

Microscopía para el Estudio de Biofilms Bacterianos

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)
Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI), ICBM, F-Med, U-Chile

2 - 6 de octubre - Teórico
9 - 13 de octubre - Práctico Uy.
30 de octubre - 3 de noviembre - Práctico Cl.

Docentes

Paola Scavone (uy)
Steffen Härtel (cl)
Pablo Zunino (uy)
Jorge Jara (cl)
Eduardo de Mello (uy)
Erlen Cruz (uy)
Víctor Castañeda (cl)
Claudia Etchebehere (uy)
Nicole Canales (cl)
Nicolás Navarro (uy)
Karina Palma (cl)
Luciana Robino (uy)
Dante Castagnini (cl)
Maria José González (uy)
Juan Eduardo Rodríguez (cl)
Martín Cádiz (cl)

Temáticas

Modelos para el Estudio de Biofilms
Relevancia y Características Genéticas
Nanotecnología Aplicada a Biofilms
Etapas de Formación de Biofilms
Expresión Génica y Quorum Sensing
Microscopía Aplicada a la Microbiología
Light-sheet Microscopy
Expansion Microscopy

Modalidad

Sesiones Teóricas (online) - Sesiones Prácticas (presenciales)
Horas Lectivas: 30 - Horas Prácticas: 26

Organizadores

Paola Scavone (uy) - Steffen Härtel (cl)

Inscripciones

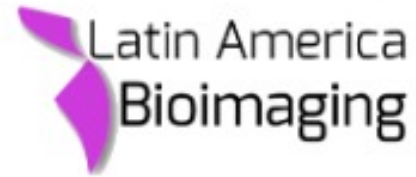
Hasta el 29.09.2023
Envío de CV (1 página) y carta de motivación a:
pscavone@gmail.com
(Bedelías de Facultad de Ciencias - UY)

Calendario





FACULTAD DE
MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



Cronograma online

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1OZE_3f9K0jmX12pM-kW4GxH0LIsY6qaKZ8AdLve01lo/edit?usp=sharing

Actividades asincrónicas

Estudiantes participantes

Página web

<https://scian.cl/scientific-image-analysis/microscopia-para-el-estudio-de-biofilms-bacterianos-3/>

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
pscavone@gmail.com



Ministerio
de Educación
y Cultura



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



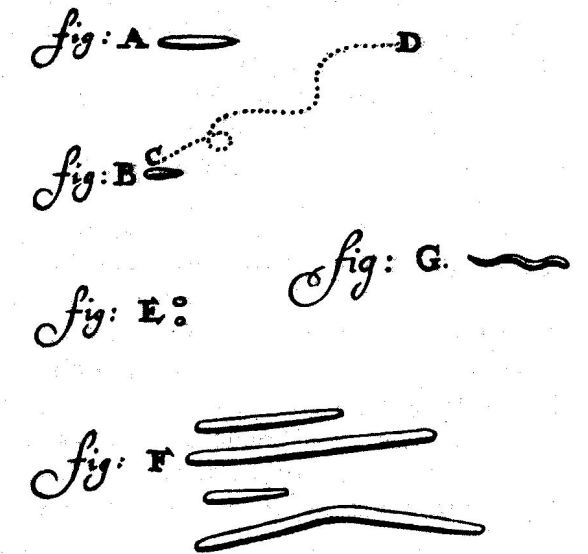
Bacterias organismos unicelulares



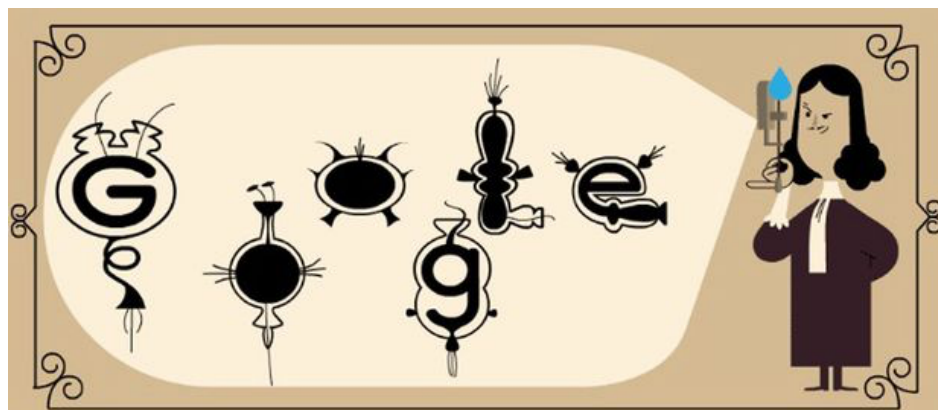
Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)
Padre de la Microbiología



PLATE XXIV



“The number of these animalcules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom” (Antonie van Leewenhoek a la London Royal Society, 1684)



