

# Bases de la formación de biofilms microbianos, etapas, matriz, expresión génica y quorum sensing

Paola Scavone, PhD  
Laboratorio de Biofilms Microbianos  
Depto. de Microbiología, IIBCE



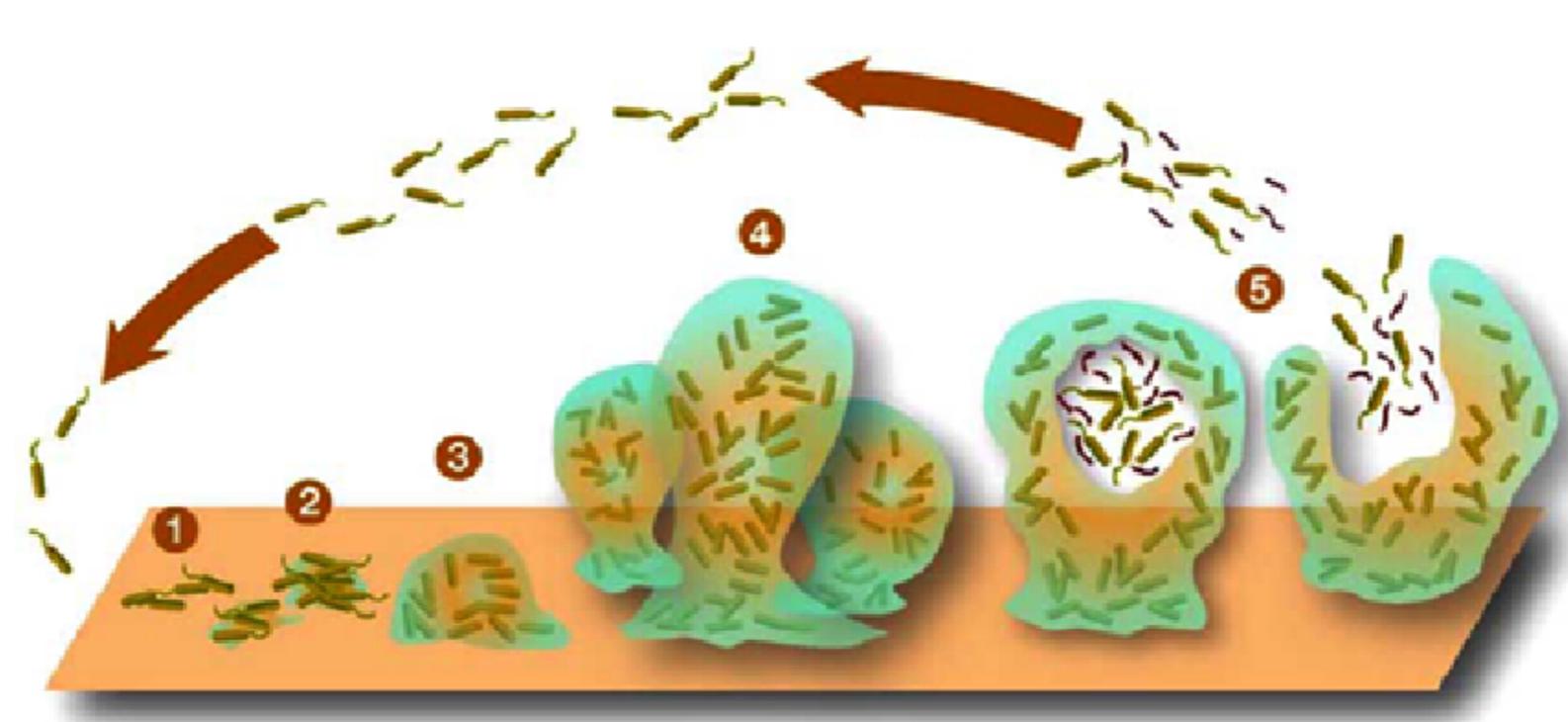
Ministerio  
de Educación  
y Cultura



## Biofilms definición

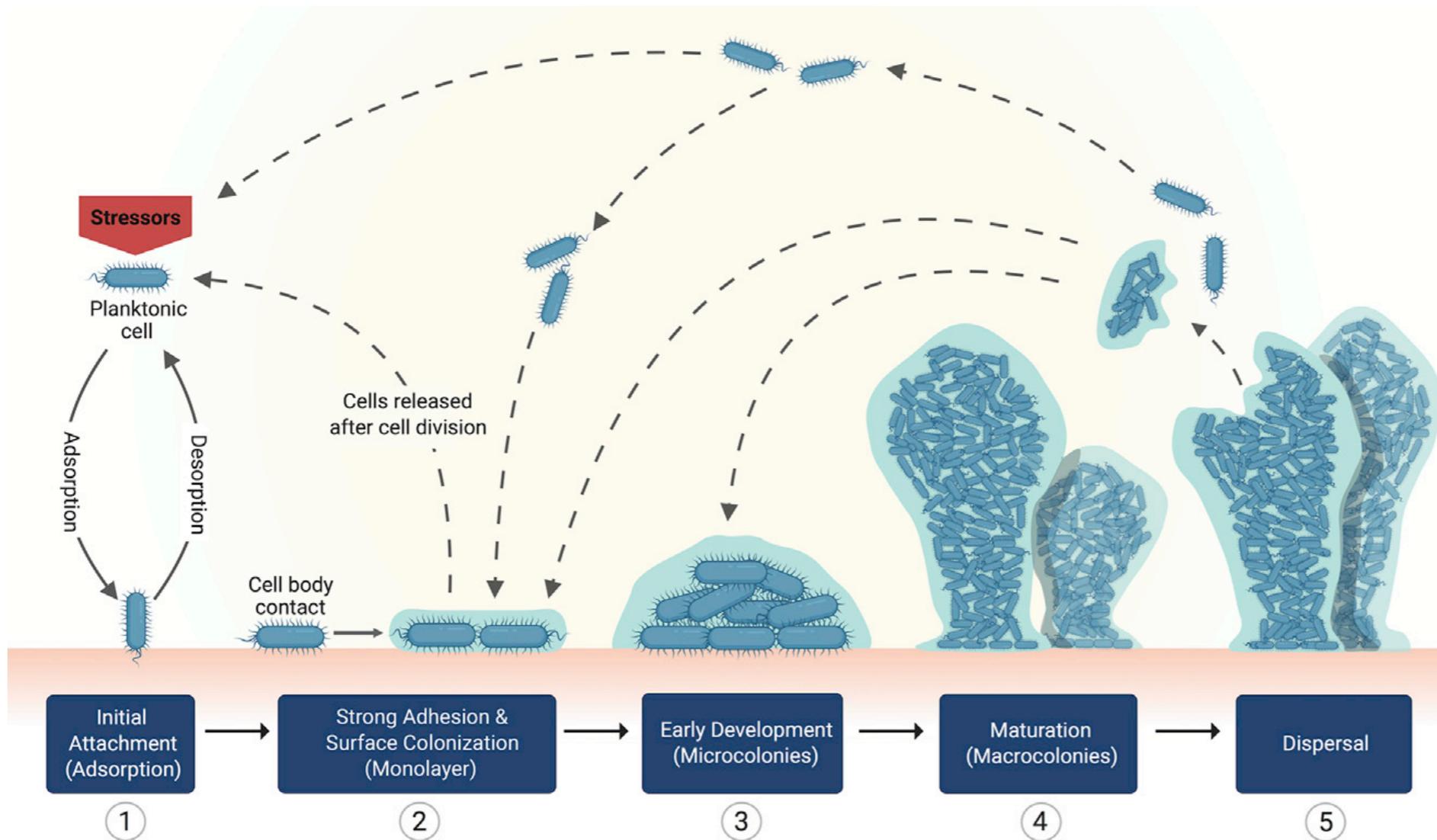
**Comunidad** bacteriana que se encuentra **irreversiblemente** asociada a una superficie, rodeada de una **matriz** polisacáridica de producción propia. Los microorganismos en el biofilm difieren de sus contrapartes planctónicas en la **expresión génica**, estado **metabólico** y **fisiológico**.

Costerton, 1999



Una vez maduro, el biofilm genera un patrón alterado en cuanto al **crecimiento bacteriano**, **cooperación fisiológica** y **eficiencia metabólica**, el cual provee de una coordinación funcional comunitaria el cual imitaría un **tejido primitivo eucariótico**.

Dunne, 2002



Guzmán-Soto et al, 2021

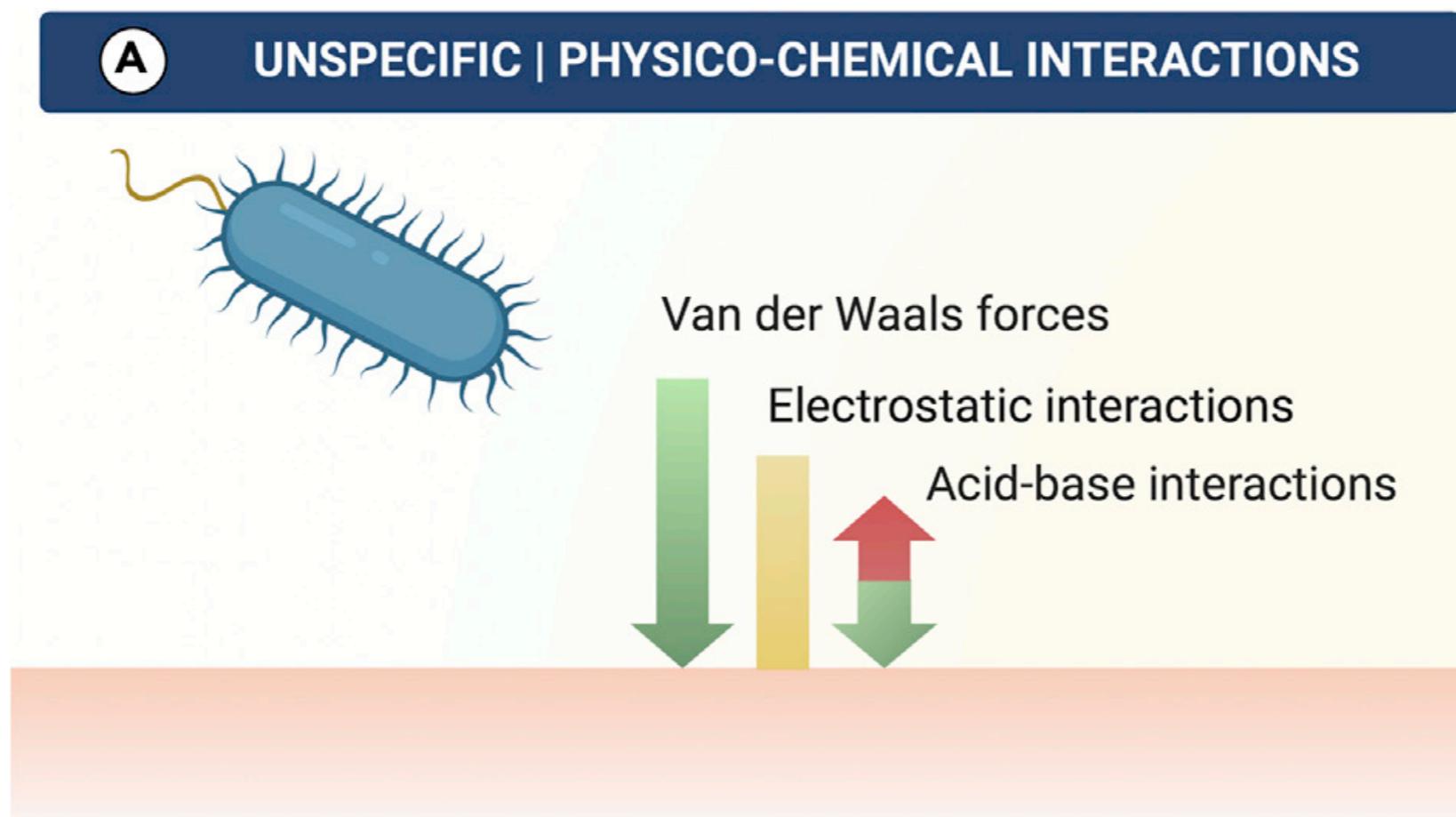
1. Adhesión **reversible**
2. Adhesión **irreversible**
3. Formación de **microcolonias** y producción de **matriz**
4. **Maduración**
5. **Dispersión**

# 1. Adhesión reversible

La adhesión e interacción con las superficies para formar un biofilm es **crucial** para la sobrevivencia en un medio ambiente complejo.

Interacciones **específicas** y **no específicas** entre las bacterias y las superficies

A superficies **abióticas** interacciones no específicas



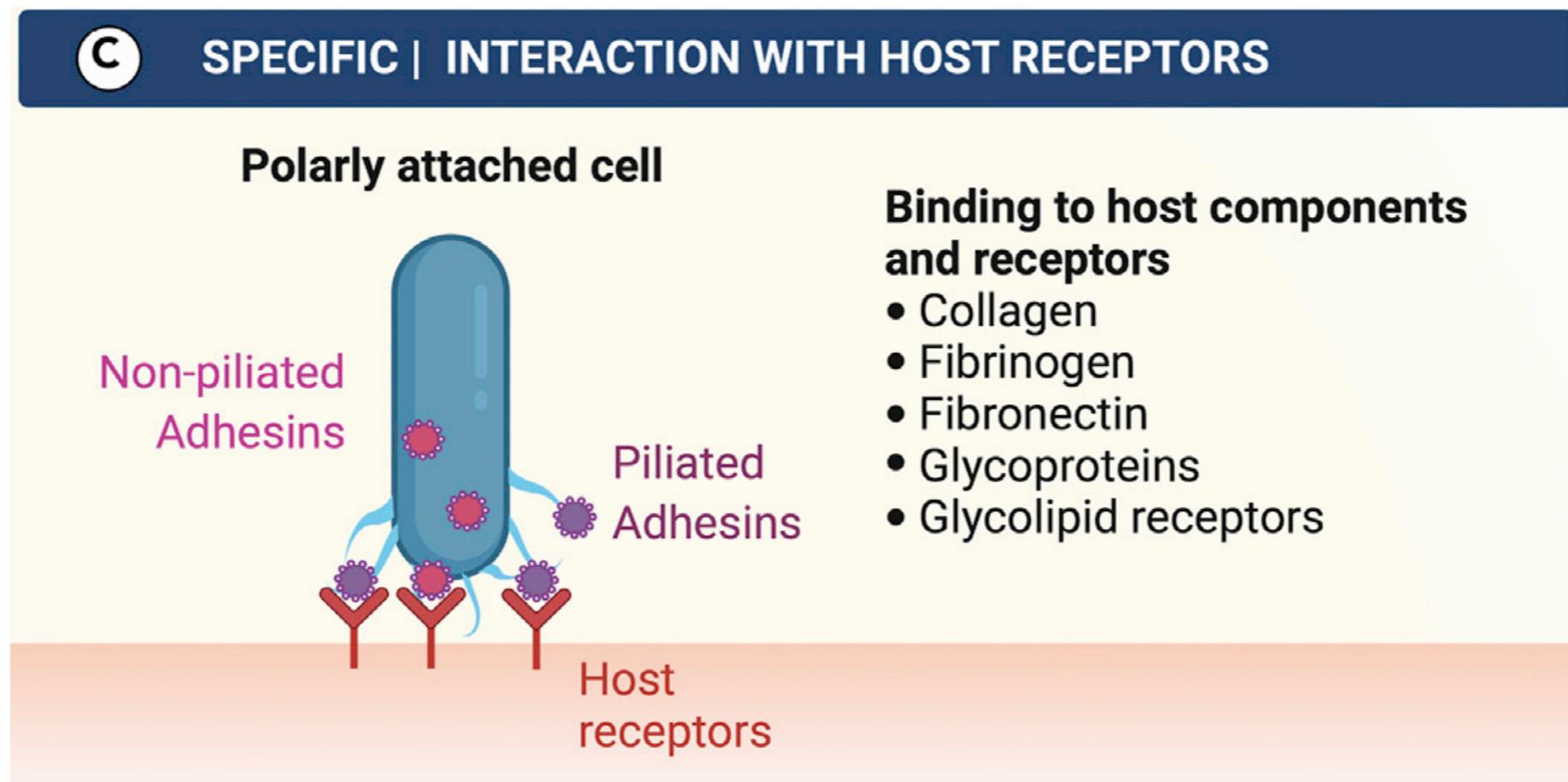
# 1. Adhesión reversible

La adhesión e interacción con las superficies para formar un biofilm es **crucial** para la sobrevivencia en un medio ambiente complejo.

Interacciones **específicas** y **no específicas** entre las bacterias y las superficies

A superficies **abióticas** interacciones no específicas

A superficies **bióticas** interacciones del tipo receptor-ligando



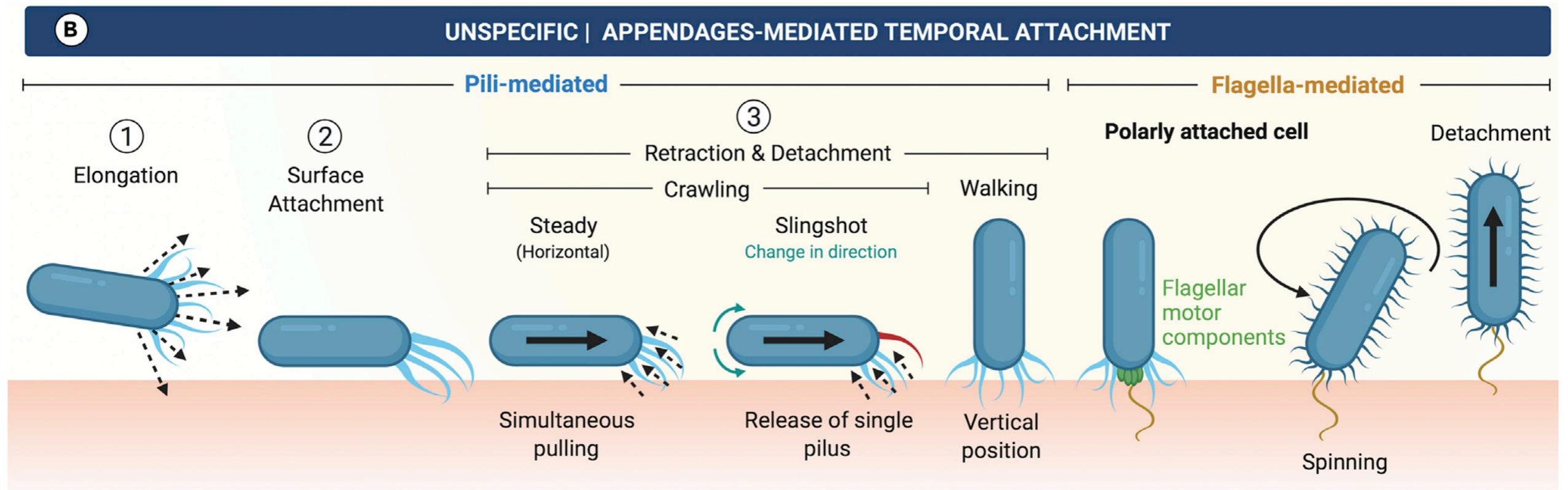
# 1. Adhesión reversible

**Carga negativa** de la superficie bacteriana  
fuerzas electrostáticas repulsivas

medio líquido fuerzas hidrodinámicas repulsivas cerca de la superficie

**fimbrias/flagelos** para adherirse/moverse

Una vez en la superficie, incrementa la adhesión mediante adhesinas específicas y no específicas lo que da origen a la **adhesión irreversible**



Está influenciada por:

factores **ambientales** (pH, salinidad, etc)

propiedades **fisicoquímicas** de la superficie (rugosidad, hidrofobicidad, cargas, etc)

presencia de **film condicionante** (conditioning film) capa de compuestos orgánicos e inorgánicos absorbido a la superficie

