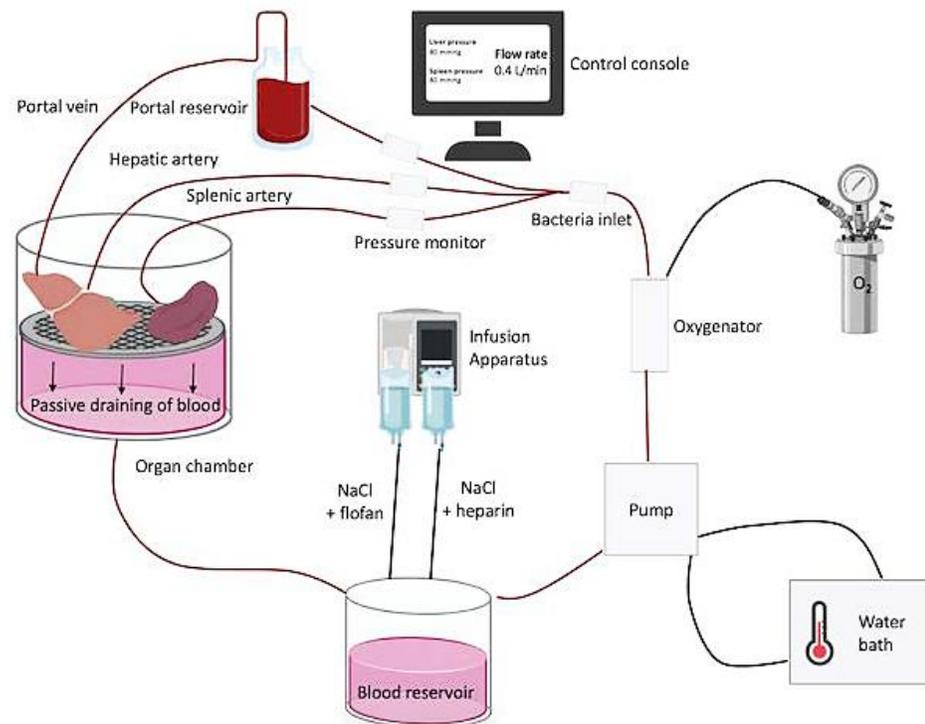
ARTICLES · Volume 2, Issue 12, E695-E703, December 2021 · [Open Access](#)

[Download Full Issue](#)

Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with tissue macrophages in a mouse infection model and ex-vivo pig organ perfusions: an exploratory investigation

[Joseph J Wanford, PhD^a](#) · [Ryan G Hames, BSc^a](#) · [David Carreno, PhD^a](#) · [Zydrune Jasiunaite, BSc^a](#) · [Wen Y Chung, PhD^d](#) · [Fabio Arena, MD^{f,g}](#)
· et al. [Show more](#)

Il circuito è costituito da una camera che ospita sia la milza (cannulata tramite l'arteria splenica) sia il fegato (cannulato tramite l'arteria epatica e la vena porta). Il sangue defluisce da questa camera verso un serbatoio, al quale vengono aggiunte soluzioni di Flofan (vasodilatatore) ed Eparina (anticoagulante). Da qui, il sangue viene pompato attraverso un bagno termostato che mantiene una temperatura costante di 37 °C, e successivamente attraverso un ossigenatore. A questo punto, è presente un ingresso per l'inoculo batterico, prima che il circuito si divida in tre vasi: l'arteria splenica, l'arteria epatica e la vena porta (attraverso un ulteriore serbatoio). Ciascuno di questi vasi è monitorato per la pressione, che viene trasmessa alla console di controllo.



Metodiche di studio del biofilm *ex vivo*: Un modello normotermico di co-perfusione fegato-milza