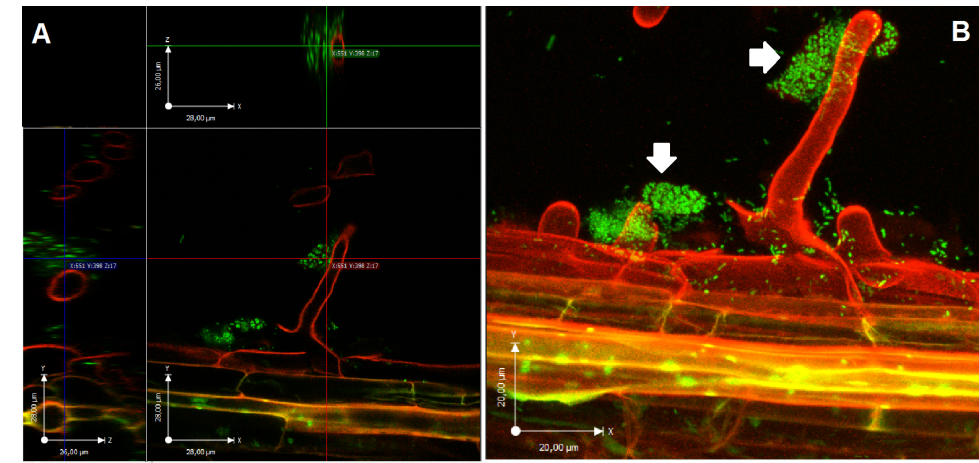
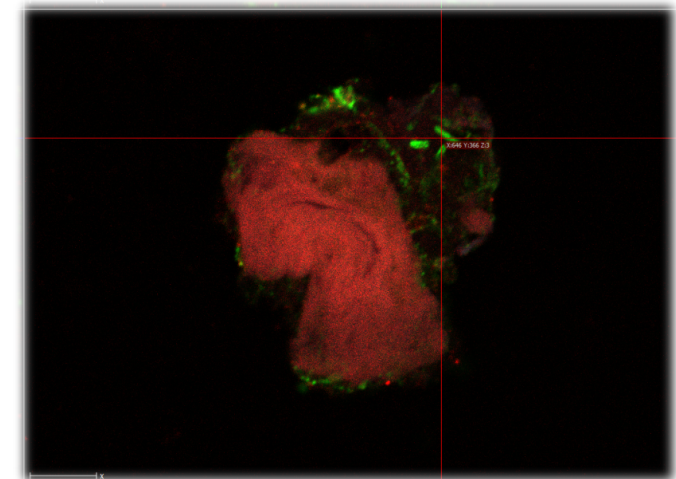
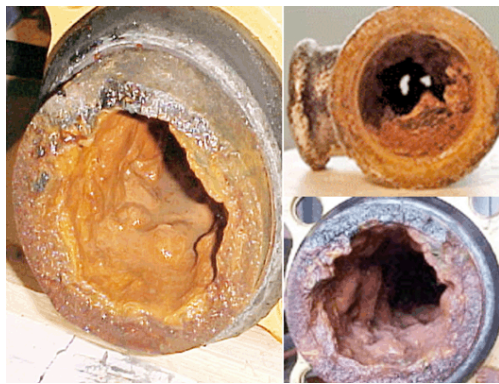
Biofilms en la naturaleza

Es la forma de vida predominante de los microorganismos en cualquier sistema biológico hidratado (Trautner & Darouiche, 2004).

- Comunidad cooperativa
- Distribución universal
- Pueden colonizar cualquier superficie
 - Minerales (cañerías, cemento...)
 - Raíces
 - Incluso adentro de células
- Relevantes en los procesos biogeoquímicos
- Presentes en ambientes extremos



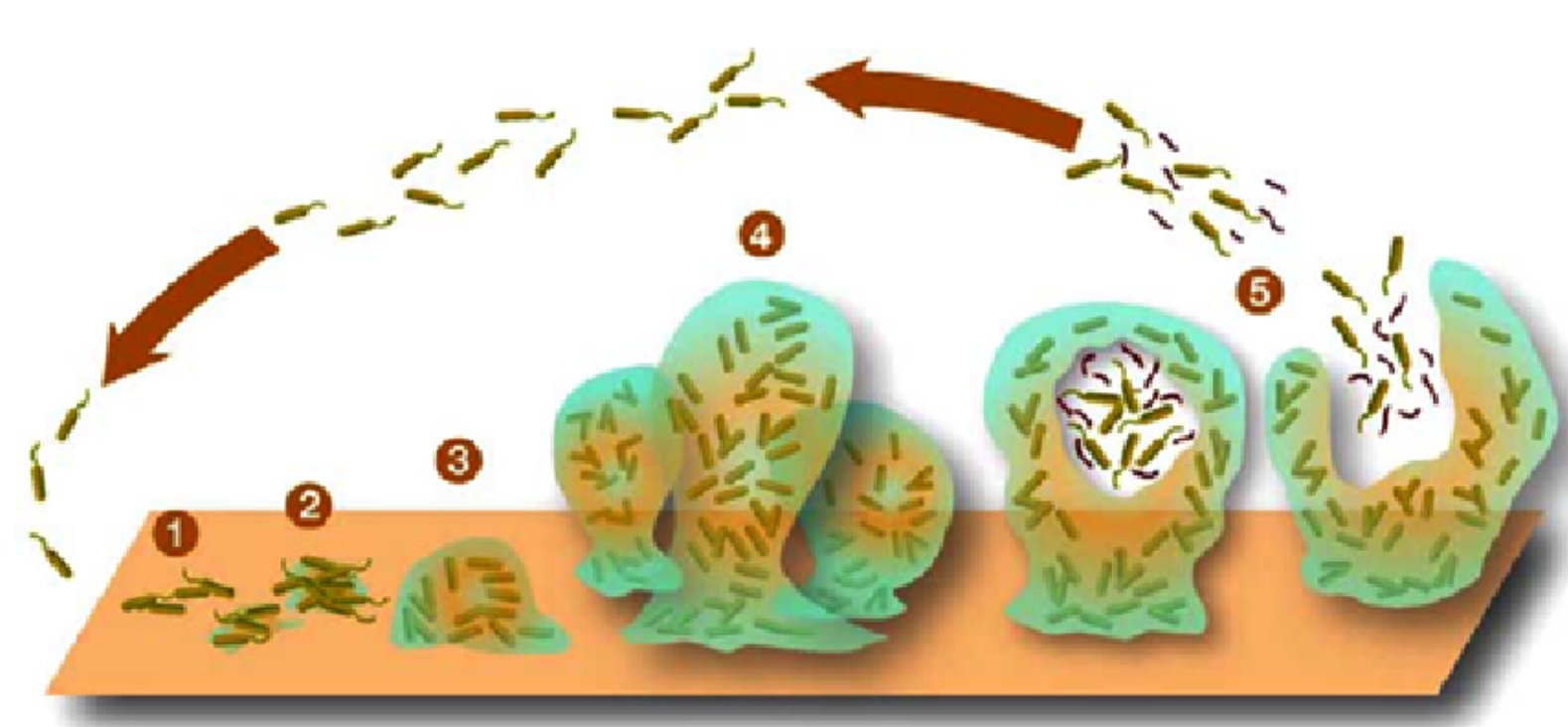
Biofilm en la tumba Abbatija tad-Dejr. Imagen: G. Zammit.