Para una adhesión permanente las bacterias emplean **adhesinas no específicas**

- fimbriales

- no fimbriales

- adhesinas polisacáridicas discretas

grupo ubiquo de adhesinas

Gram positivos como negativos

involucradas en **adhesión** a superficies bióticas/abióticas

**transferencia** de ADN

formación de **biofilms**, relevantes en primeras etapas

median la interacción intercelular a través de agregación y formación de microcolonias

papel en la estructura secundaria del biofilm a través de la movilidad twitching

**4 subgrupos** definidos por el tipo de secreción y ensamblaje

**CUP** (chaperon-usher pili)

fimbrias **tipo IV**

**CUP alternativo**

fimbrias ensambladas por nucleación-precipitación extracelular (**curli**)

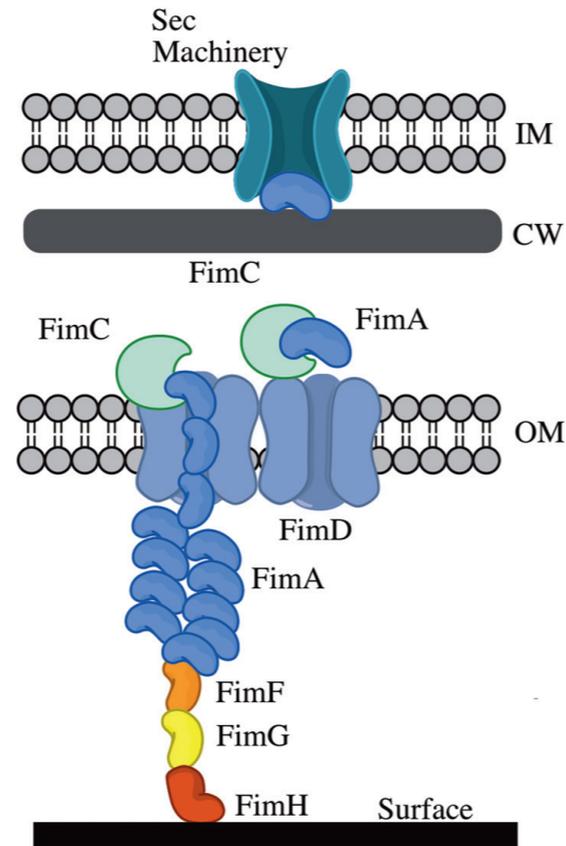
## 2. Adhesión irreversible

**TABLE 1** Examples of fimbrial adhesins involved in biofilm formation

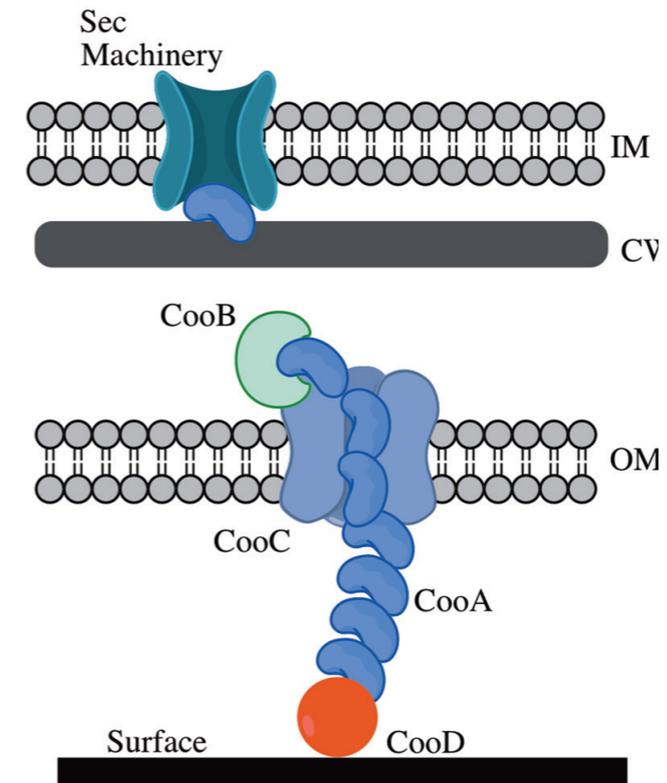
Pili type	Major pilus proteins	Minor proteins and assembly proteins	Bacteria	Reference
Chaperone/ usher	EcpA or MatA (ECP pili)	EcpC, EcpD, EcpE	<i>E. coli</i>	196
	FimA (type I)	FimC, FimD, FimF, FimG, FimH	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>X. fastidiosa</i> , <i>Enterobacter amylovora</i> , <i>Serratia marcescans</i>	21, 197–200
	CsuA/B (type I) MrkA (type 3)	CsuC, CsuD, CsuE MrkB, MrkC, MrkD	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (UPEC), <i>Citrobacter koseri</i>	201 202, 203
Type IV pili				
Type IVa	PilA, PilE	PilE, PilD, PilV, PilW, PilX PilD, PilH, PilI, PilJ, PilK, PilX, PilV, ComP, PilD	<i>P. aeruginosa</i> <i>Neisseria</i> spp.	14, 45, 46 204, 205
	MshA (MSHA)	MshB, C, D, E, F, G, I, J, K, L, M, N, O, P, and MshQ	<i>Vibrio parahemolyticus</i> and <i>Vibrio cholerae</i>	49, 206
Type IVb	PilA (ChiRP) BfpA (bundle forming)	PilB, PilC, PilD BfpP, BfpI, BfpJ, BfpK,	<i>V. parahemolyticus</i> <i>E. coli</i> (EPEC)	49, 207 208
	TcpA (Tcp)	TcpB, C, D, E, F, TcpJ	<i>V. cholerae</i>	50
Tad	Flp	TadA, TadB/C, TadD, TadE, TadF, TadG, TadV, RcpA, RcpB, TadZ, CpaA, CpaB, CpaC, CpaD, CpaE, CpaF	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	58, 64
	PilA	CpaA, CpaB, CpaC, CpaD, CpaE, CpaF	<i>C. crescentus</i>	11, 66
	Flp	TadA, TadB, TadC, TadD, TadF, TadG, FppA, RcpA, RcpC, TadZ	<i>P. aeruginosa</i>	56, 209
	CtpA (common pili)	CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	252
Alternative CU	CooA (CS1) CblA (cable pilus)	CooB, CooC, CooD CblB, CblC, CblD	<i>E. coli</i> (ETEC) <i>Burkholderia cepacia</i> complex	26, 28 36
Nucleation/ precipitation	CsgA (Curli)	CsgB, CsgG, CsgE, CsgF, CsgD	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter</i> spp.	72, 77
	AgfA (Tafi)	AgfB, AgfC, AgfD, AgfE, AgfF	<i>Salmonella enteritidis</i>	210, 211
	FapC	FapA, FapB, FapD, FapE, FapF	<i>Pseudomonas</i> spp.	212

# 2. Adhesión irreversible

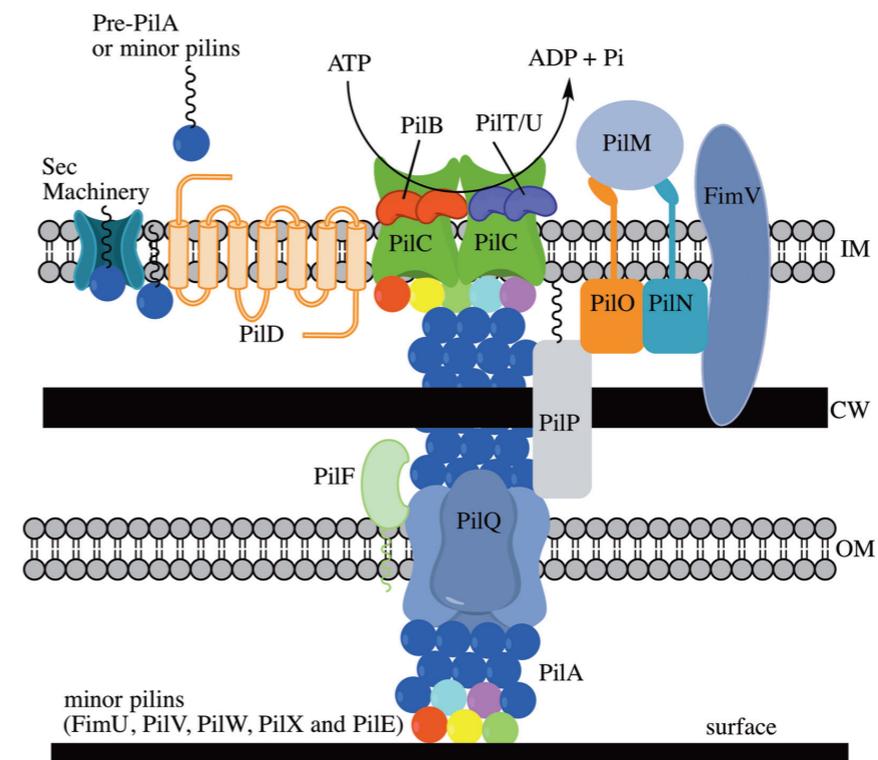
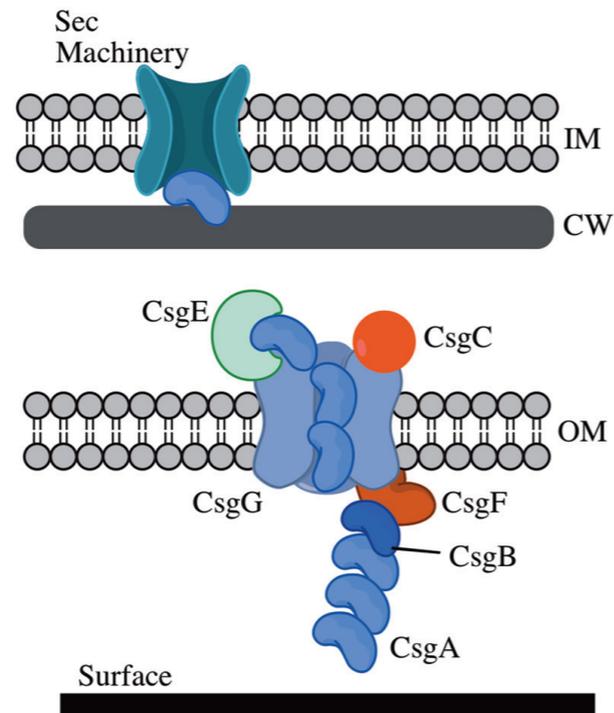
## A. Chaperone-Usher



## B. Alternate Chaperone-Usher



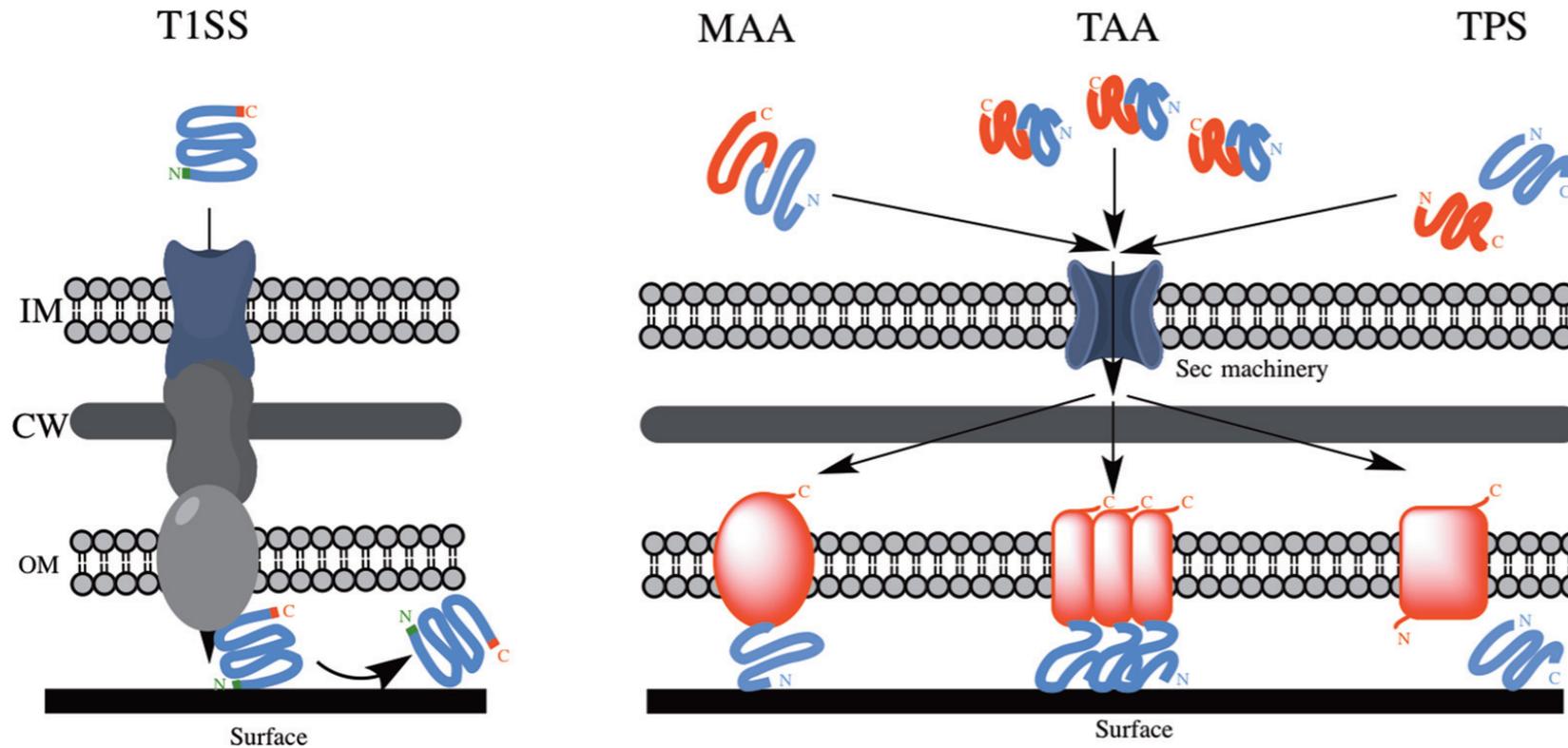
## C. Nucleation-Precipitation



# Adhesinas no fimbriales

T1SS  
T5SS

## 2. Adhesión irreversible



**FIGURE 3** Schematic overview of the various secretion systems of nonfimbrial adhesins. The type 1 secretion system (T1SS) and three classes of type 5 secretion system (T5SS) (monomeric autotransporter adhesins [MAA], trimeric autotransporter adhesins [TAA], and two-partner secretion [TPS] systems) are represented. In T1SS, the adhesin is exported directly from the cytoplasm to the extracellular milieu via a pore comprised of three proteins. In T5SS, the adhesin is translocated from the cytoplasm to the periplasm by the Sec machinery and auto-assembled in the outer membrane. See text for more details. Abbreviations: IM, inner membrane; CW, cell wall; OM, outer membrane. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.f3

**TABLE 3** Selected examples of nonfimbrial adhesins experimentally shown to be involved in biofilm formation by Gram-negative bacteria

Protein	Organism	Size (aa)	Reference
<b>Biofilm associated proteins (Bap) – T1SS</b>			
LapA	<i>Pseudomonas putida</i>	8,682	84
BapA / AdhA	<i>B. cenocepacia</i>	2,924	213
LapA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4,920	85
BapA	<i>S. enterica</i>	3,825	214
YeeJ	<i>E. coli</i>	2,358	102
Bap	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8,621	215
LapF	<i>P. putida</i>	6,310	89
BfpA	<i>Shewanella oneidensis</i>	2,768	216
MRP	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	4,558	217
BfpA	<i>Shewanella putrefaciens</i>	4,220	218
Cat-1	<i>Psychrobacter articus</i>	6,715	219
<b>Monomeric autotransporter adhesins – T5SS</b>			
Ag43	<i>E. coli</i>	1,039	104
Cah	<i>E. coli</i>	2,850	220
AIDA	<i>E. coli</i>	1,237	107
TibA	<i>E. coli</i>	989	221
YfaL/EhaC	<i>E. coli</i>	1,250	102
YpjA/EhaD	<i>E. coli</i>	1,526	102
YcgV	<i>E. coli</i>	955	102
Hap	<i>H. influenzae</i>	1,392	127
EhaA	<i>E. coli</i>	1,328	222
EhaB	<i>E. coli</i>	980	223
UpaH	<i>E. coli</i>	2,845	224
UpaC	<i>E. coli</i>	996	225
Upal	<i>E. coli</i>	1,254	226
MisL	<i>S. enterica</i>	955	227
<b>Trimeric autotransporter adhesins – T5SS</b>			
YadA	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	434	119
UspA1	<i>Moraxella catarrhalis</i>	955	228
Hap/MID	<i>M. catarrhalis</i>	2,090	228
UpaG	<i>E. coli</i>	1,779	120
SadA	<i>S. enterica</i>	1,461	121
AtaA	<i>Acinetobacter</i> sp. Tol5	3,630	229
EhaG	<i>E. coli</i>	1,589	230
BbfA	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1,527	122
<b>Hemagglutinin-like adhesins – T5SS</b>			
HxfB	<i>X. fastidiosa</i>	3,376	231
HxfA	<i>X. fastidiosa</i>	3,458	231
HMW1	<i>H. influenzae</i>	1,536	127
HMW2	<i>H. influenzae</i>	1,477	127
XadA	<i>X. fastidiosa</i>	763	125
YapH	<i>Xanthomonas fuscans</i>	3,397	124
FhaB	<i>X. fuscans</i>	4,490	124
XacFhaB	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	4,753	232
CdrA	<i>P. aeruginosa</i>	2,154	129
FHA	<i>B. pertussis</i>	3,590	128
BcpA	<i>Burkholderia thailandensis</i>	3,147	233

### **Adhesinas polisacarídicas**

asociadas fuertemente con la superficie bacteriana formando la **cápsula** (polisacáridos capsulares)

**levemente asociadas o secretadas** (polisacáridos extracelulares EPS)

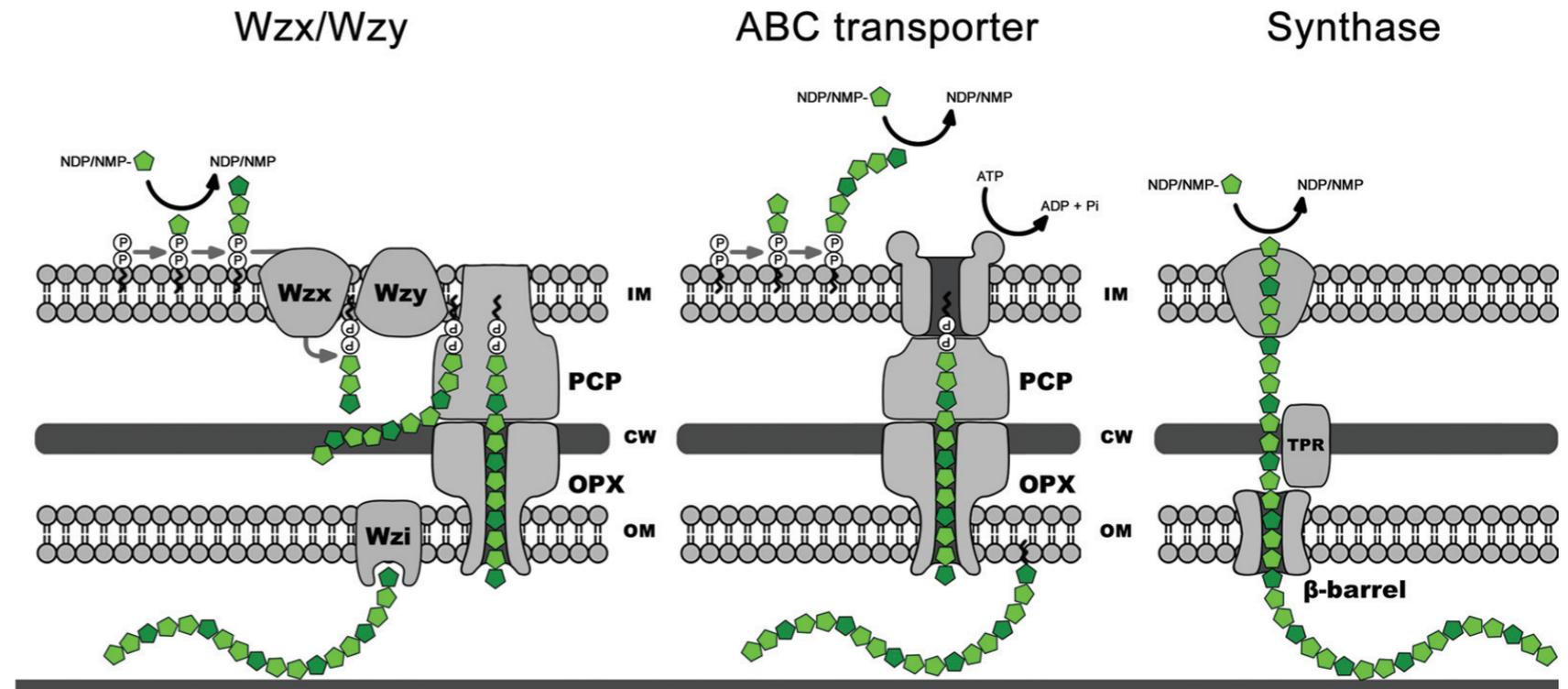
diferencias son experimentalmente definidas y tienen limitada relevancia fisiológica

desde un punto de vista adhesivo:

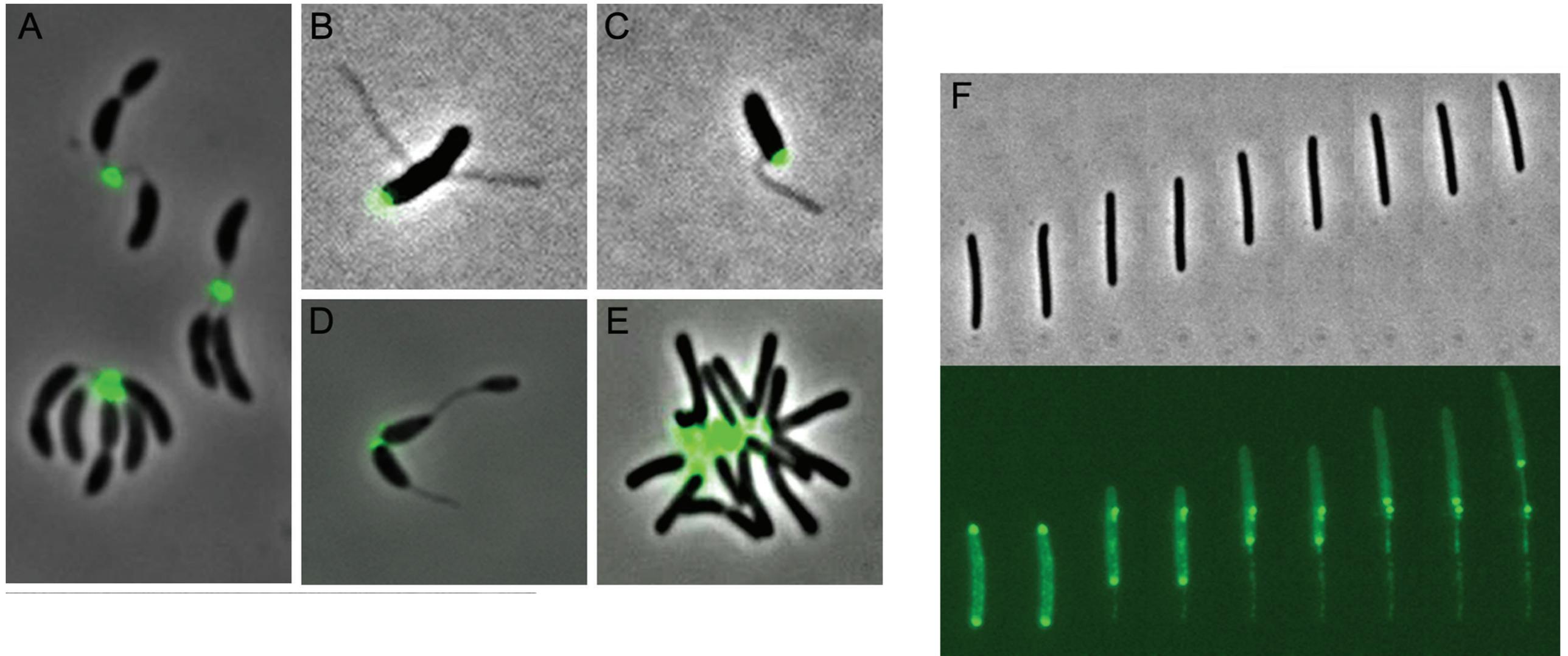
polisacáridos protectores forman barrera protectora

polisacáridos agregativos (EPS) propiedades adhesivas/cohesivas

## Polisacáridos agregativos (EPS)



## Polisacáridos agregativos (EPS)



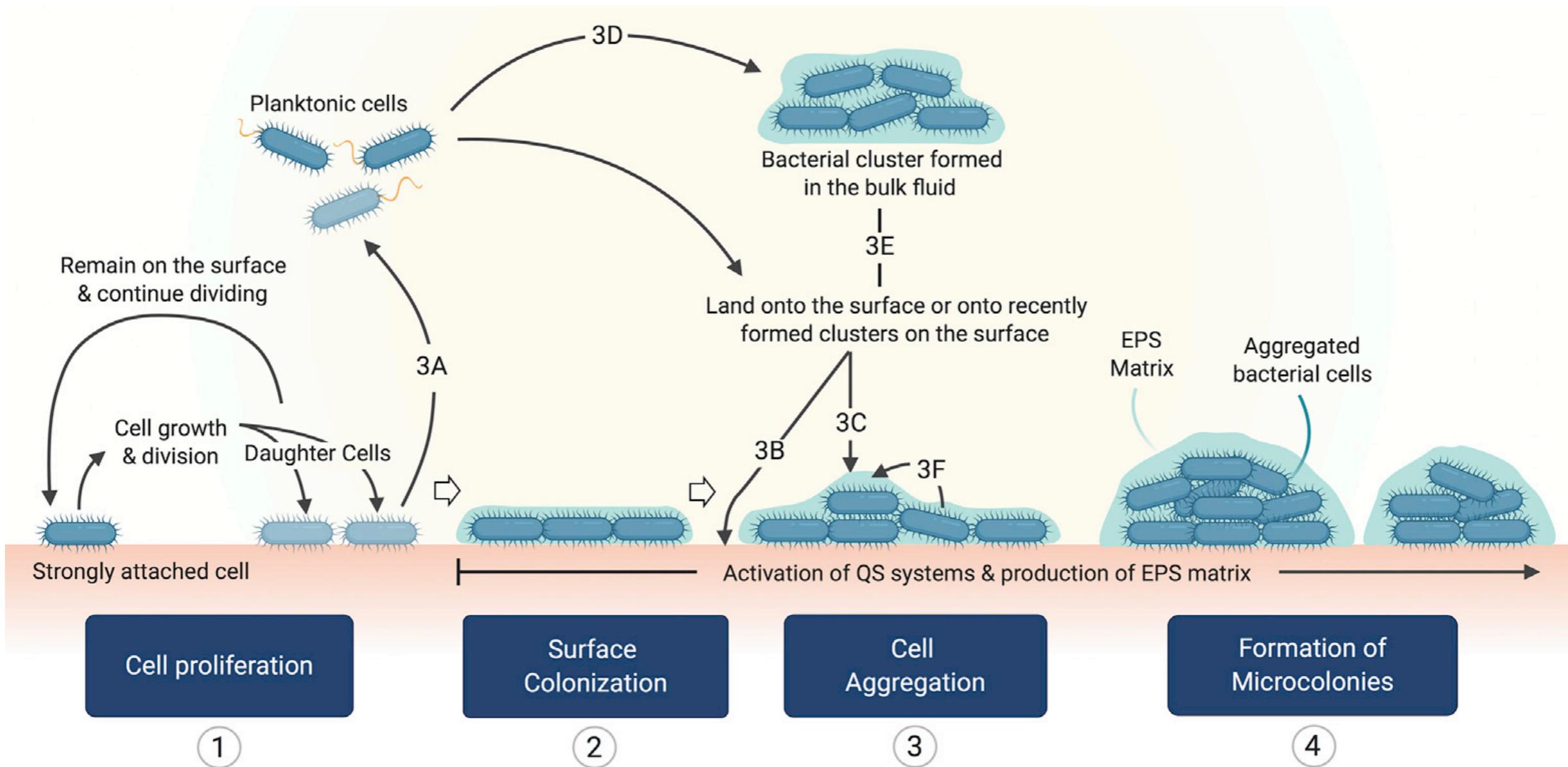
**FIGURE 6** Selected examples of discrete polysaccharides. AF488-conjugated wheat germ agglutinin lectin labelling of the holdfast in (A) *C. crescentus*, (B) *A. biprosthecum* (courtesy of Chao Jiang), (C) *Asticcacaulis excentricus* (courtesy of Chao Jiang), and (D) *Hyphomicrobium vulgare* (courtesy of Ellen Quardokus). (E) AF488-conjugated wheat germ agglutinin lectin labelling of the UPP in *A. tumefaciens*. (F) FITC-conjugated ConA lectin labelling of the slime in *M. xanthus*. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.f6

### Polisacáridos agregativos (EPS)

**TABLE 4** Selected examples of aggregative polysaccharides experimentally shown to be involved in biofilm formation by Gram-negative bacteria

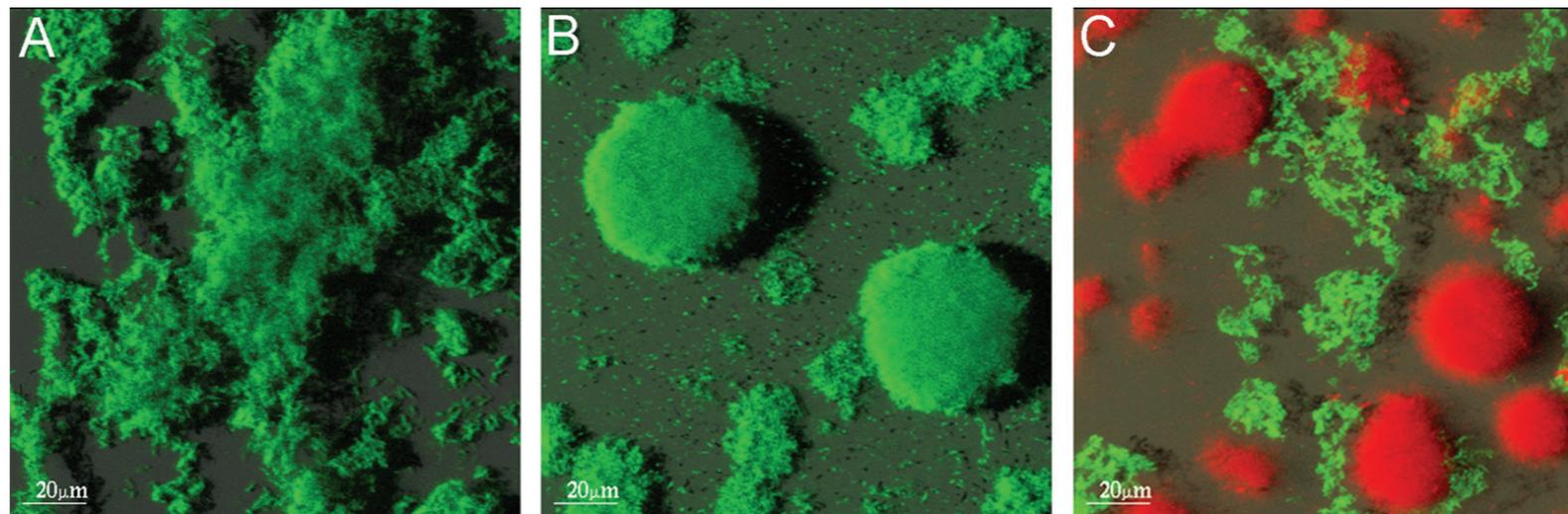
Polysaccharide	Organism	Composition/structure	Reference
Alginate	<i>P. aeruginosa</i>	$\beta$ -1,4-linked mannuronic acids and guluronic acids	234
Cellulose	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i> , <i>Sarcina ventriculli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	$\beta$ -1,4-linked D-glucose	235–239
Holdfast	<i>Caulobacter</i> spp., <i>Asticcacaulis biprosthecum</i> , <i>Hyphomonas adherens</i> , <i>Hyphomonas rosenbergii</i> , <i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> , <i>Maricaulis maris</i> , <i>Oceanicaulis alexandrii</i>	Suspected to contain $\beta$ -1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine, but the exact composition and structure remain unknown	160, 163, 166, 240–243
PGA	<i>E. coli</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Bordetella</i> spp., <i>Actinobacillus</i> spp., <i>P. fluorescens</i>	$\beta$ -1,6-linked N-acetyl-D-glucosamine	244, 245
Psl	<i>P. aeruginosa</i>	Repeating pentasaccharide of 3 mannose, 1 rhamnose, and 1 glucose	246–248
Pel	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i>	Unknown, but reported to be a glucose-rich polysaccharide polymer	246, 249, 250
Slime	<i>M. xanthus</i>	Suspected to contain $\alpha$ -D-mannose or $\alpha$ -D-glucose residues, but the exact composition and structure remain unknown	192
UPP	<i>A. tumefaciens</i>	Suspected to contain N-acetyl-D-glucosamine residues, but the exact composition and structure remain unknown	68, 179

# Microcolonias



### Microcolonias

Estructura **básica** del biofilm  
varía dependiendo de la especie bacteriana  
en idénticas condiciones *Pseudomonas putida* y *P. knackmussii*



**FIGURE 1** Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images showing spatial structures in flow-chamber-grown 5-day-old biofilms formed by (A) Gfp-tagged (green fluorescent) *P. putida*, (B) Gfp-tagged *P. knackmussii*, and (C) a mixture of Gfp-tagged *P. putida* and DsRed-tagged (red fluorescent) *P. knackmussii*. Bars, 20 μm. Adapted from reference 43 with permission from the American Society for Microbiology. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.f1

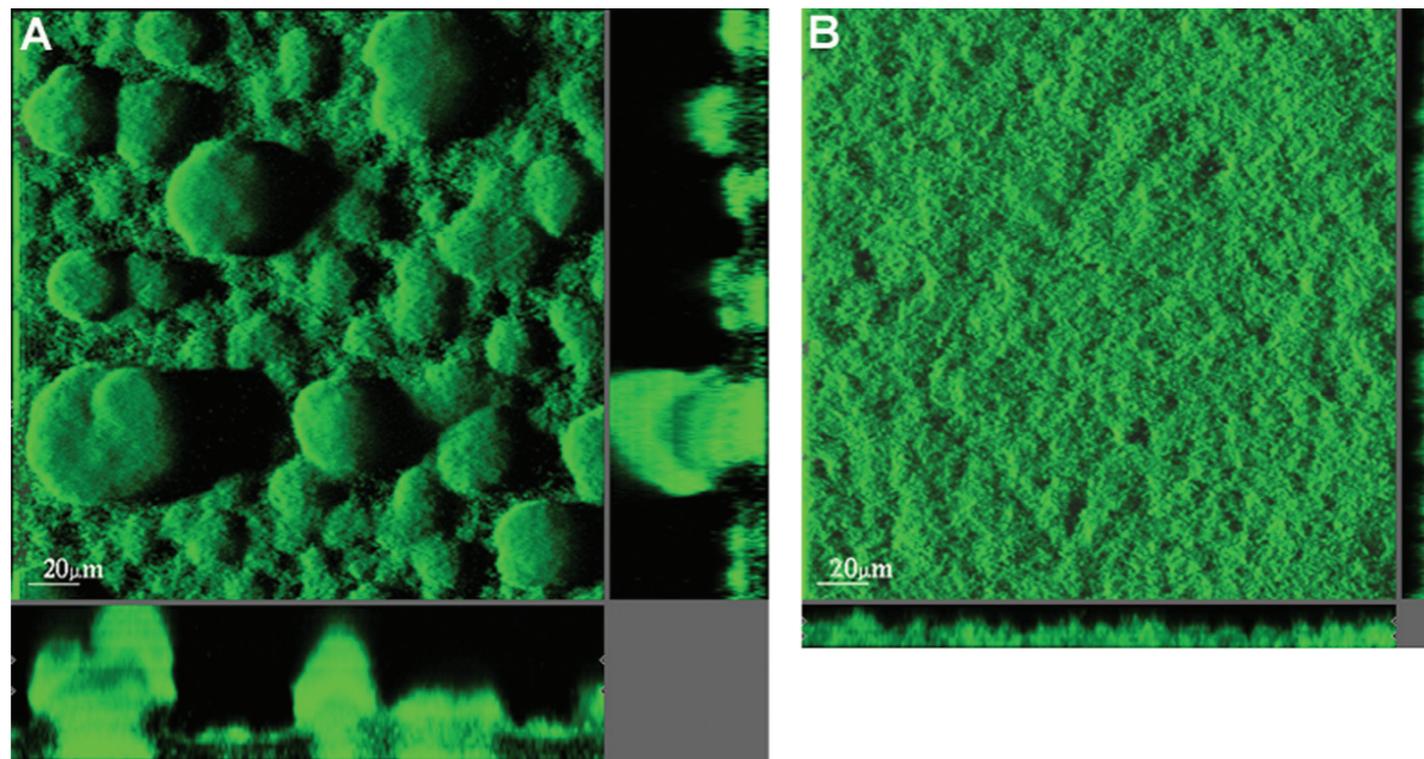
Diferencias en los componentes de la matrix podrían dar origen a las diferencias en las estructuras de las microcolonias

## Microcolonias

varía dependiendo de las condiciones ambientales

*P. aeruginosa* mushroom-shaped microcolonies en condiciones de **flujo** con medio con **glucosa**

*P. aeruginosa* flat biofilms en condiciones de **flujo** con medio con **cittrato**



**FIGURE 2** CLSM micrographs acquired in 5-day-old *P. aeruginosa* PAO1 biofilms grown on (A) glucose minimal medium and (B) citrate minimal medium. The central pictures show top-down fluorescence projections, and the flanking pictures show vertical sections. Bars, 20 µm. Adapted from reference 47 with permission from Wiley-Blackwell publishing. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.f2

### Matriz

contribuye a la **estructura** y **estabilidad**

componentes exactos difiere entre microorganismos y condiciones de cultivo básicamente

**50-90% exopolisacáridos**

**proteínas** (adhesinas, componentes de fimbrias y flagelos, proteínas extracelulares secretadas y proteínas de vesículas de membrana externa OMV)

**ácidos nucleicos (ADNe)**

**97% agua**

matriz proteoma

gran cantidad de proteínas periplásmicas, citoplásmicas, de membrana externa e interna

## Matriz exopolisacáridos

varían en composición y por lo tanto en propiedades fisicoquímicas  
tamaño

en asociación con lectinas, proteínas, lípidos, ADNe

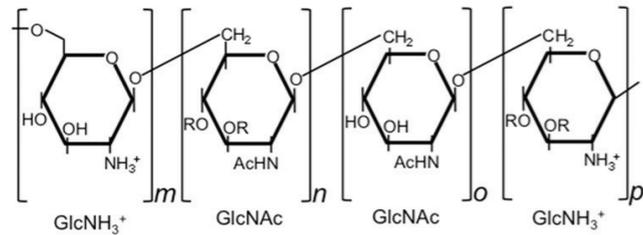
**TABLE 1** Summary of the cellular location, chemical composition, and functions of bacterial polysaccharides important for biofilm formation