Portal vein
Hepatic artery
Splenic artery

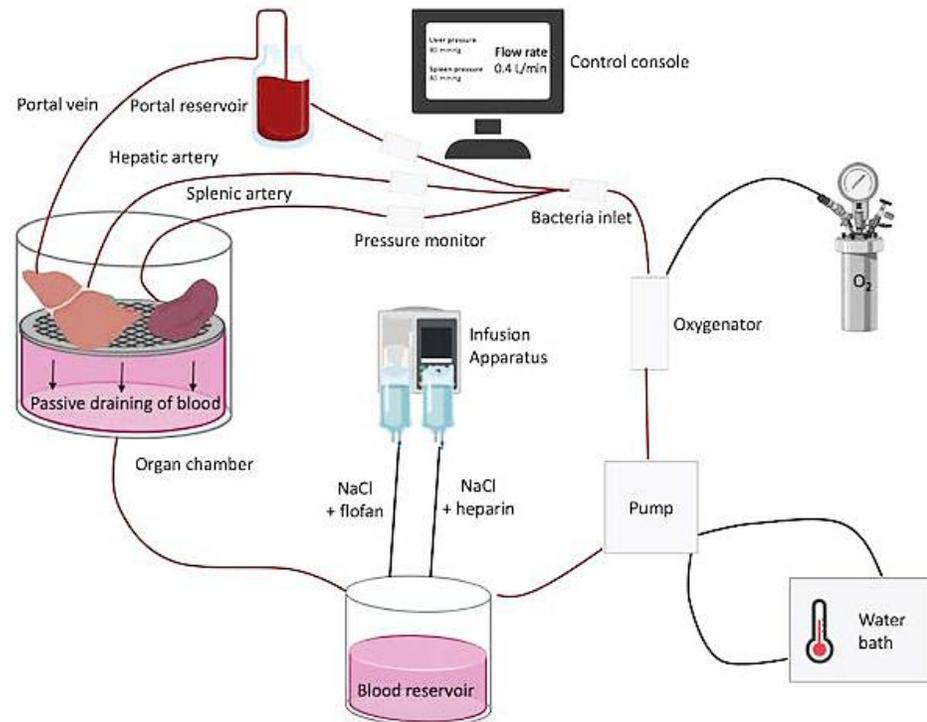


Rilevanza fisiopatologica elevata: il modello riproduce in modo realistico l'interazione tra biofilm e ambiente tissutale/vascolare.

Osservazione delle interazioni immunitarie: permette di analizzare il ruolo dei macrofagi tissutali e delle risposte immunitarie innate contro il biofilm, cosa difficile da ottenere in modelli *in vitro*.

Analisi di tropismo e disseminazione.

Possibilità di imaging e campionamento mirato: l'uso di modelli animali o organi perfusi permette l'applicazione di tecniche istologiche, immunofluorescenza o microscopia confocale per l'analisi del biofilm *in situ*.



Bassa riproducibilità e variabilità biologica.

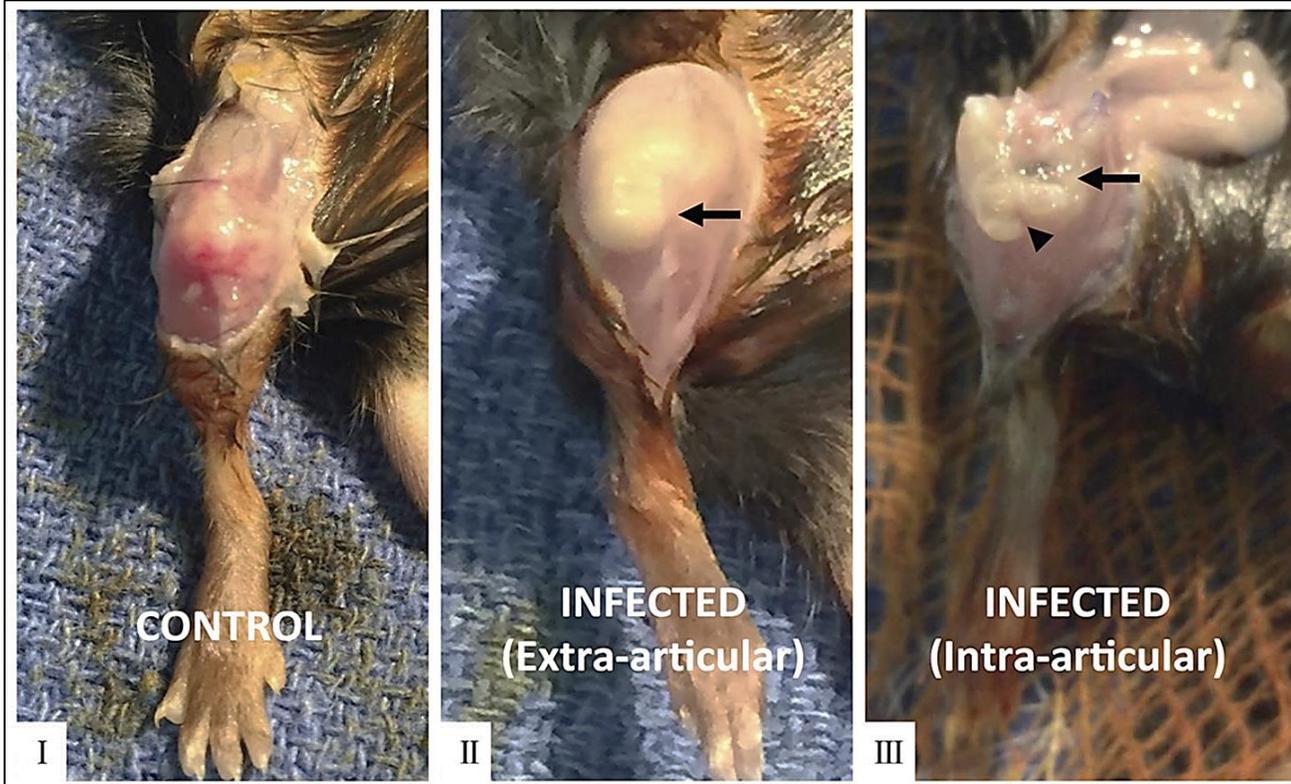
Costo e complessità elevati: richiede risorse logistiche, competenze tecniche e infrastrutture specifiche (sala operatoria, camere di perfusione, animali da esperimento).