Biofilms definición

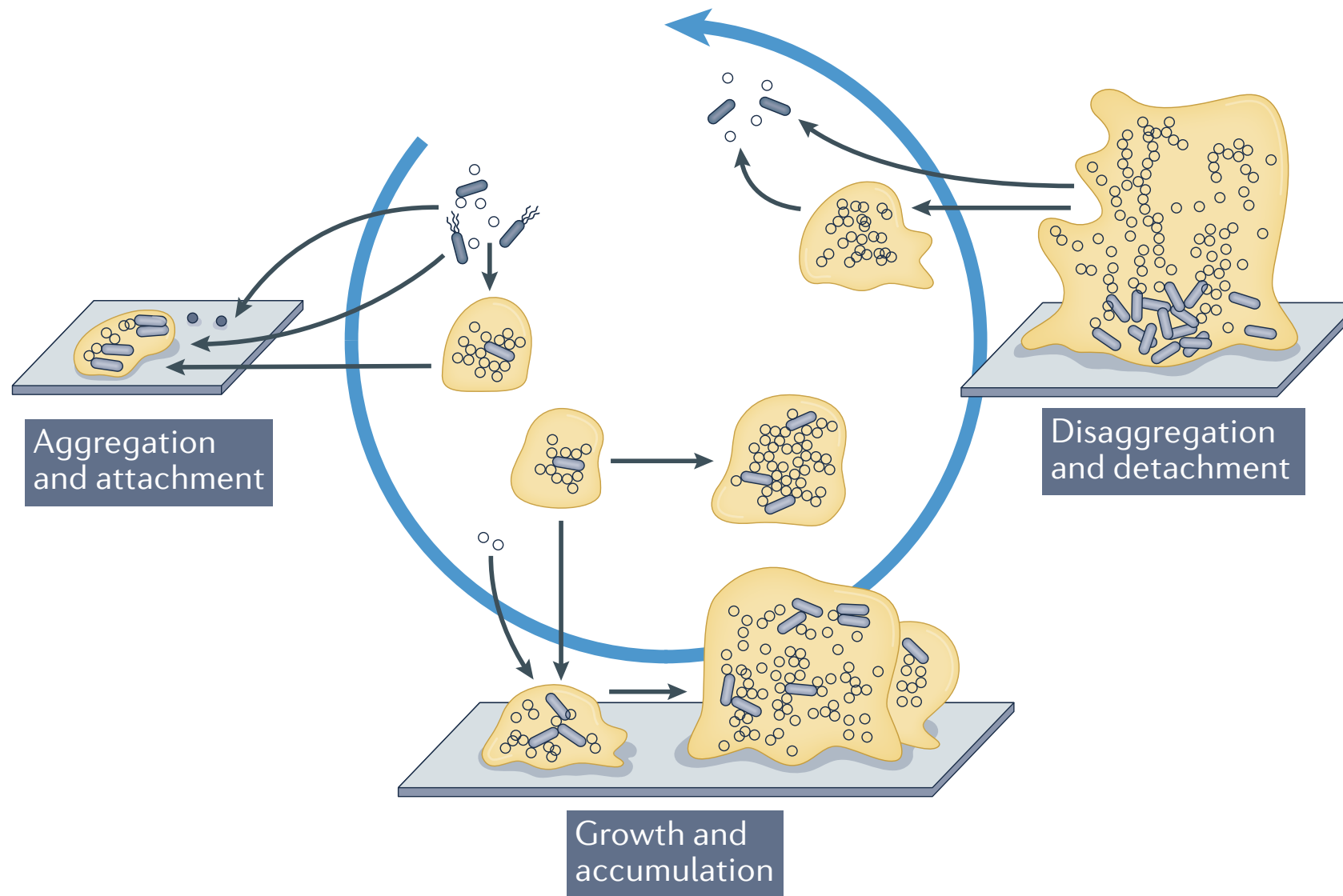
Comunidad bacteriana que se encuentra **irreversiblemente** asociada a una superficie, rodeada de una **matriz** polisacáridica de producción propia. Los microorganismos en el biofilm difieren de sus contrapartes planctónicas en la **expresión génica**, estado **metabólico** y **fisiológico**.