	Localization	Charge	Functions		
			Aggregative	Protective	Architectural
<b>Pel</b>	Secreted	NA	X	X	X
<b>Psl</b>	Secreted/cell associated	Neutral	X	X	X
<b>PIA</b>	Secreted	Polycationic	X		X
<b>Cellulose</b>	Secreted	Neutral	X	X	
<b>Alginate</b>	Cell associated	Polyanionic		X	X
<b>CPS</b>	Covalently attached	Polyanionic		X	
<b>Levan</b>	Cell associated	Neutral	X	X	
<b>Colanic acid</b>	Cell associated	Polyanionic			X
<b>VPS</b>	Secreted	NA	X	X	X
<b><i>Bacillus</i> EPS</b>	Secreted	Neutral			X

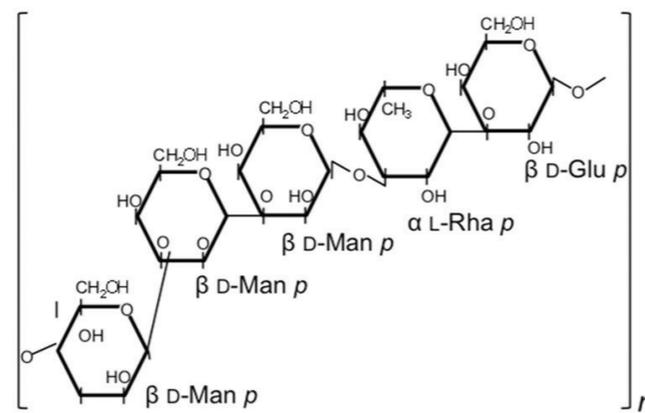
## Matriz

### exopolisacáridos

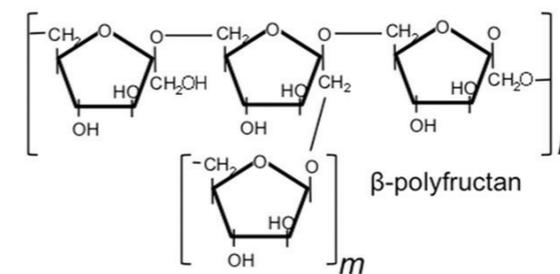
**A. PIA**



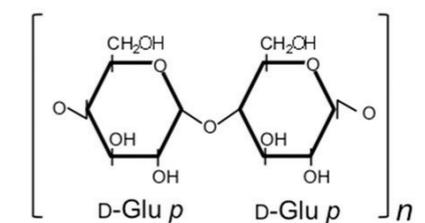
**B. Psl**



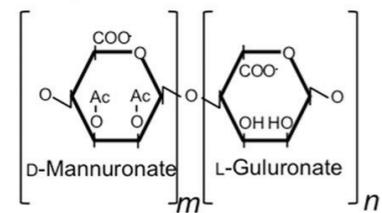
**E. Levan**



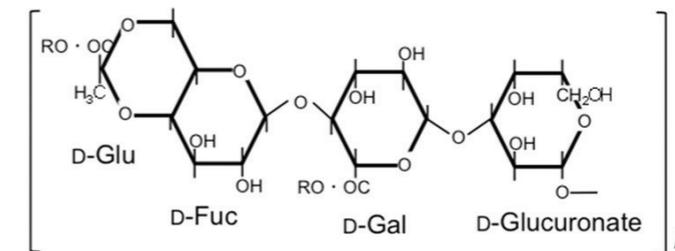
**F. Cellulose**



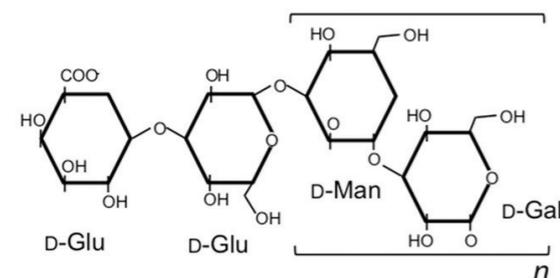
**C. Alginate**



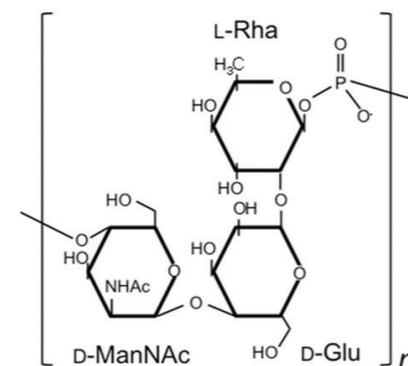
**G. Colanic acid**



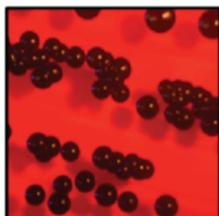
**Di. E. coli CPS (K30 Antigen)**



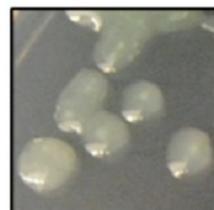
**Dii. S. pneumoniae CPS (serotype 19F)**



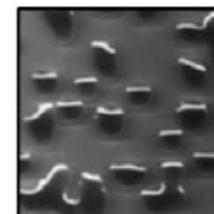
**A. S. aureus PIA**



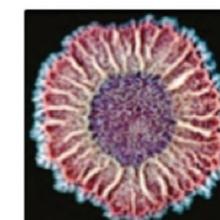
**D. P. aeruginosa Alginate**



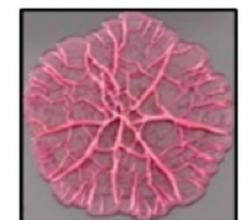
**E. E. coli Colanic acid**



**G. B. subtilis EPS**



**H. E. coli Cellulose**



### Matriz

#### ADN extracelular

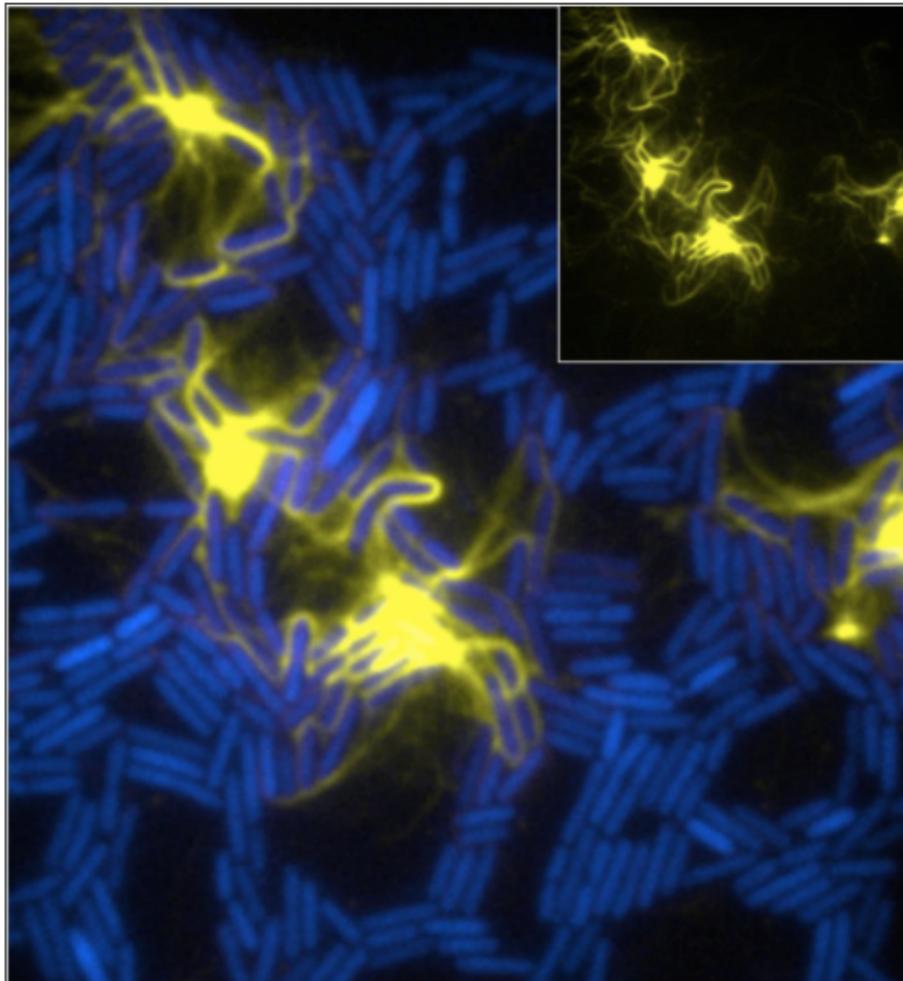
quorum sensing involucrado

tratamiento con DNAsa previene la formación de microcolonias

en algunos casos proviene de **lisis** de algunas bacterias

es regulada en el tiempo y espacio

interactúa con EPS para producir aglomerados definidos



Extracellular DNA is visualized within an *P. aeruginosa* biofilm. A biofilm of *P. aeruginosa* expressing cyan fluorescent protein (blue) that has been cultured at the interface of a glass coverslip and solidified nutrient medium supplemented with a fluorescent dye that stains extracellular DNA (yellow). Turnbull et al. report that extracellular DNA facilitates large-scale self-organization of cells in actively expanding biofilms of *P. aeruginosa*. The findings provide insights into how the intricate patterns of trails emerge during this complex multicellular behavior. Image courtesy of Erin S. Gloag, Lynne Turnbull, and Cynthia Whitchurch.

Karine A. Gibbs, et al. *J Bacteriol.* 2015 Jul;197(13):2084-2091.

pequeñas estructuras esféricas producidas por Gram -  
10-300 nm

contenido citoplasmático y periplasmico (proteasas, fosfolipasas, toxinas, OMPS, LPS, etc)

involucradas formación de biofilms, patogénesis, quorum sensing, adquisición de nutrientes, transferencia horizontal de genes y resistencia a antibióticos

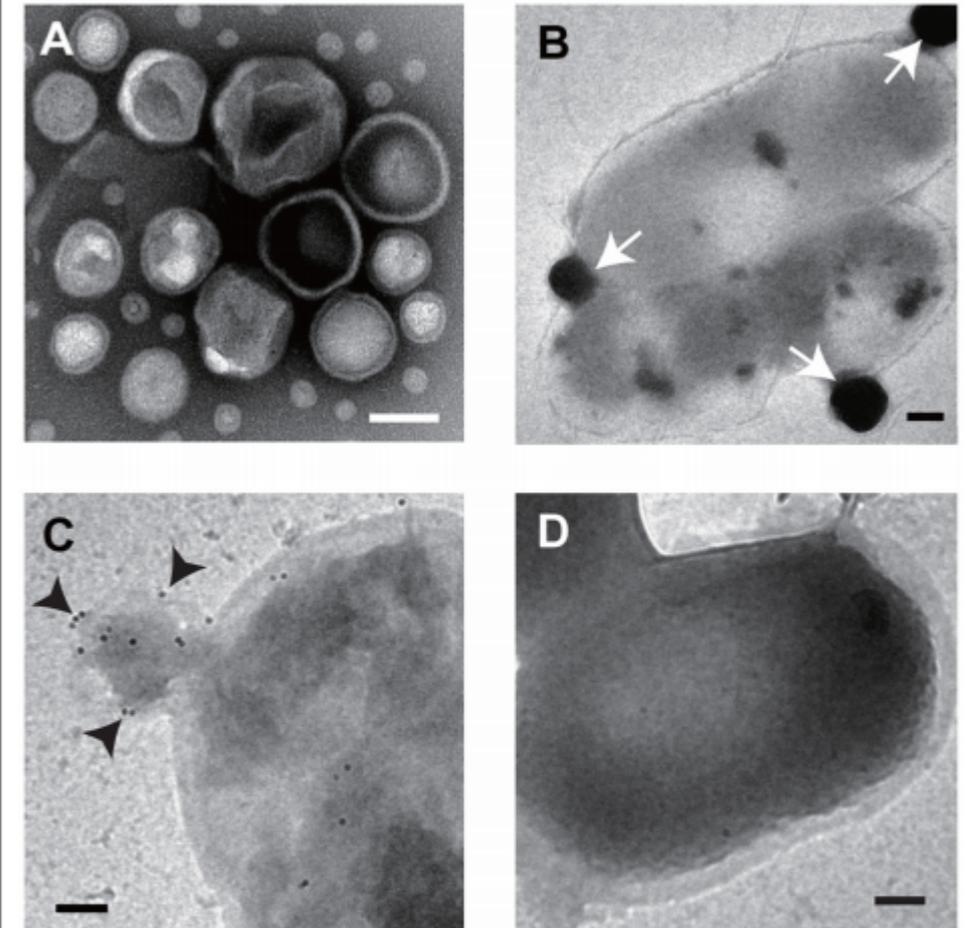
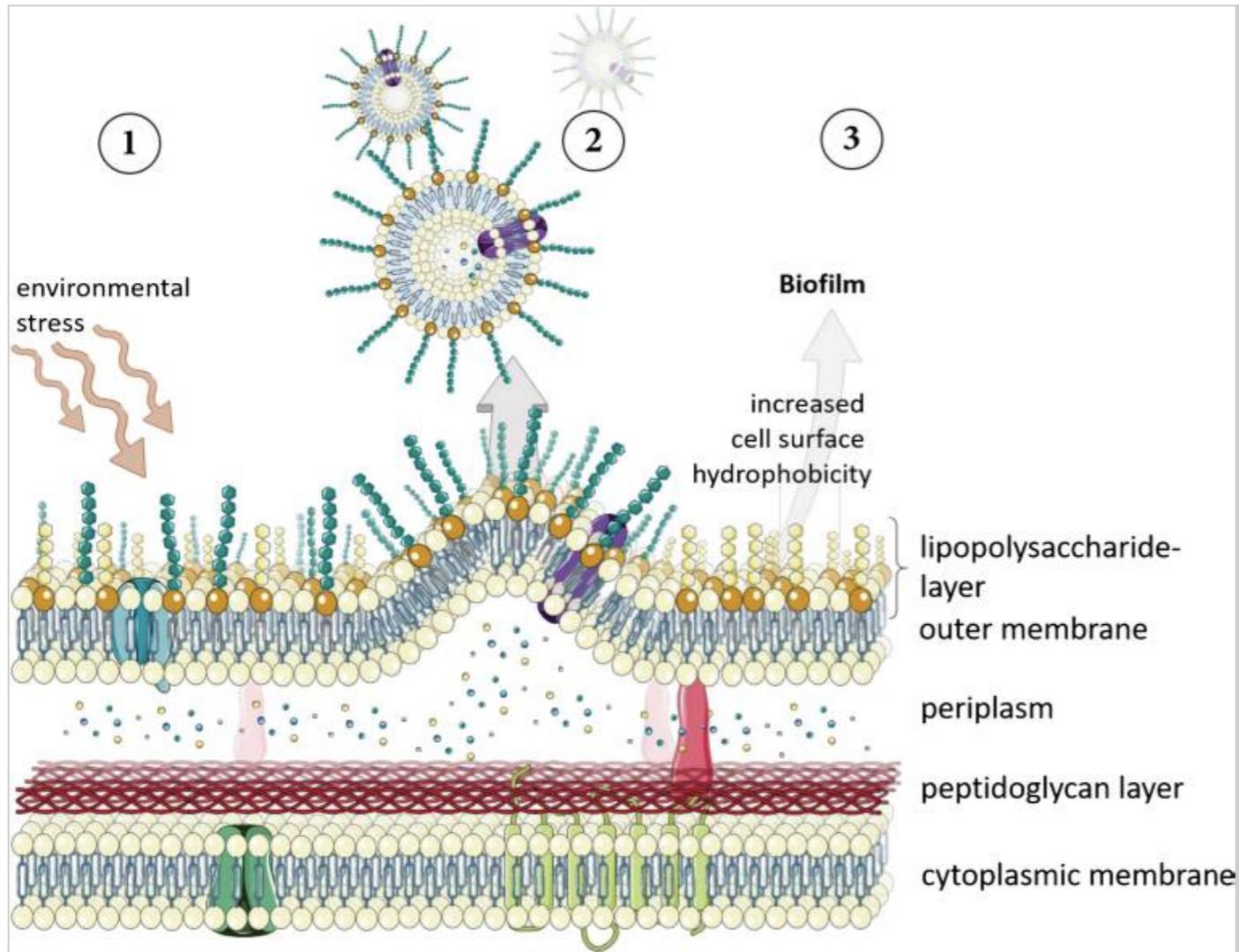
relación con el biofilm... contribuyen a la comunicación, nucleación, adquisición de nutrientes y defensa pero no es clara aún

Table 1. The relationship between biofilm and vesicle in some bacteria.

Species	Strain	Factor	Effect	Reference
<i>Helicobacter pylori</i>	TK1402	22-kDa protein	Plays an important role in biofilm formation.	Yonezawa <i>et al.</i> (2011)
<i>Francisella</i>	-	OMV	Involved in biofilm formation and forming part of biofilm matrix.	van Hoek (2013)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	CPA	Its absence causes structural defects which limit the development of mature biofilms.	Murphy <i>et al.</i> (2014)
<i>Vibrio cholerae</i>	El Tor strain C6706	OMV-associated protein DegP	Required for the secretion of biofilm matrix components and the activity strongly influences biofilm formation.	Altindis, Fu and Mekalanos (2014)
<i>Pseudomonas putida</i>	DOT-T1E	OMV	Lead to an increased hydrophobicity of cells surface which enhanced their ability to form biofilms	Baumgarten <i>et al.</i> (2012)

# Outer Membrane Vesicles (OMV)

## 3. Microcolonias y matriz



**FIGURE 3 | TEM imaging.** (A) Image of purified MVs derived from *B. agrestis* CUETM77-167. (B) Association of FM4-64-labeled MVs with cells. The white arrows indicate MVs, which have a high density due to FM4-64 labeling. (C) Association of FITC-labeled MVs with cells. Cell-associated MVs were detected by small gold particles (black arrows) through the FITC antibody. (D) Cells with no addition of MVs were reacted with FITC antibody. All bars indicate 100 nm.



### Outer Membrane Vesicles (OMV)

Existen diferencias en composición de OMV de **planctónicas** vs OMV

#### **Biofilms**

Papel en **protección** del ADN de la degradación

Mantenimiento de la integridad de la **matrix**

Gran **debate** como ADN entra en las OMV así como su rol

### Microcolonias y Macrocolonias

Biofilm recubierto de matriz (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y otros)

Barrera **protectora** contra bacteriófagos, amebas, respuesta inmune y antibióticos

### c-di-GMP y comunicación bacteriana (QS)

Transición de micro a macrocolonias es poco entendida

#### Mecanismo

simplemente el continuo crecimiento en el tiempo

inducción de la formación de macrocolonias en un momento determinado

combinación de determinantes genéticos + factores fisiológicos

Son diferentes en distribución de algunas moléculas claves

Formación y mantenimiento de los canales entre macrocolonias, necesarios para transporte de nutrientes, metabolitos y desechos

Quorum sensing (QS): proceso por el cual las bacterias **sintetizan**, **reconocen** y **responden** a moléculas señalizadoras extracelulares conocidas como **autoinductoras** (AIs) que median la comunicación intercelular.

Utilizan las concentraciones de AI en el medio para **monitorear** cambios en el **número** de bacterias y coordinar la **expresión** de genes específicos de QS.

Genes involucrados en el comportamiento bacteriano, producción de ATB, producción de biofilm, bioluminiscencia, competencia genética, especulación y virulencia.