Limitata scalabilità e processività.

Difficoltà di quantificazione diretta del biofilm: la valutazione della biomassa del biofilm può essere indiretta e complicata dall'interferenza di cellule ospiti e componenti tissutali.

Limitazioni etiche.

Metodiche di studio del biofilm *in vivo*: modello murino di infezione periprotetica



Fotografie che mostrano le ginocchia destre di topi C57BL/6 dopo 6 settimane dall'impianto chirurgico. I) Nell'animale di controllo, le strutture anatomiche risultano preservate, con chiara visualizzazione della rotula e del tendine rotuleo. II) Nell'animale infettato con *S. aureus*, la rotula era difficilmente identificabile durante la dissezione superficiale. La capsula articolare sottostante (freccia) appariva distesa, in quanto piena di materiale purulento, maleodorante e di colore giallo. III) Una volta aperta l'articolazione, l'aspetto prossimale della tibia risultava frammentato e friabile. L'impianto (punta di freccia) che si trovava all'interno dell'osso appariva macroscopicamente instabile e ricoperto di materiale giallastro intra-articolare (freccia).

Rilevanza clinica elevata.

Permette valutazioni multi-parametriche: si possono analizzare parametri istologici, microbiologici e immunologici (carica batterica, danno tissutale, infiltrato infiammatorio).

Studio del biofilm in un microambiente complesso

Follow-up a lungo termine: Il mantenimento dell'impianto per 6 settimane consente lo studio delle infezioni croniche e della persistenza del biofilm.

Bassa riproducibilità e variabilità biologica.

Costo e complessità elevati.

Limitata scalabilità e processività.

Difficoltà di quantificazione diretta del biofilm.

Limitazioni traslazionali: sebbene simili, le risposte immunitarie murine non sono identiche a quelle umane, il che può influenzare la trasposizione dei risultati.

Limitazioni etiche.

 MICROBIAL BIOFILMS

Biofilms: an emergent form of bacterial life

Hans-Curt Flemming¹, Jost Wingender¹, Ulrich Szewzyk², Peter Steinberg³, Scott A. Rice⁴ and Staffan Kjelleberg⁴

Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions

Sofia Arnaouteli^{1,3}, Natalie C. Bamford ^{1,3}, Nicola R. Stanley-Wall ¹ ✉ and Ákos T. Kovács ² ✉

REVIEW

**ADVANCED
SCIENCE**
Open Access

www.advancedscience.com

Biofilms: Formation, Research Models, Potential Targets, and Methods for Prevention and Treatment

Yajuan Su, Jaime T. Yrastorza, Mitchell Matis, Jenna Cusick, Siwei Zhao, Guangshun Wang, and Jingwei Xie*





Grazie per l'attenzione!

Massimiliano Lucidi

Ricercatore presso il Dipartimento di
Scienze dell'Università degli Studi
RomaTre

Email: massimiliano.lucidi@uniroma3.it