Costerton, 1999

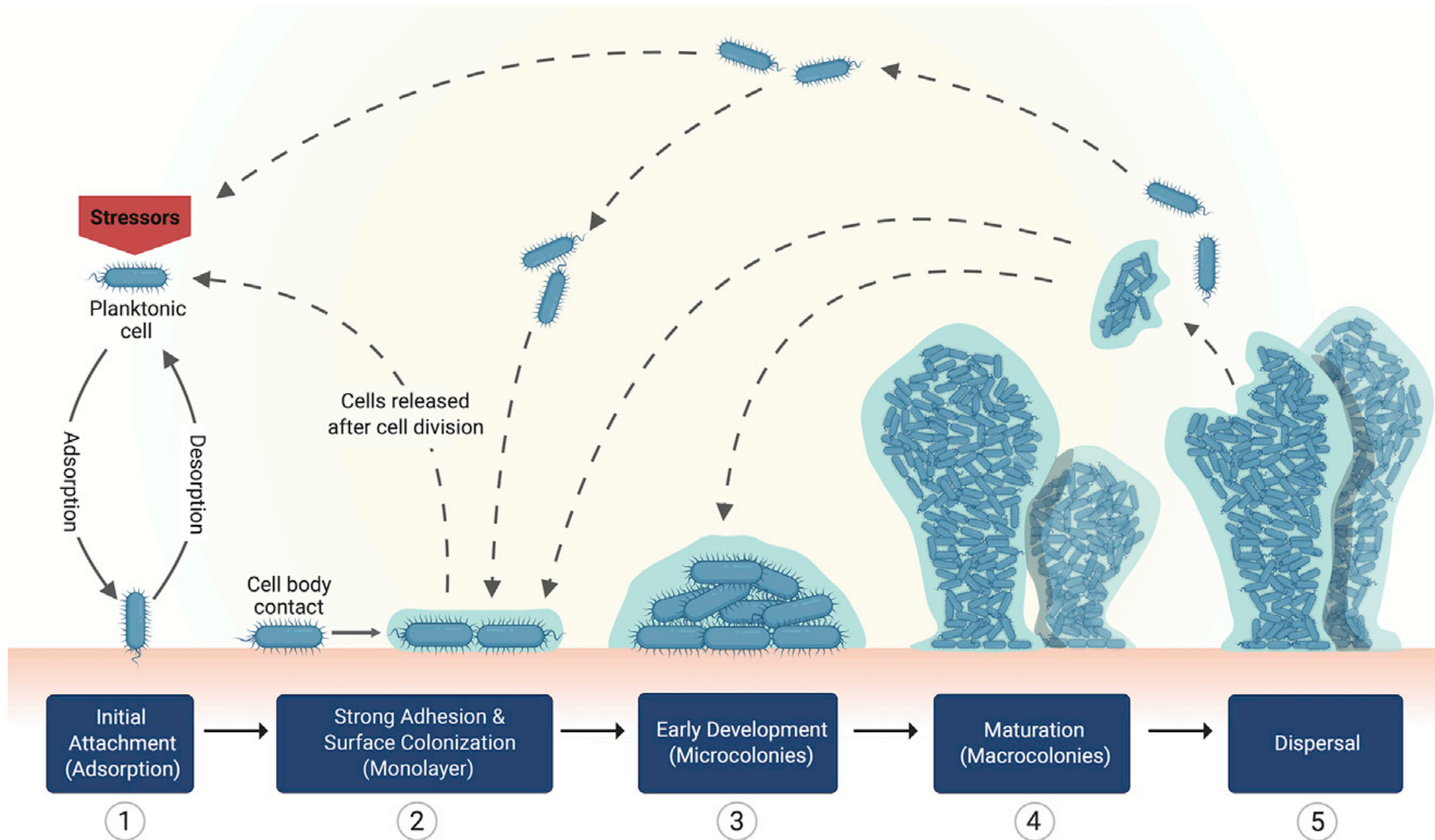


Una vez maduro, el biofilm genera un patrón alterado en cuanto al **crecimiento bacteriano**, **cooperación fisiológica** y **eficiencia metabólica**, el cual provee de una coordinación funcional comunitaria el cual imitaría un **tejido primitivo eucariótico**.