**Principios** del QS:

1. **Síntesis** de AIs
2. **Detección** de AIs por receptores
3. **Activación** de genes específicos de QS

Algunas bacterias no producen AI pero tienen receptores

## Gram -

acyl-homoserine lactonas (**AHL**) como AI  
Homoserine lactonas N-acetiladas que  
varían en tamaño y modificaciones  
sintetizadas por **AHL sintasas** (LuxI),  
difunden o son transportadas

**Receptores** (LuxR) en ausencia de AHL  
son degradados.

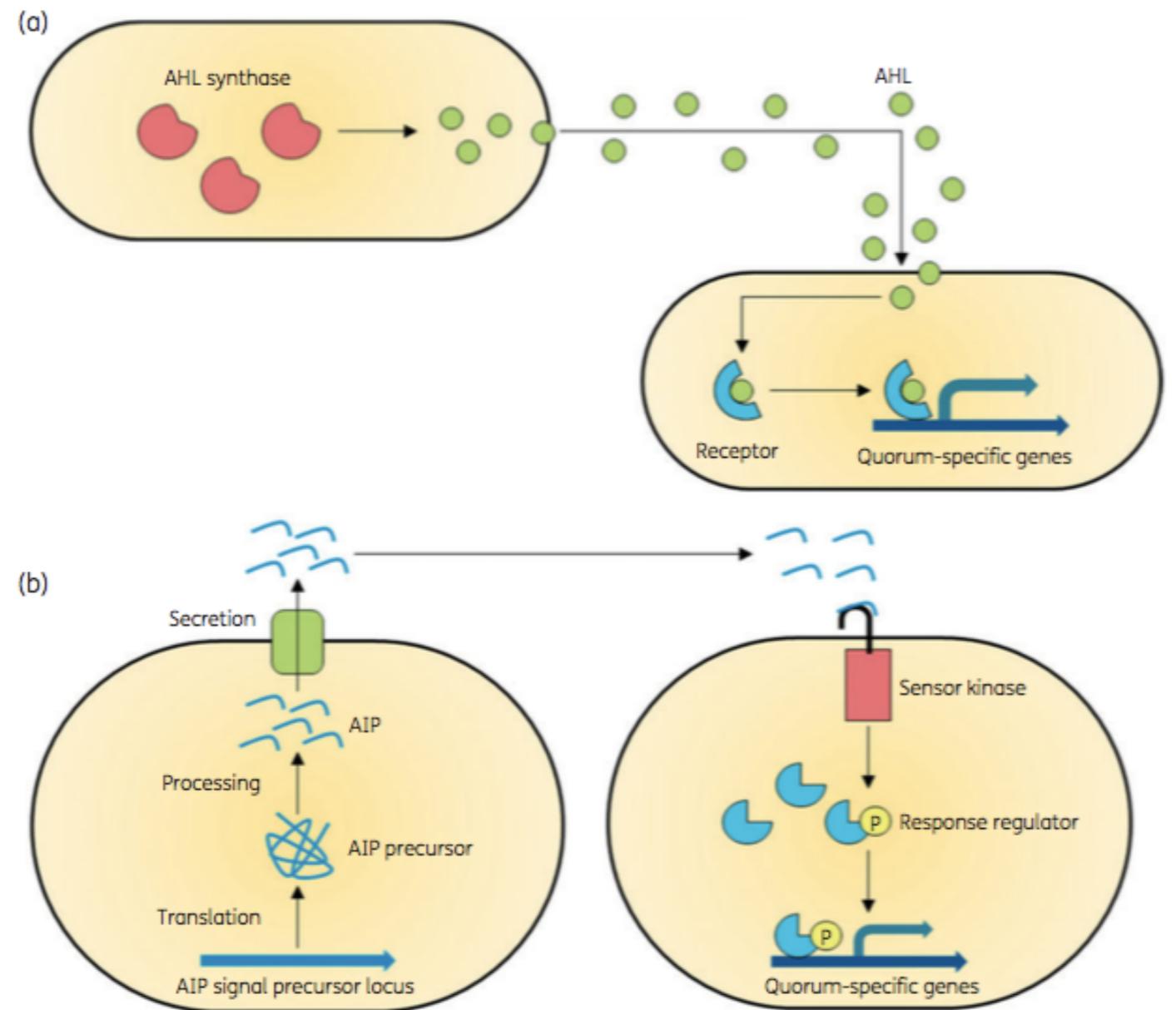
**AHL-LuxR**, dimeriza y se une al ADN y  
**transcribe** genes específicos de QS

## Gram +

oligopéptidos secretados como **AIP**  
Oligopéptidos acíclicos (lactonas  
cíclicas) precursoras dentro de la célula  
maduran a AIP que luego son  
secretadas

**Receptores** histidin-quinasa de 2  
componentes, actividad quinasa resulta  
en **autofosforilación**.

quinasa transfiere el fofostato a un  
**regulador** de respuesta **intracelular** que  
activado se une al ADN para iniciar  
**transcripción** de genes QS.



Existen AI comunes a G- y G+ como **AI-2**  
que median QA interespecies.

QS y biofilms

**mutantes** de *P. aeruginosa* en QS forman biofilms chatos y no diferenciados

**Inhibición** de QS afecta el biofilm

asociado con generación de **ADNe** y **matriz**

controla la producción de **ramnolípidos, lectinas y sideróforos**

asociado con la **dispersión**

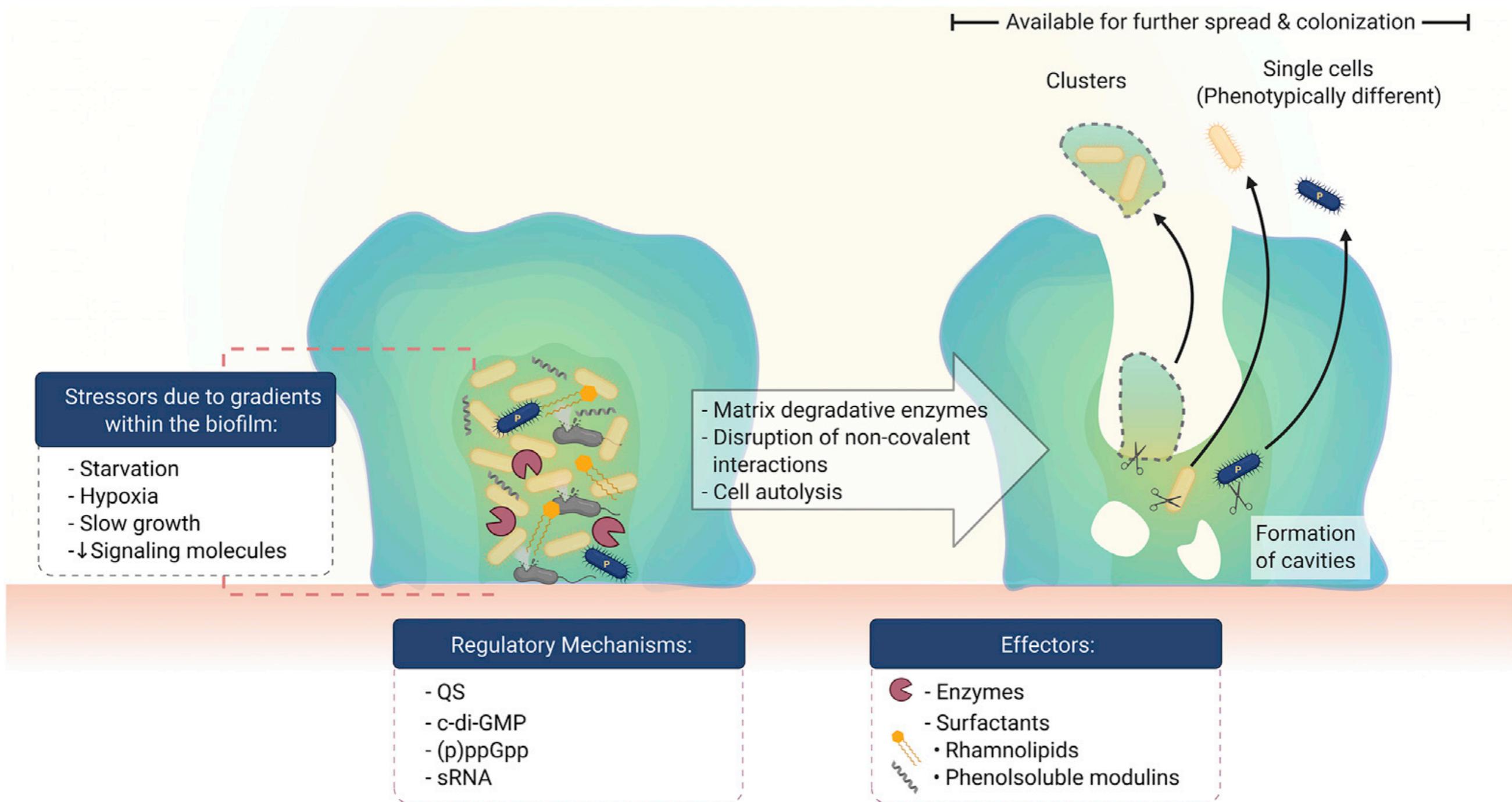
liberación **coordinada** de bacterias de dispersión  
diferenciadas  
móviles  
quemotácticas

van a colonizar nuevas superficies y comenzar el ciclo

puede correlacionar con programa de muerte de sub-poblaciones de bacterias

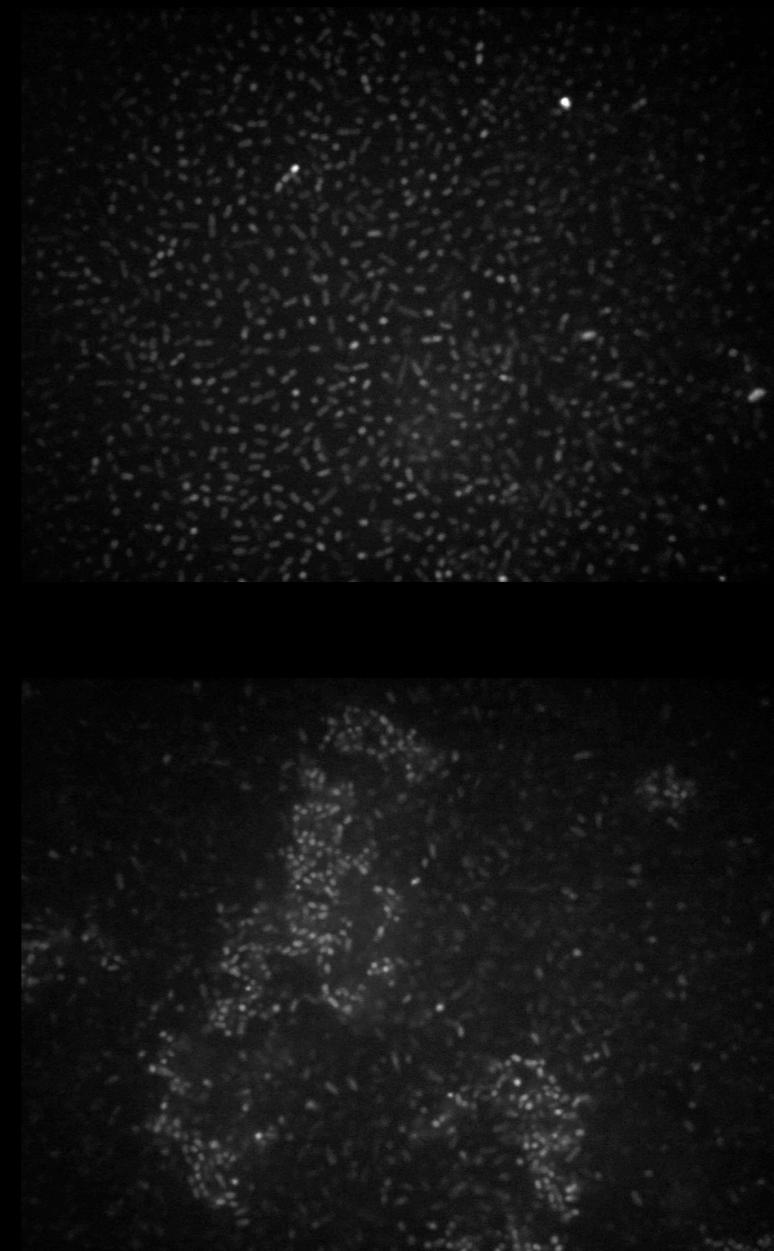
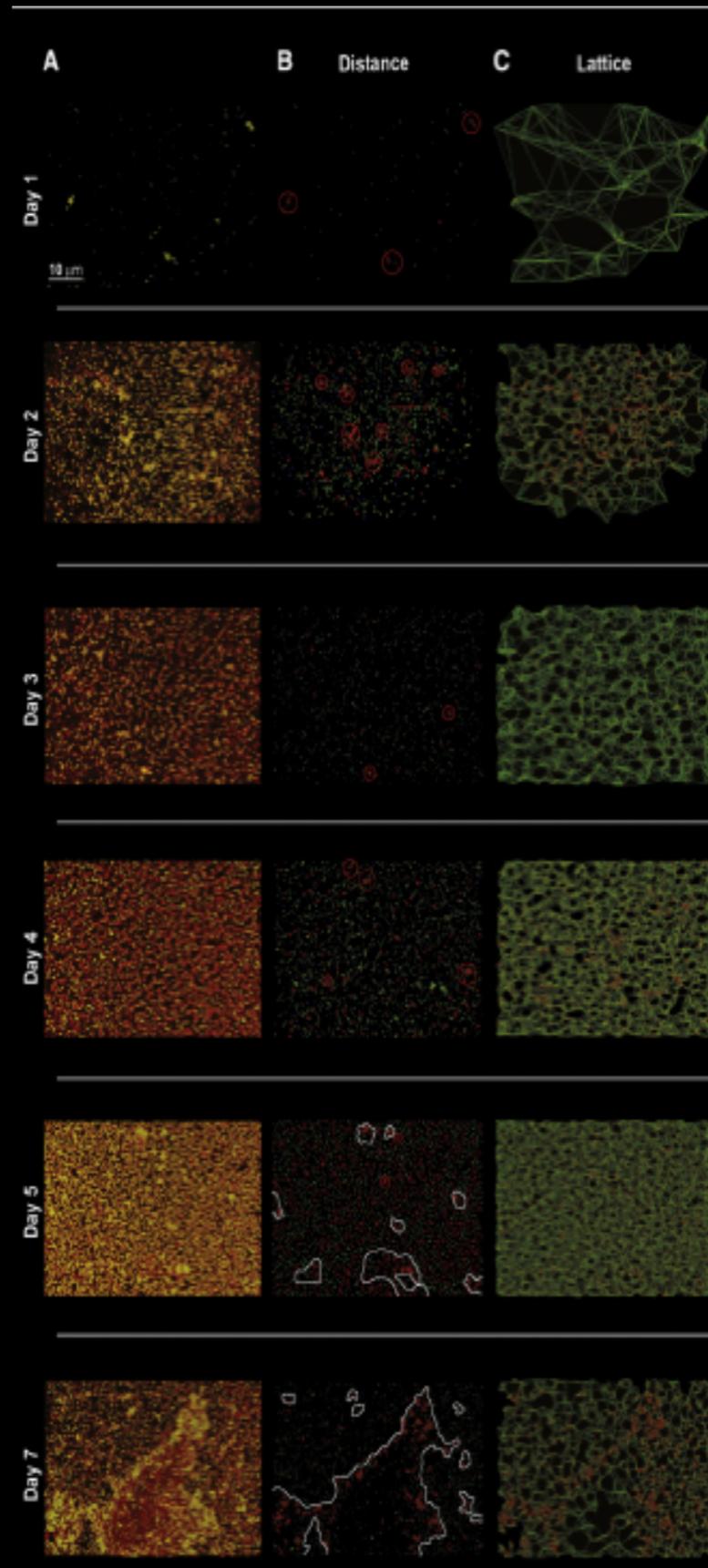
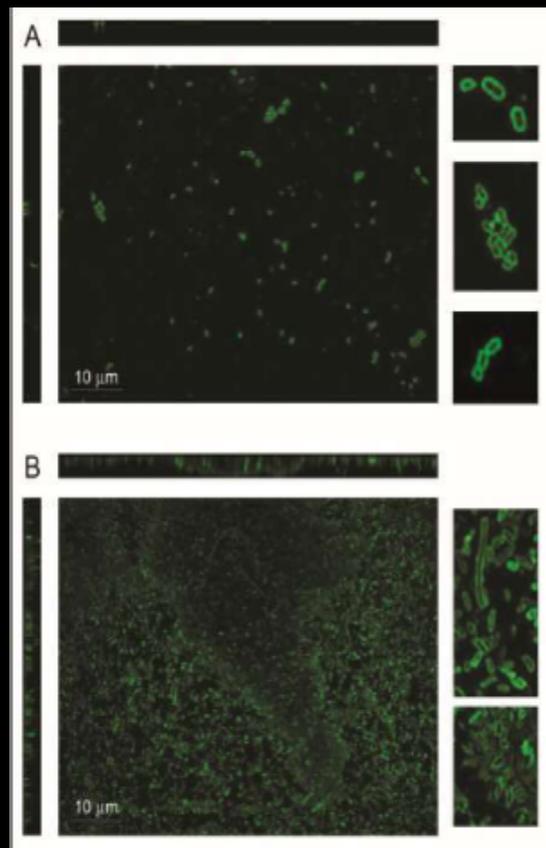
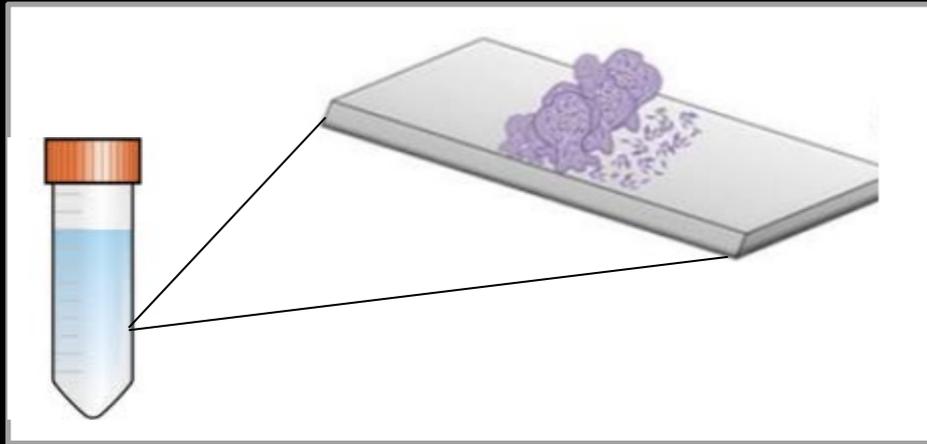
asociado con **gradientes** específicos de nutrientes y O<sub>2</sub>

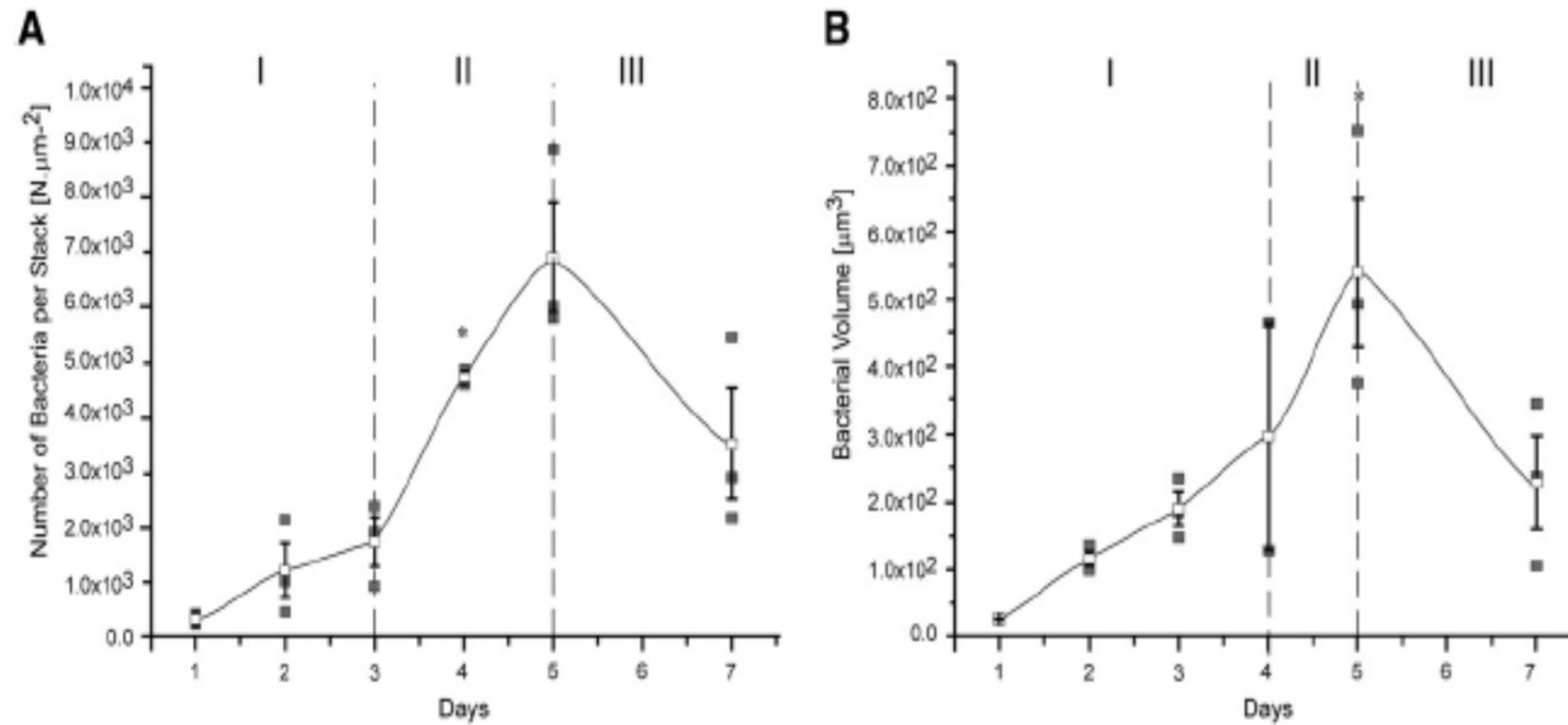
**down regulation** de genes del fenotipo biofilm como exopolisacáridos y fimbrias y **up regulation** de flagelos y factores quemotaxis



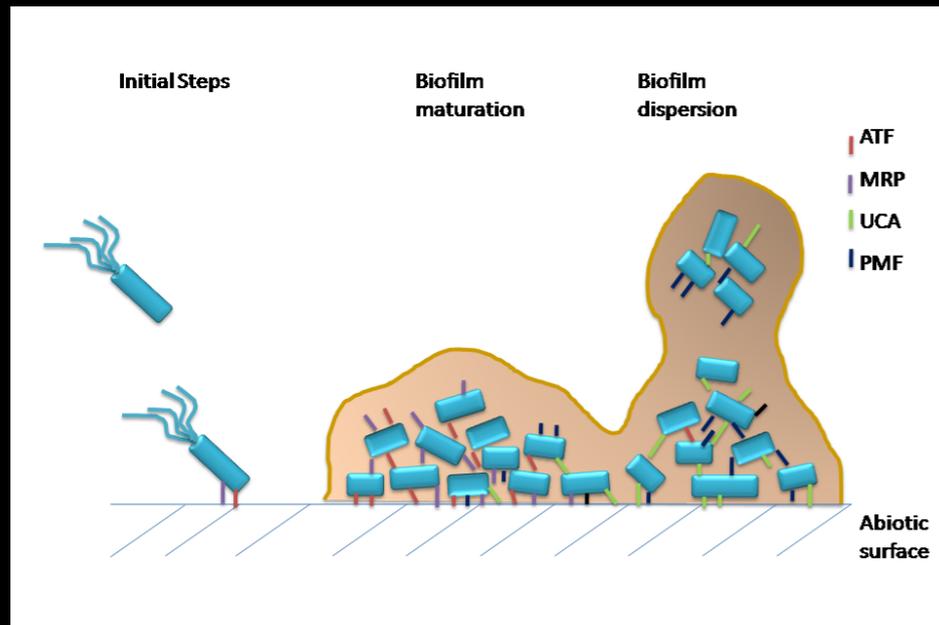
# Modelo estático

# Formación de biofilms *P. mirabilis*

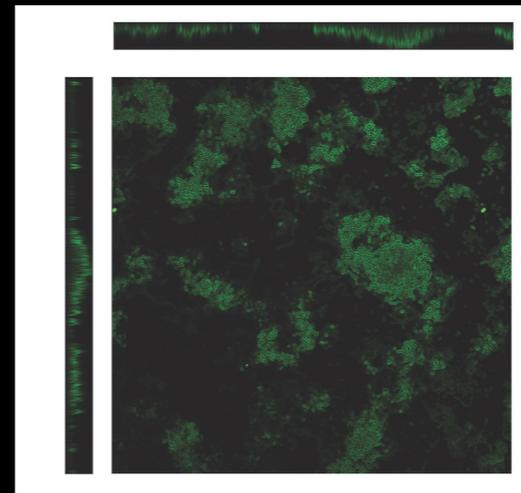




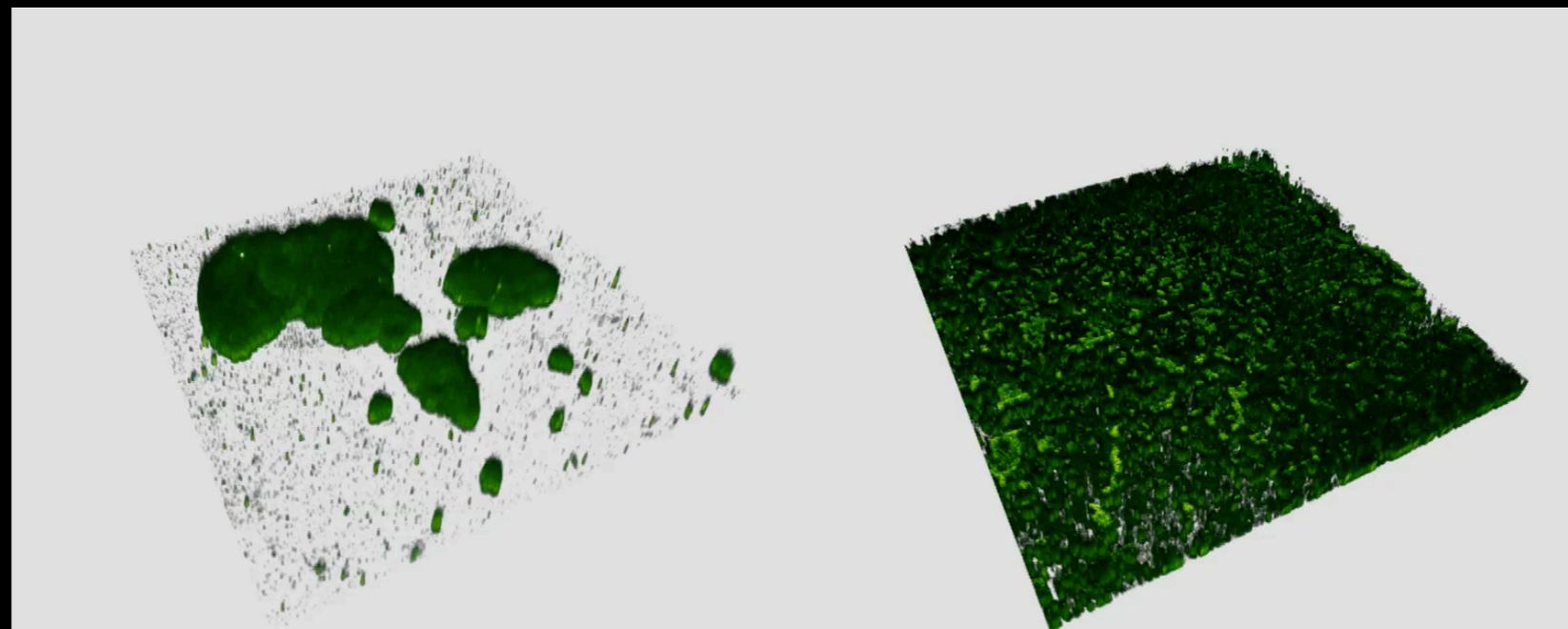
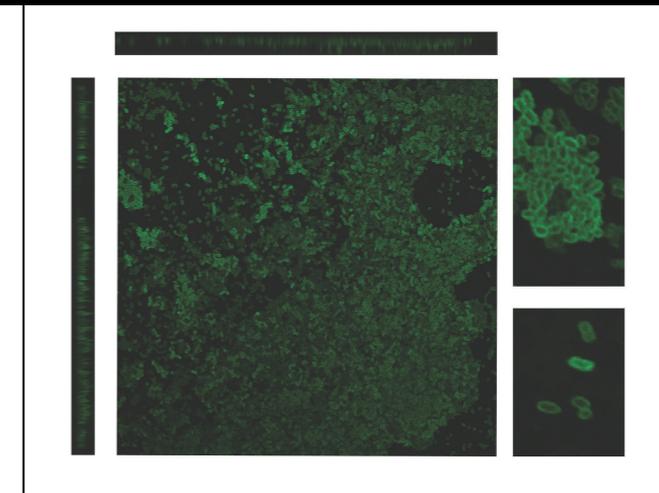
Parámetros morfo-topológicos obtenidos de las imágenes



Mutant UCA



Mutant MR/P



# Formación de biofilms *P. mirabilis*

**Table 7**

Factors involved in biofilm formation

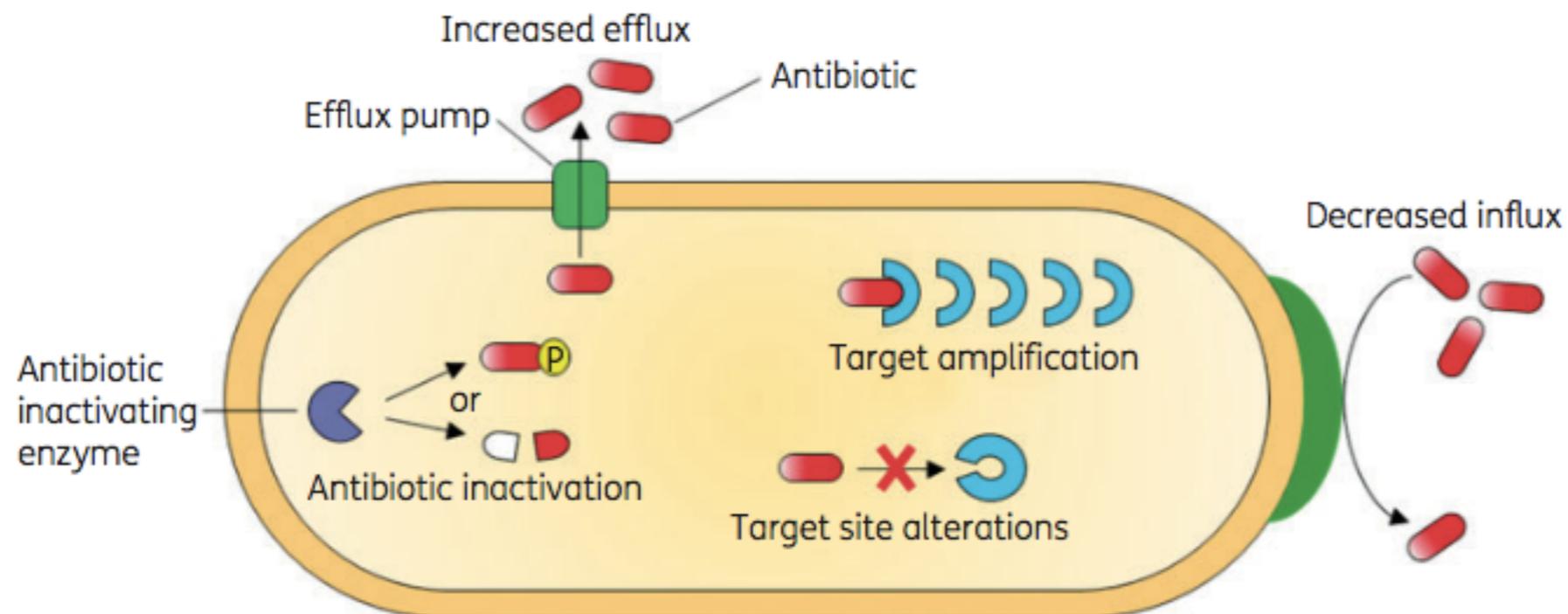
Biofilm Factor	Proposed Role	Reference
Urease	Nickel metalloenzyme, local increase in pH causes mineral deposition which facilitates crystalline biofilms	(5, 30, 306)
MR/P fimbriae	Adherence and auto-aggregation; mutants are defective in biofilm formation	(44, 177, 244, 256, 275)
Fimbria 10 (PMI2210)	Adherence; mutant has increased biofilm (perhaps due to fimbrial cross-talk)	(177)
UCA, PMF, and ATF fimbriae	Mutations have varying effects on biofilms (CFU, matrix) depending on culture conditions	(256)
RcsBCD (RsbA) phosphorelay	Phosphorelay system that enhances extracellular polysaccharide production; may control biofilm formation via regulation of fimbriae	(140, 177, 279)
Pst transporter	High-affinity phosphate transporter, mutants are defective in biofilm formation	(297)
Capsule or extracellular polysaccharides	Facilitates mineral aggregation into crystalline biofilms and bacterial colonization	(282–284)
LPS	<i>P. mirabilis</i> with different LPS charges vary in biofilm formation; <i>pmrI</i> LPS modification mutant and <i>waaE</i> inner-core LPS biosynthetic protein mutant are biofilm-defective	(53, 280, 281)
RsmA	RNA binding protein; expression of <i>P. mirabilis rsmA</i> in <i>Escherichia coli</i> suppresses biofilm	(307)
Ppk	Polyphosphate kinase; may act by regulating MR/P fimbriae	(308)
Hfq	RNA chaperone; may act by regulating MR/P fimbriae or motility	(164)
GlnE	Glutamate-ammonia ligase adenylyltransferase; mutant has increased biofilm	(177)
Lrp	Leucine-responsive regulator	(177)
NirB	Nitrate reductase; biofilm-deficient in crystal violet assay and takes longer to block catheters	(177)
Bcr	Multidrug efflux pump; mutant has increased biofilm but takes longer to block catheters	(177)
GltS	Sodium/glutamate symport carrier protein	(177)
PMI1551	Putative lipoprotein	(177)
PMI1608	Unknown; biofilm-deficient in crystal violet assay but blocks catheters more rapidly	(177)
PMI2861	Putative membrane protein	(177)
PMI3402	MuA-like DNA binding protein; mutant has increased biofilm in crystal violet assay and blocks catheters more rapidly	(177)

Implicadas en la **resistencia** a **antibióticos**  
evidencia creciente rol en **biofilms**

**WHO** lista de los 12 patógenos MDR (**ESKAPE**) se necesita desarrollo de nuevos antimicrobianos. Prioridad **crítica, alta** y **media**. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and various Enterobacteriaceae (including *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, and *Proteus*). **ESKAPE+**

**Adquisición y desarrollo** de resistencia

1. **mutaciones** y **transferencia horizontal de genes**
2. **mecanismos** de resistencia
3. **biofilms**



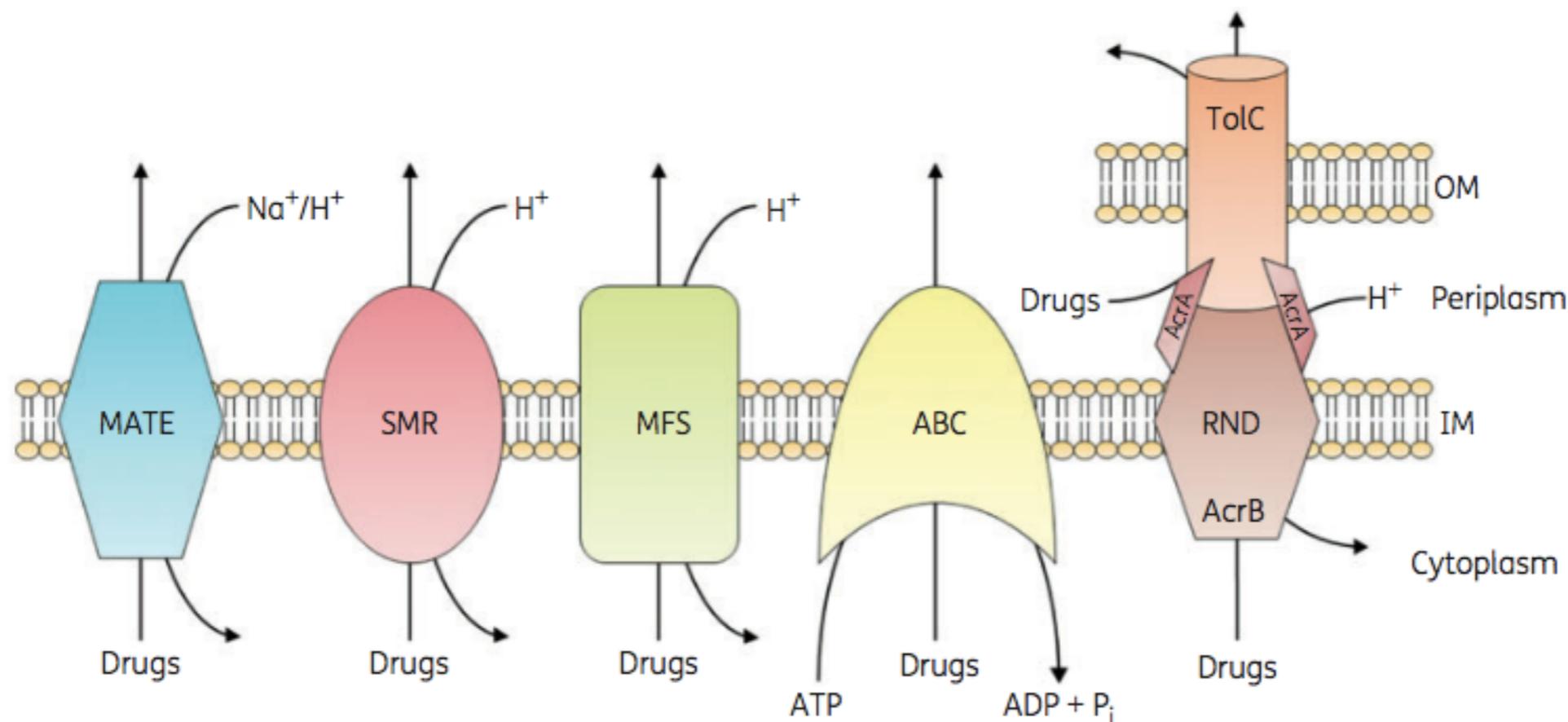
**Proteínas de membrana** involucradas en **exportar** sustancias nocivas desde el interior celular al medio externo

**ubiquas**

genes **cromosómicos** y en **plásmidos** (elementos móviles)

exportan una amplio rango de sustancias: **antibióticos**, **detergentes**, **colorantes**, **toxinas** y **desechos** metabólicos.