Dunne, 2002



Modelo conceptual expandido de la formación del biofilm



Guzmán-Soto et al, 2021

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

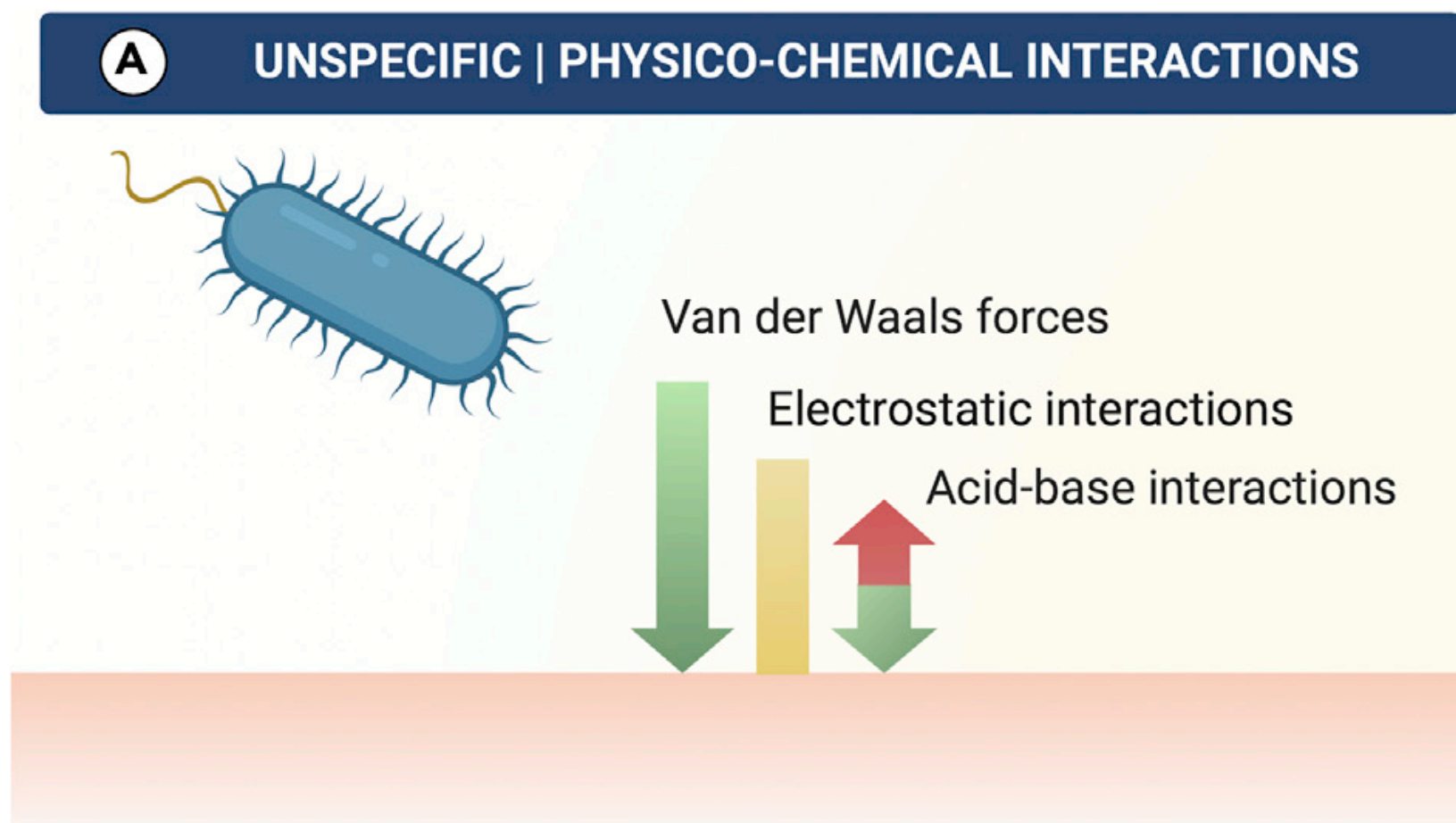
Costerton, 1999

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



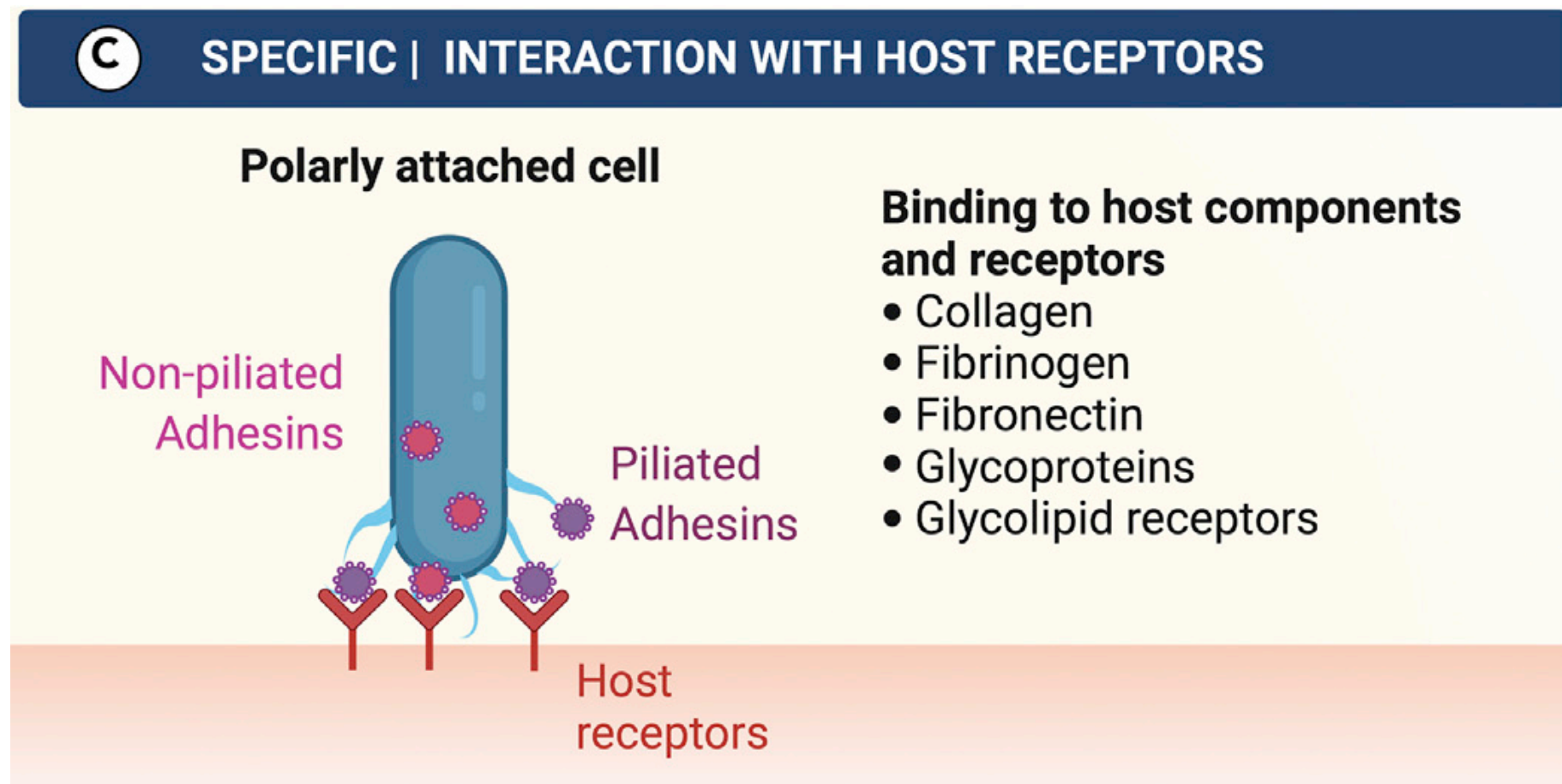
1. Adhesión reversible

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



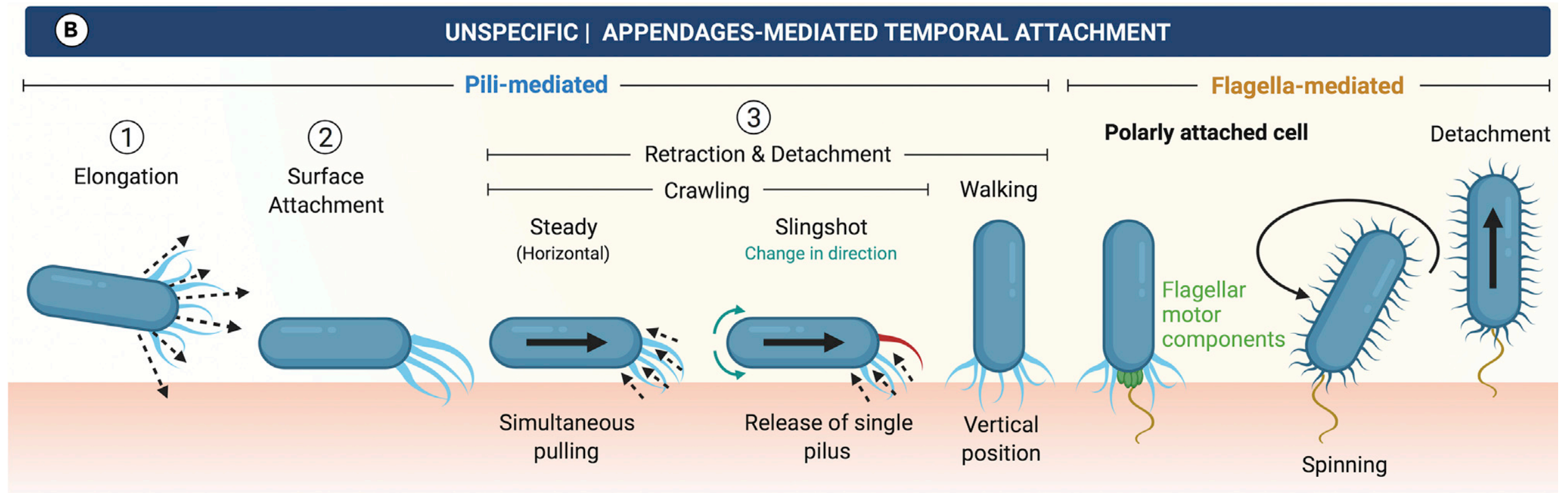
1. Adhesión reversible

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**)