**5 superfamilias** de bombas asociadas con MDR



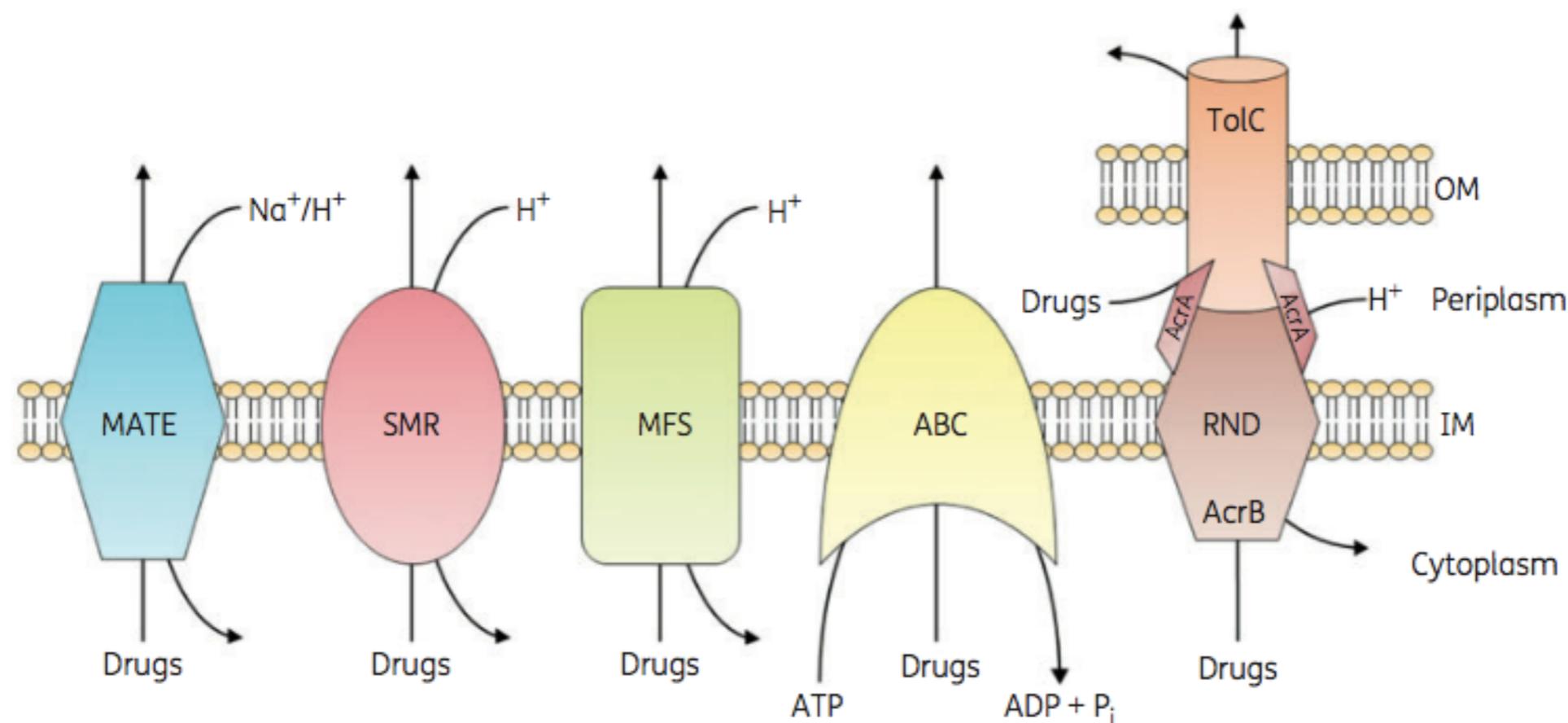
**MATE:** Multidrug and toxin extrusion

**SMR:** Small multidrug resistance

**MFS:** Major facilitator superfamily, muy estudiadas en Gram + (*S. aureus* NorA exporta fluoroquinolonas y amonios cuaternarios)

**ABC:** ATP-Binding cassette

**RND:** resistance-nodulation division, solo en Gram - (*E. coli* y *Salmonella* enterica AcrAB-TolC; *P. aeruginosa* MexAV-OprM; *A. baumannii* AdeABC) utilizan energía de las bombas protón/sodio excepto las ABC que usan hidrólisis de ATP



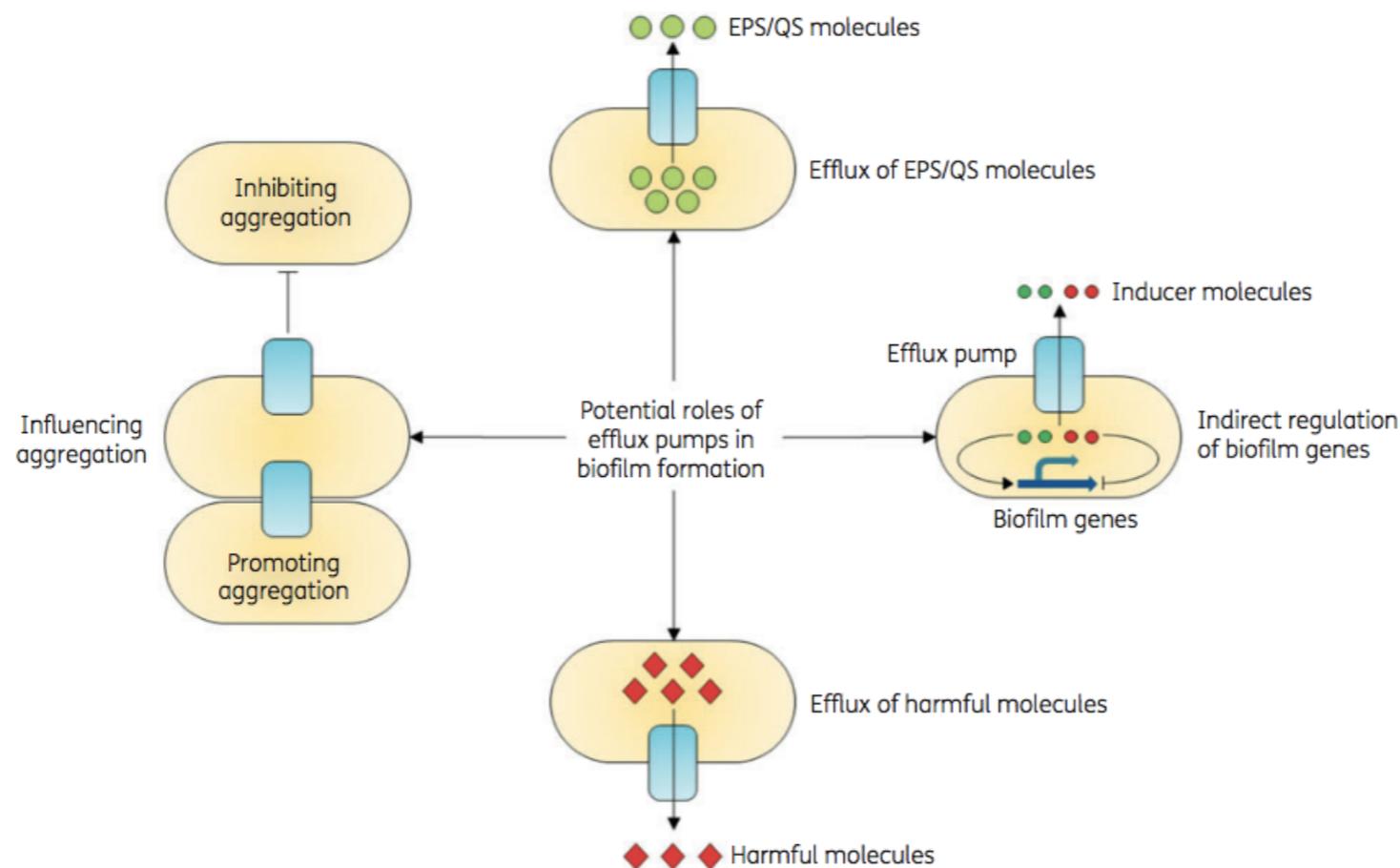
Formación de **biofilms**, quorum sensing (QS), patogenicidad y virulencia

**eflujo** de moléculas de EPS/QS y quorum quenching facilita la formación de matriz y regula QS

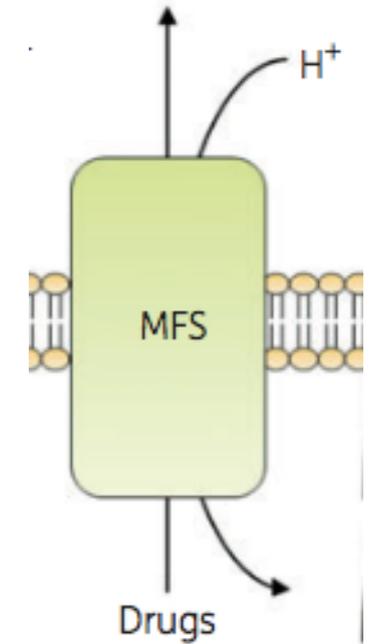
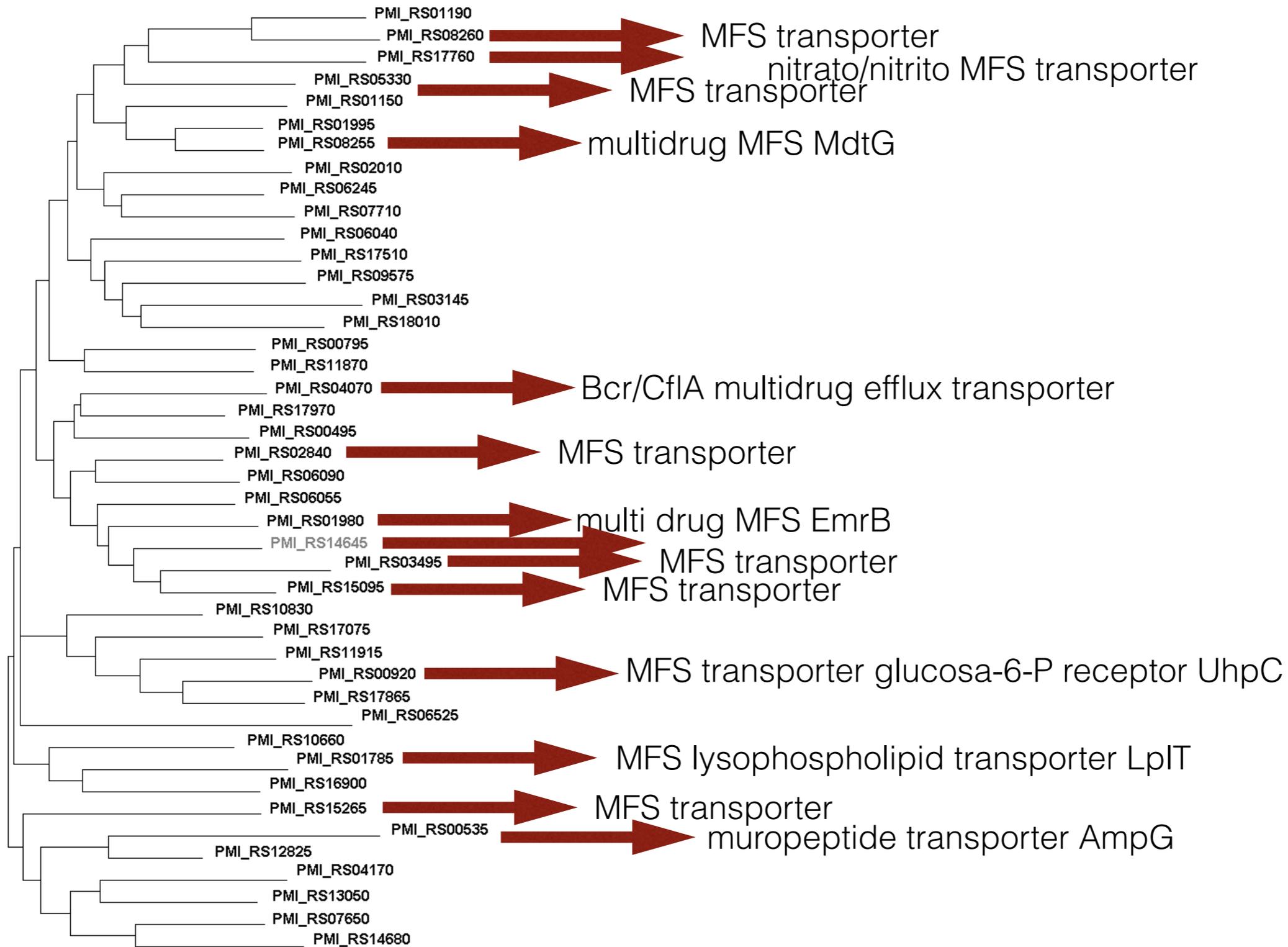
**regulación** indirecta de **genes** involucrados en la formación de biofilms

**eflujo** de moléculas **tóxicas** (antibióticos, metabolitos intermediarios)

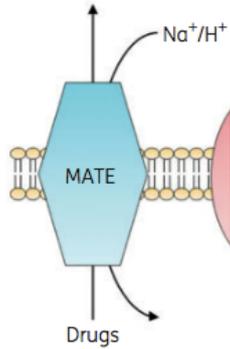
influencia en **agregación** promoviendo o previniendo la adhesión



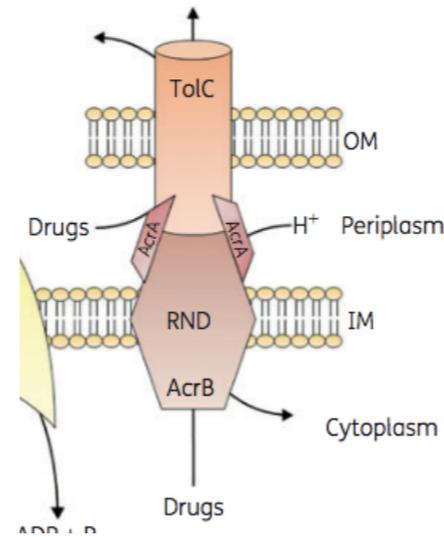
## *Proteus mirabilis* bombas del tipo MFS



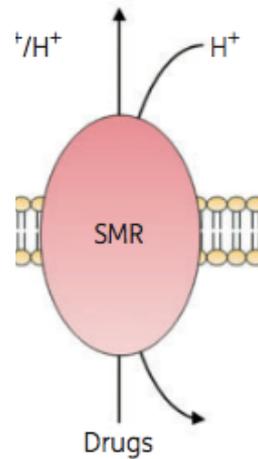
## *Proteus mirabilis* bombas



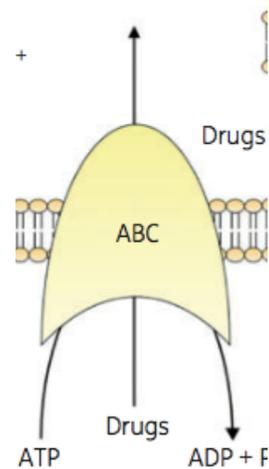
PMI\_RS00720



- PMI\_RS13340 MexH adaptor
- PMI\_RS00635 permeasa
- PMI\_RS17910 permeasa
- PMI\_RS13345 MexW/MexI
- PMI\_RS17905 transporter
- PMI\_RS00640 MexE adaptor



- PMI\_RS13360 QacE quaternary ammonium efflux transporter
- PMI\_RS13355 QacE quaternary ammonium efflux transporter
- PMI\_RS17830 SugE quaternary ammonium compound-resistant protein

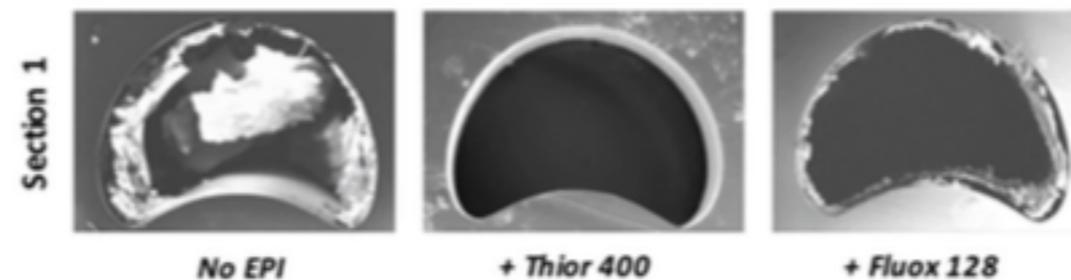
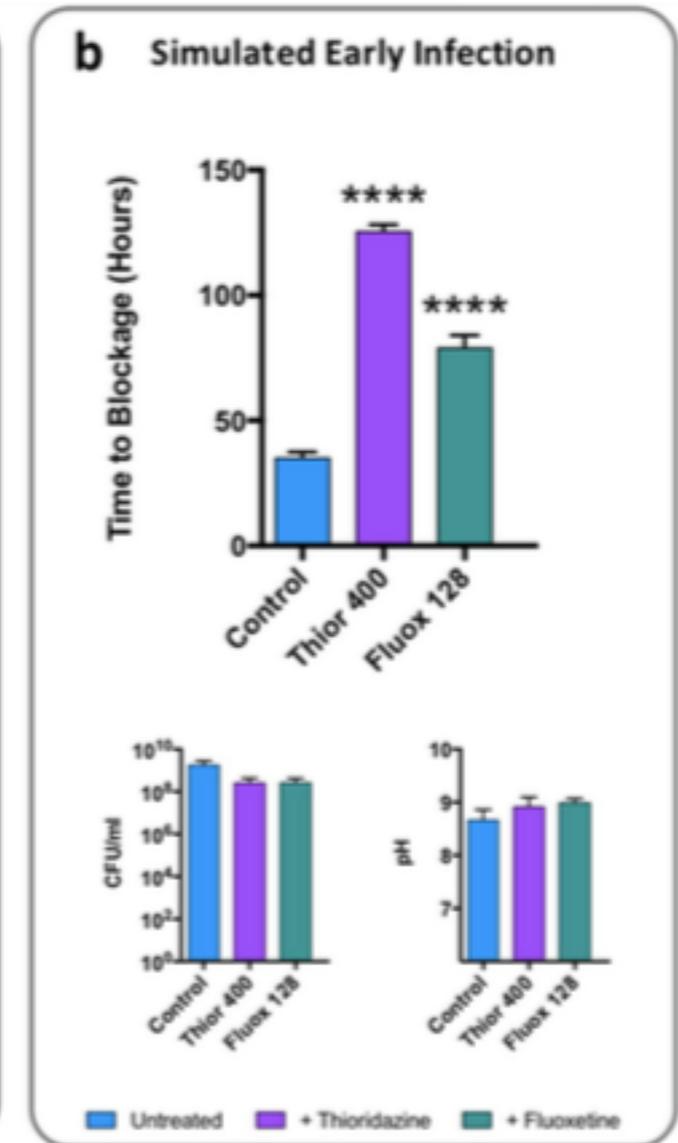
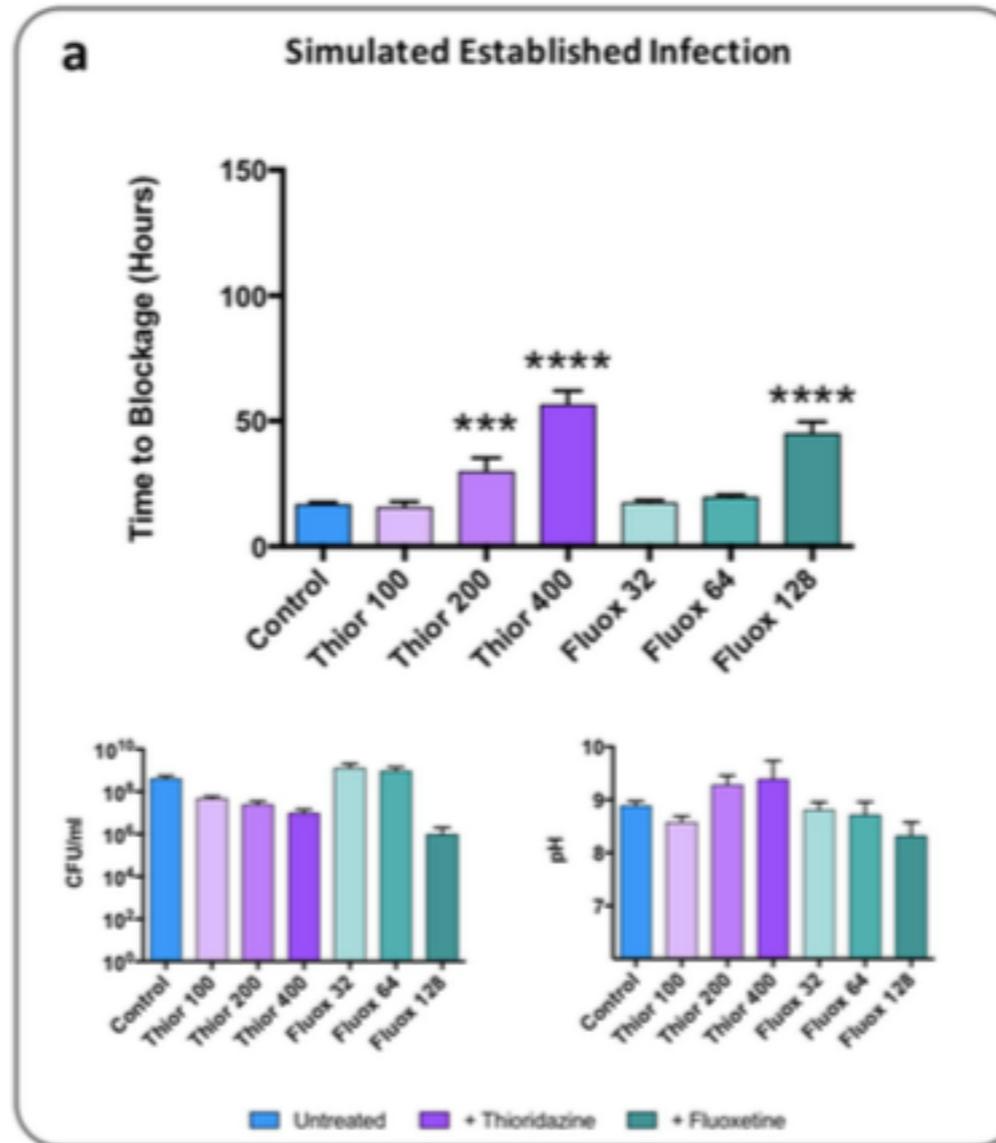
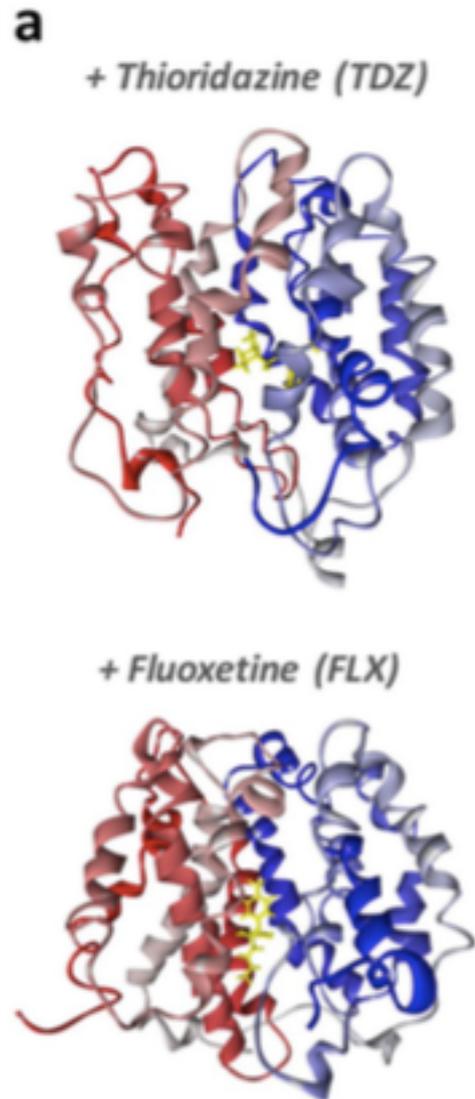


172 genes que codifican para ABC transporters

## EPI (Efflux pump inhibitors)

**Thioridazine:** antipsychotic drug

**Fluoxetine:** serotonin re-uptake inhibitor (prozac)



Proceso altamente **programado**

se esperaría tener un set de “**genes de biofilms**” expresados

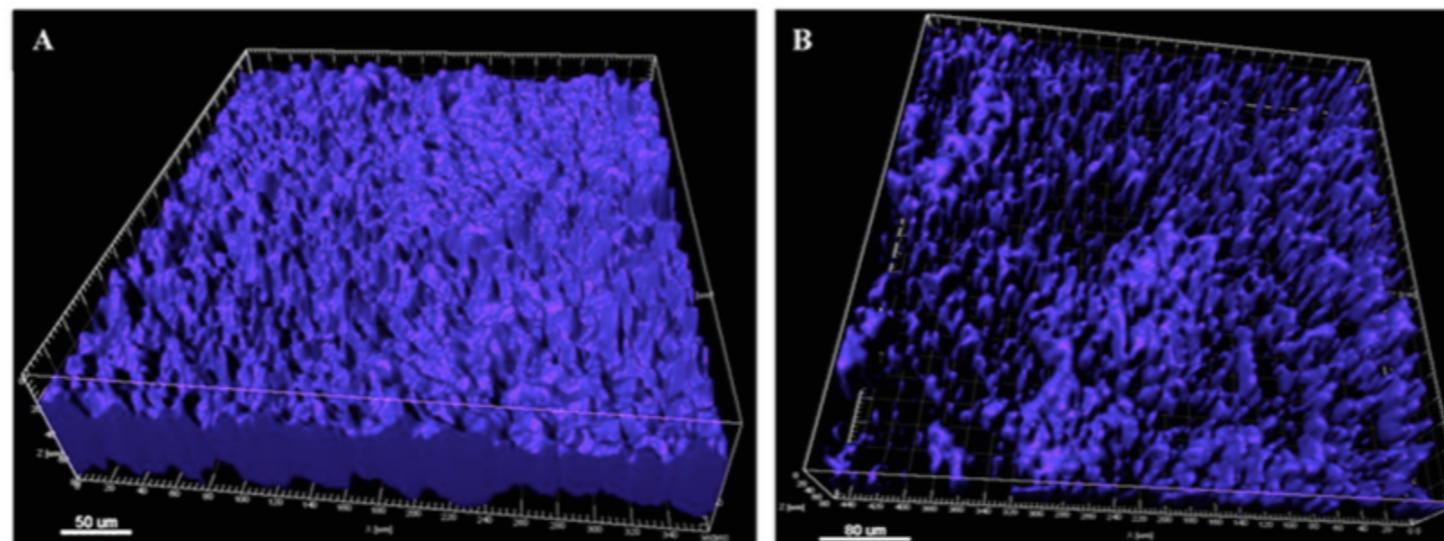
Análisis transcriptómicos han **fallado** en encontrar biofilms **regulones**.

estaría entonces gobernando por **respuestas adaptativas** dependiente de condiciones **nutricionales** que cambia en respuesta a las condiciones ambientales.

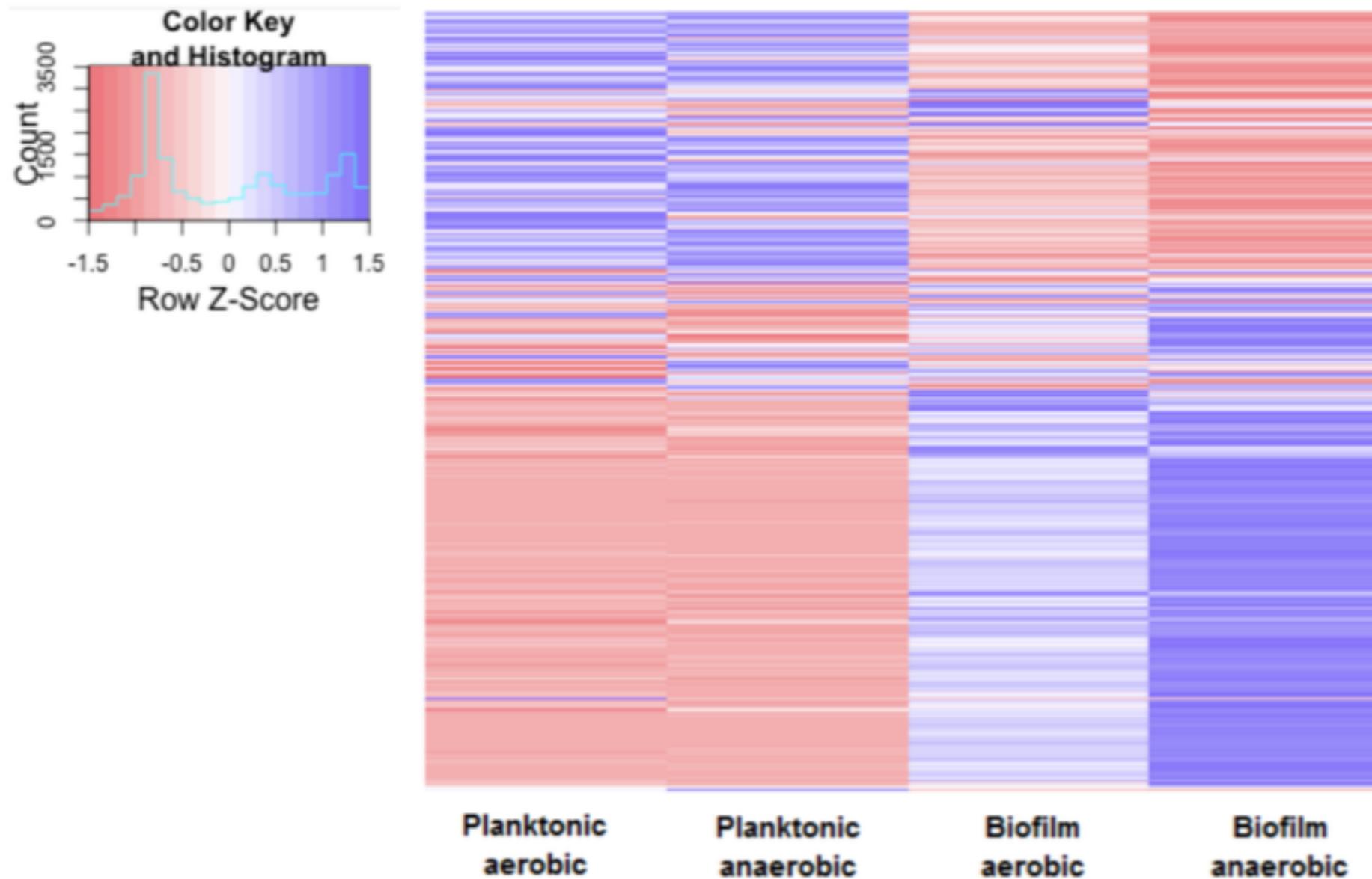
**Si** requiere la expresión de genes asociados a los productos de **matriz** era **ómica** contribuirá al entendimiento de los biofilms

## ***Escherichia coli***

condiciones de cultivo aerobias y anaerobias en biofilm y planctónicas



**Figure 1. Biofilms of *E. coli* strain MG1655.** Biofilms cultured (A) for 3 days under aerobic conditions and (B) for 6 days under anaerobic conditions. The



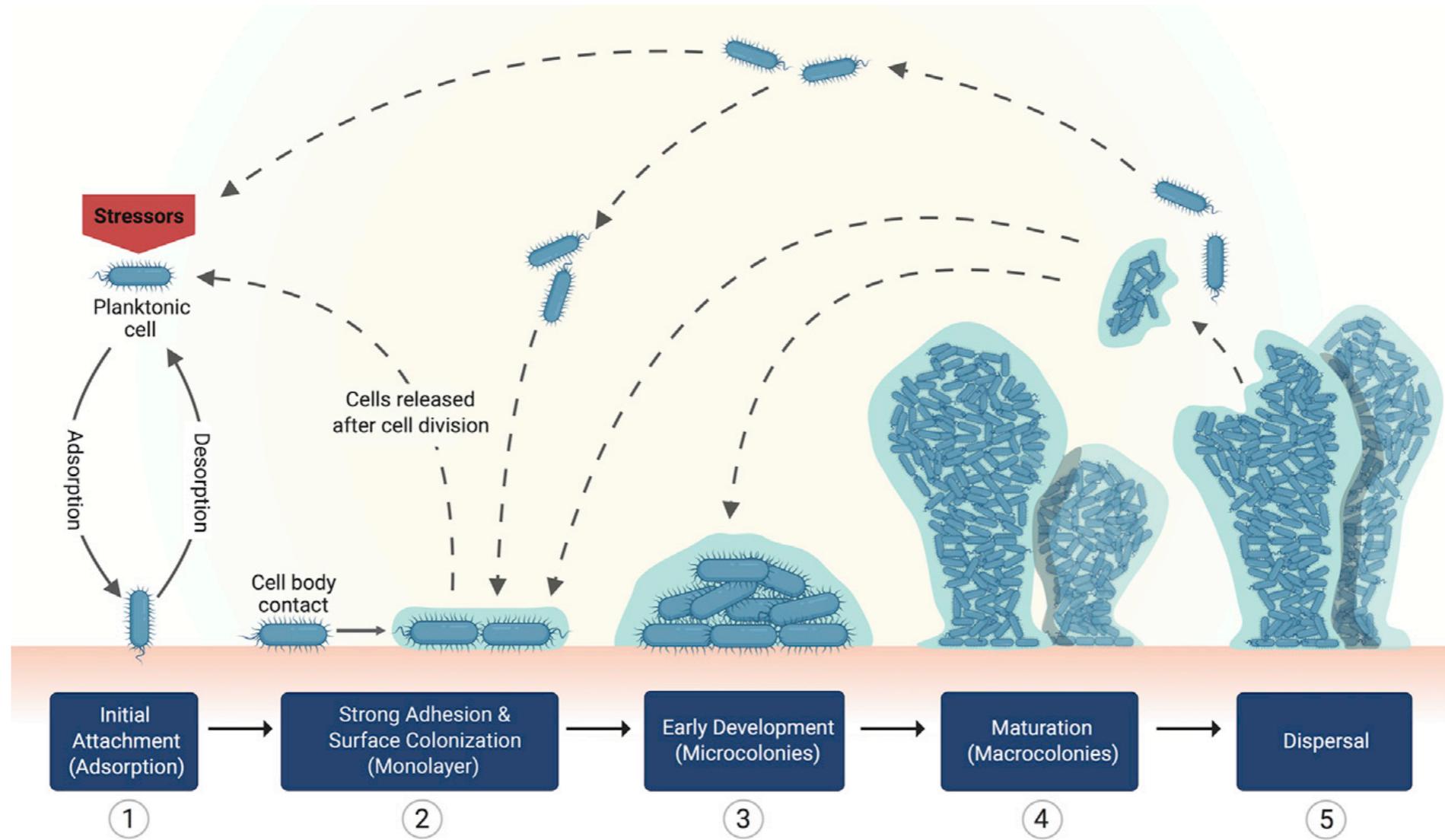
**Figure 2. Whole-gene expression profile of planktonic and biofilm cultures growing under aerobic and anaerobic conditions. A heatmap of a hierarchal cluster of**

Function		Name	Product	Fold difference
<i>Amino acids</i>	Asparagine	<i>asnA &amp; B</i>	asparagine synthetase A & B	*
	Aspartate	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit	-2.69
	Glutamine	<i>glnB</i>	regulatory protein P-II for glutamine synthetase	-2.79
		<i>glnA</i>	glutamine synthetase	-5.17
		<i>gltD</i>	glutamate synthase, 4Fe-4S protein, small subunit	-2.54
	Histidine	<i>hisL</i>	his operon leader peptide	-3.55
	Isoleucine & valine	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase, NAD(P)-binding	-3.04
		<i>ilvL</i>	ilvG operon leader peptide	-6.57
	Lysine	<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase	-2.66
		<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	-4.1
	Phenylalanine	<i>pheL</i>	pheA gene leader peptide	-4.4
		<i>aroG</i>	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, phenylalanine repressible	-2.69
	Serine	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-4.21
<i>serC</i>		3-phosphoserine/phosphohydroxythreonine aminotransferase	-2.62	

Function	Name	Product	Fold difference	
Membrane structure	<i>cvpA</i>	membrane protein required for colicin V production	-2.86	
	<i>gnsB</i>	Qin prophage; multicopy suppressor of secG(Cs) and fabA6(Ts)	-2.67	
	<i>lpp</i>	murein lipoprotein	-8.8	
	<i>pal</i>	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	-5.47	
	<i>slyB</i>	outer membrane lipoprotein	-3.09	
	<i>spr</i>	mutational suppressor of prc thermosensitivity, outer membrane lipoprotein	-3.12	
	<i>mipA</i>	scaffolding protein for murein synthesizing machinery	-3.38	
	<i>safA</i>	two-component system connector membrane protein, EvgSA to PhoQP	4.38	
	Membrane-bound ATP synthase	<i>atp A, C, D, G, H</i>	F1 sector, subunit $\alpha$ , $\epsilon$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ respectively	*
		<i>atp B, E, F</i>	F0 sector, subunit a, c, b respectively	*
Motility	<i>bdm</i>	biofilm-dependent modulation protein	-2.61	
	<i>csrA</i>	pleiotropic regulatory protein for carbon source metabolism	-4.4	
	<i>fimA</i>	major type 1 subunit fimbrin (pilin)	-22.52	
	<i>flgB &amp; C</i>	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	*	
	<i>flgK &amp; L</i>	flagellar hook-filament junction protein 1	*	
	<i>fliA</i>	RNA polymerase, sigma 28 (sigma F) factor	-3.79	

Function	Name	Product	Fold differe
Transport	<i>acrZ</i>	AcrAB-TolC efflux pump accessory protein, membrane-associated	-3.84
	<i>cyoA</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	-3.159
	<i>exbB</i>	membrane spanning protein in TonB-ExbB-ExbD complex	-2.679
	<i>fliY</i>	cystine transporter subunit	-3.19
	<i>glnH</i>	glutamine transporter subunit	-4.084
	<i>malE</i>	maltose transporter subunit	-2.835
	<i>ompC</i>	outer membrane porin protein C	-4.72
	<i>ompF</i>	outer membrane porin 1a (Ia;b;F)	-12.51
	<i>ompX</i>	outer membrane protein X	-7.32
	<i>proV</i>	glycine betaine transporter subunit	-3.55
	<i>sbp</i>	sulfate transporter subunit	-2.88
	<i>secB</i>	protein export chaperone	-4.235
	<i>secE &amp; G</i>	preprotein translocase membrane subunit	*
	<i>skp</i>	periplasmic chaperone	-6.4
	<i>tatA</i>	TatABCE protein translocation system subunit	-2.63
	<i>tolB</i>	periplasmic protein	-2.606
<i>tsx</i>	nucleoside channel, receptor of phage T6 and colicin K	-2.56	

# Biofilms



Gracias!

Microbial Biofilms 2nd edition

Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation, Ilyas Alav, J Mark Sutton, Khondaker Miraz Rahman; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, , dky042, <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>

Genome-wide transcription profiling of aerobic and anaerobic Escherichia coli biofilm and planktonic cultures. Bayramoglu B, Toubiana D, Gillor O. FEMS Microbiol Lett. 2017 Feb 1;364(3). doi: 10.1093/femsle/fnx006.

Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by Proteus mirabilis. Nzakizwanayo J, Scavone P, Jamshidi S, Hawthorne JA, Pelling H, Dedi C, Salvage JP, Hind CK, Guppy FM, Barnes LM, Patel BA, Rahman KM, Sutton MJ, Jones BV. Sci Rep. 2017 Sep 22;7(1):12222. doi: 10.1038/s41598-017-12445-w.

Fimbriae have distinguishable roles in Proteus mirabilis biofilm formation. Scavone P, Iribarnegaray V, Caetano AL, Schlapp G, Härtel S, Zunino P. Pathog Dis. 2016 Jul;74(5). pii: ftw033. doi: 10.1093/femspd/ftw033

Development of 3D architecture of uropathogenic Proteus mirabilis batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. Schlapp G<sup>1</sup>, Scavone P, Zunino P, Härtel S. J Microbiol Methods. 2011 Nov;87(2):234-40. doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.021. Epub 2011 Aug 12.

Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, Mah TF, Griffith M, Alarcon EI. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. iScience. 2021 Apr 17;24(5):102443. doi: 10.1016/j.isci.2021.102443. PMID: 34013169; PMCID: PMC8113887.