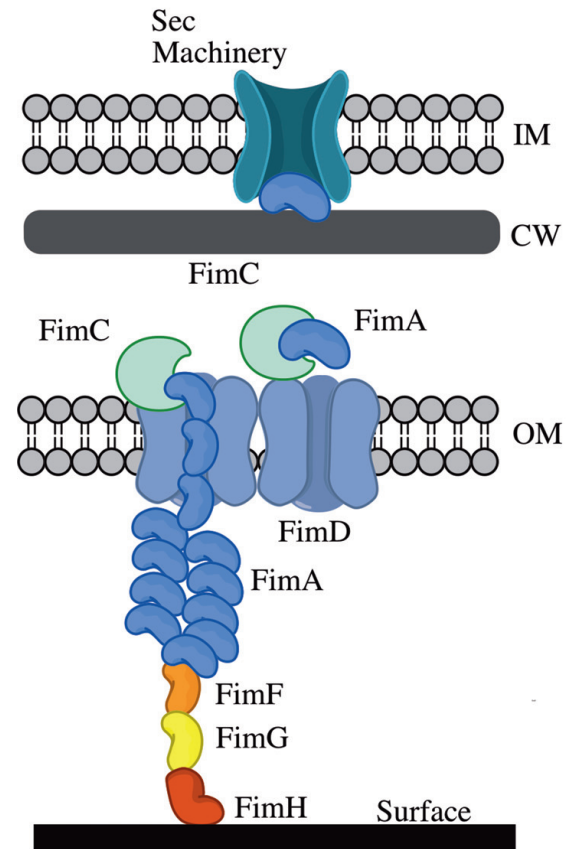
2. Adhesión irreversible

TABLE 1 Examples of fimbrial adhesins involved in biofilm formation

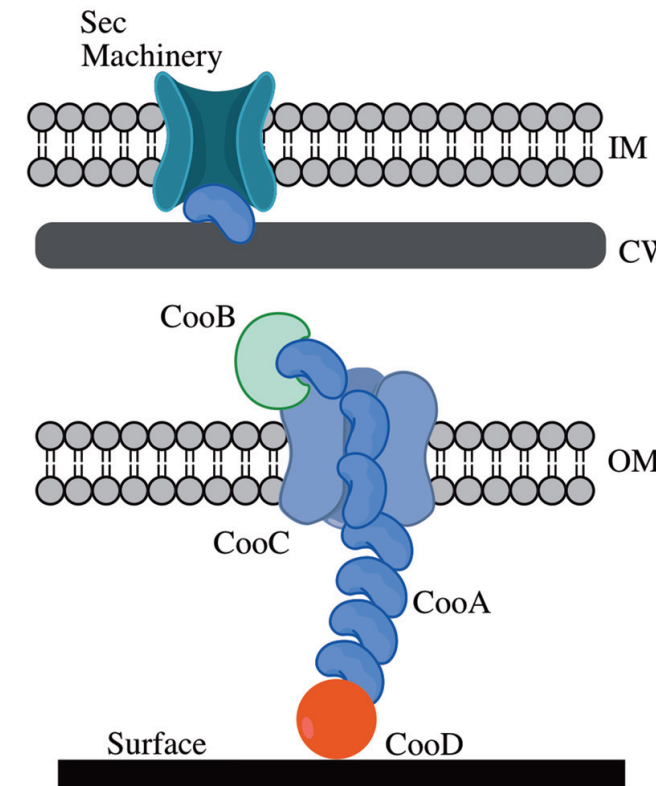
Pili type	Major pilus proteins	Minor proteins and assembly proteins	Bacteria	Reference
Chaperone/ usher	EcpA or MatA (ECP pili)	EcpC, EcpD, EcpE	<i>E. coli</i>	196
	FimA (type I)	FimC, FimD, FimF, FimG, FimH	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>X. fastidiosa</i> , <i>Enterobacter amylovora</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

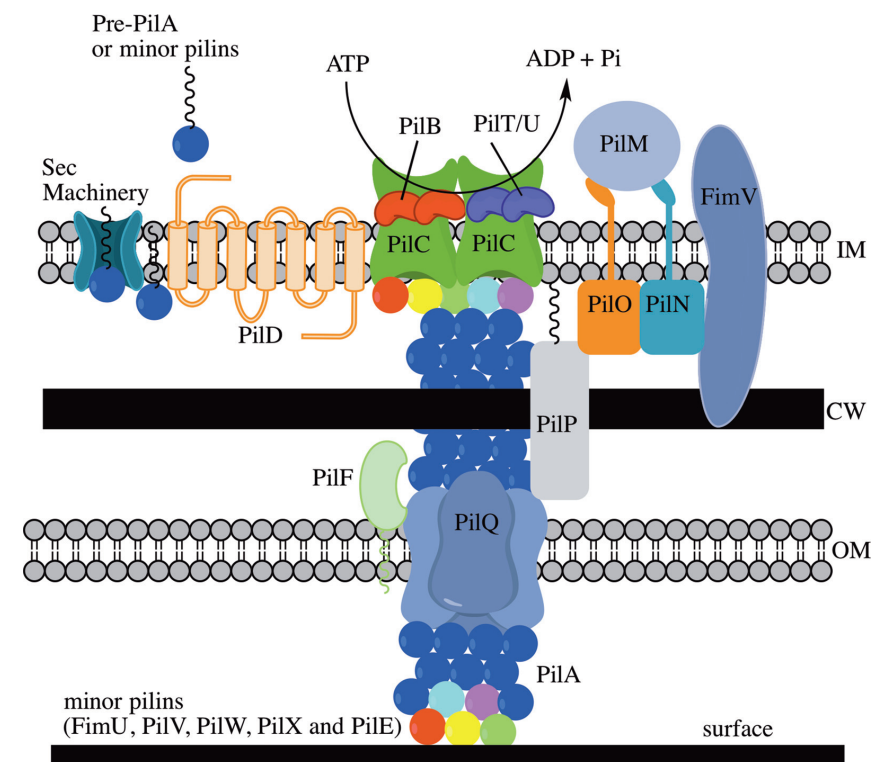
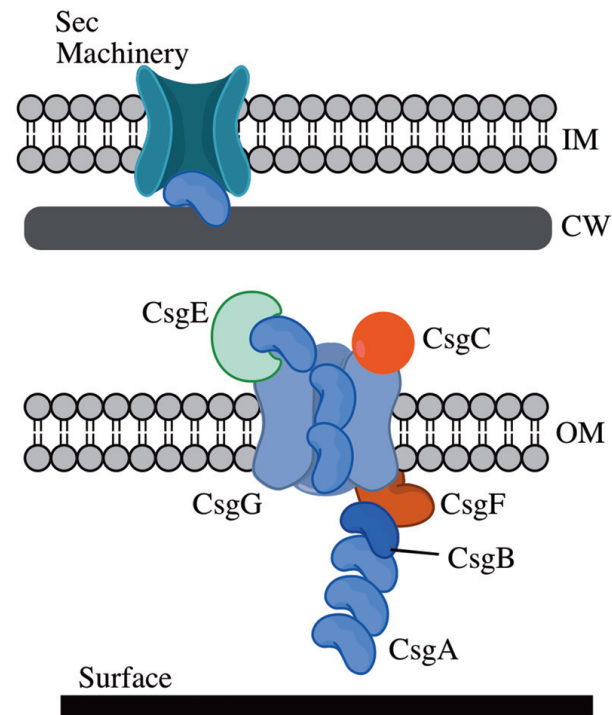
A. Chaperone-Usher



B. Alternate Chaperone-Usher



C. Nucleation-Precipitation



Adhesinas no fimbriales

T1SS
T5SS

2. Adhesión irreversible

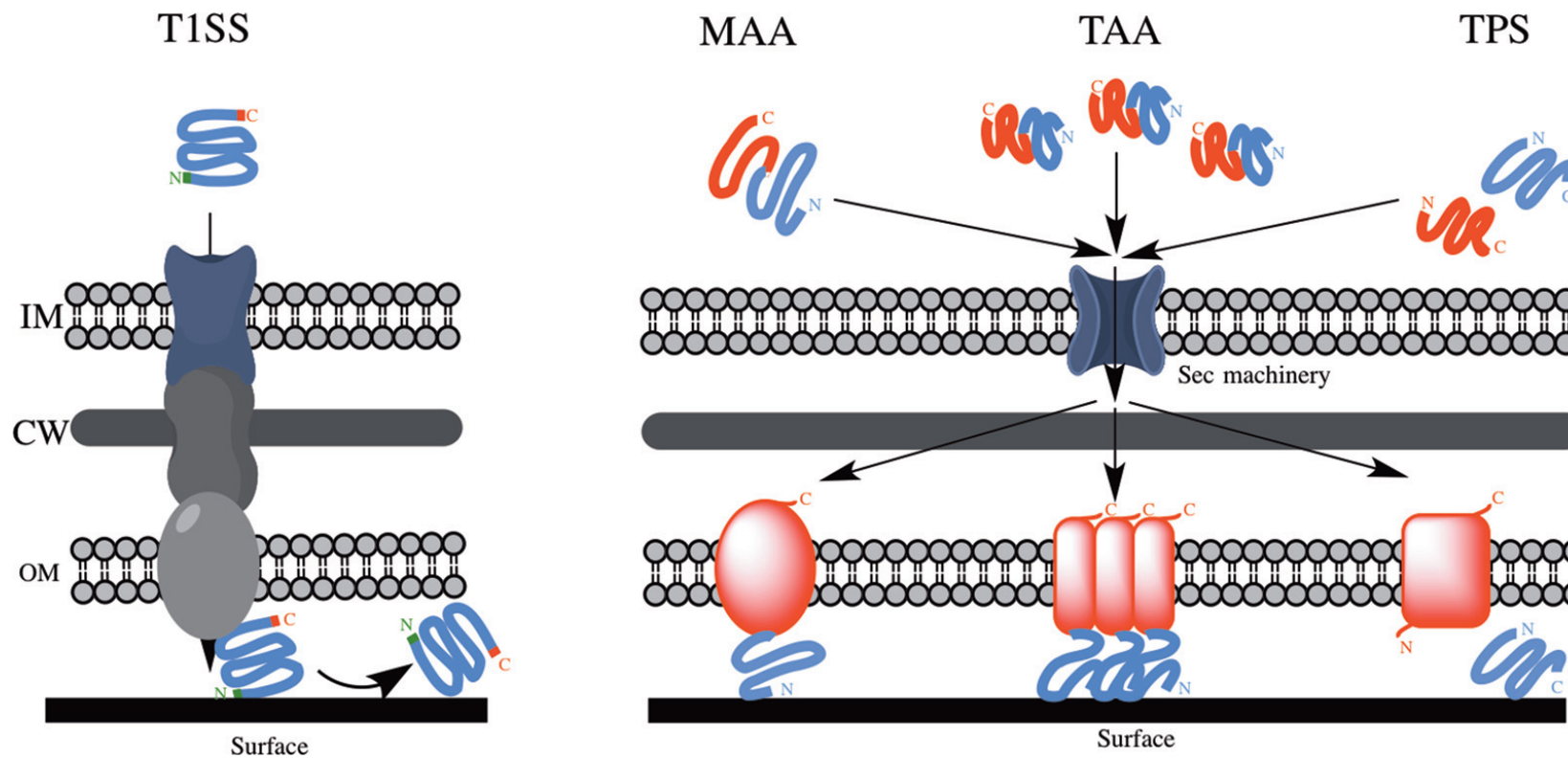


FIGURE 3 Schematic overview of the various secretion systems of nonfimbrial adhesins. The type 1 secretion system (T1SS) and three classes of type 5 secretion system (T5SS) (monomeric autotransporter adhesins [MAA], trimeric autotransporter adhesins [TAA], and two-partner secretion [TPS] systems) are 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
Biofilm associated proteins (Bap) – T1SS			
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
Monomeric autotransporter adhesins – T5SS			
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
Trimeric autotransporter adhesins – T5SS			
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
Hemagglutinin-like adhesins – T5SS			
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)

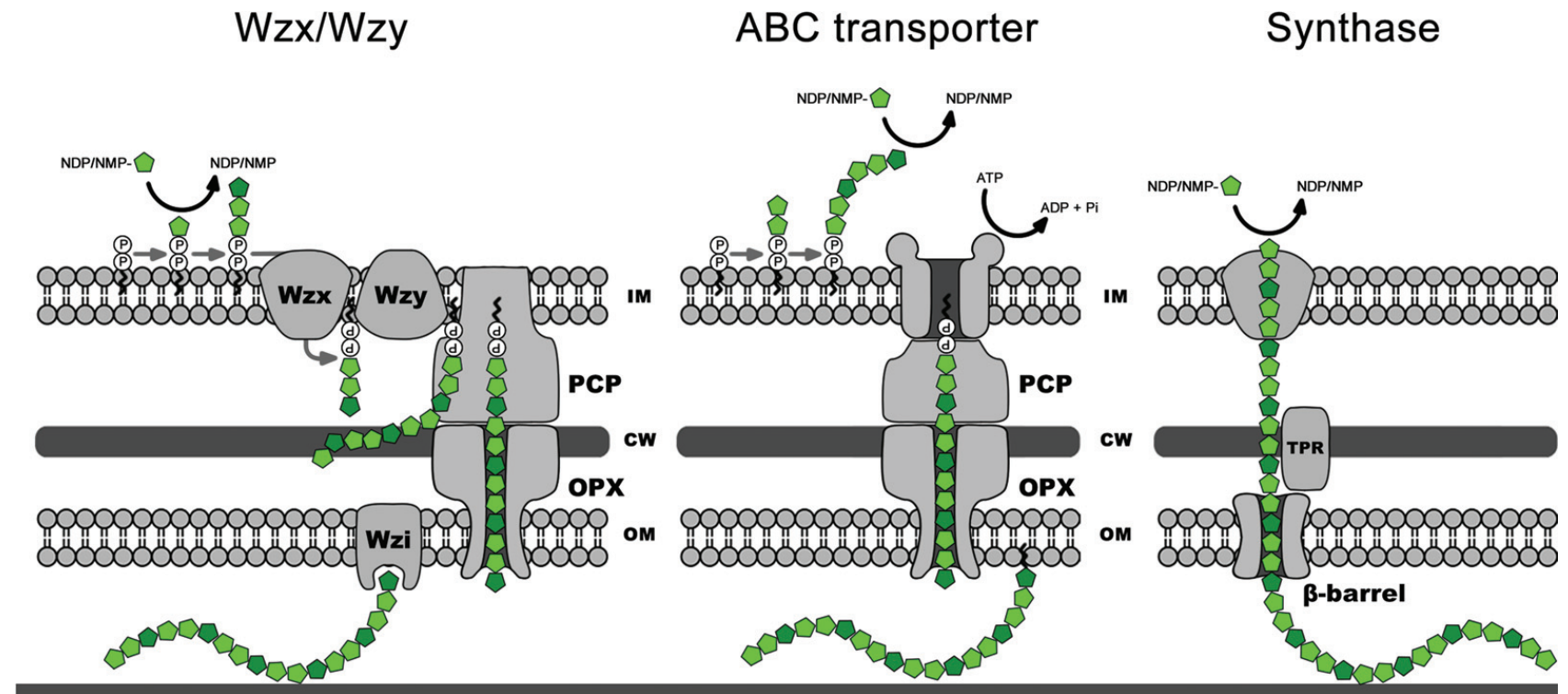
diferencias son experimentalmente definidas y tienen limitada relevancia fisiológica

desde un punto de vista adhesivo:

polisacáridos protectores forman barrera protectora

polisacáridos agregativos (EPS) propiedades adhesivas/cohesivas

Polisacáridos agregativos (EPS)



Polisacáridos agregativos (EPS)

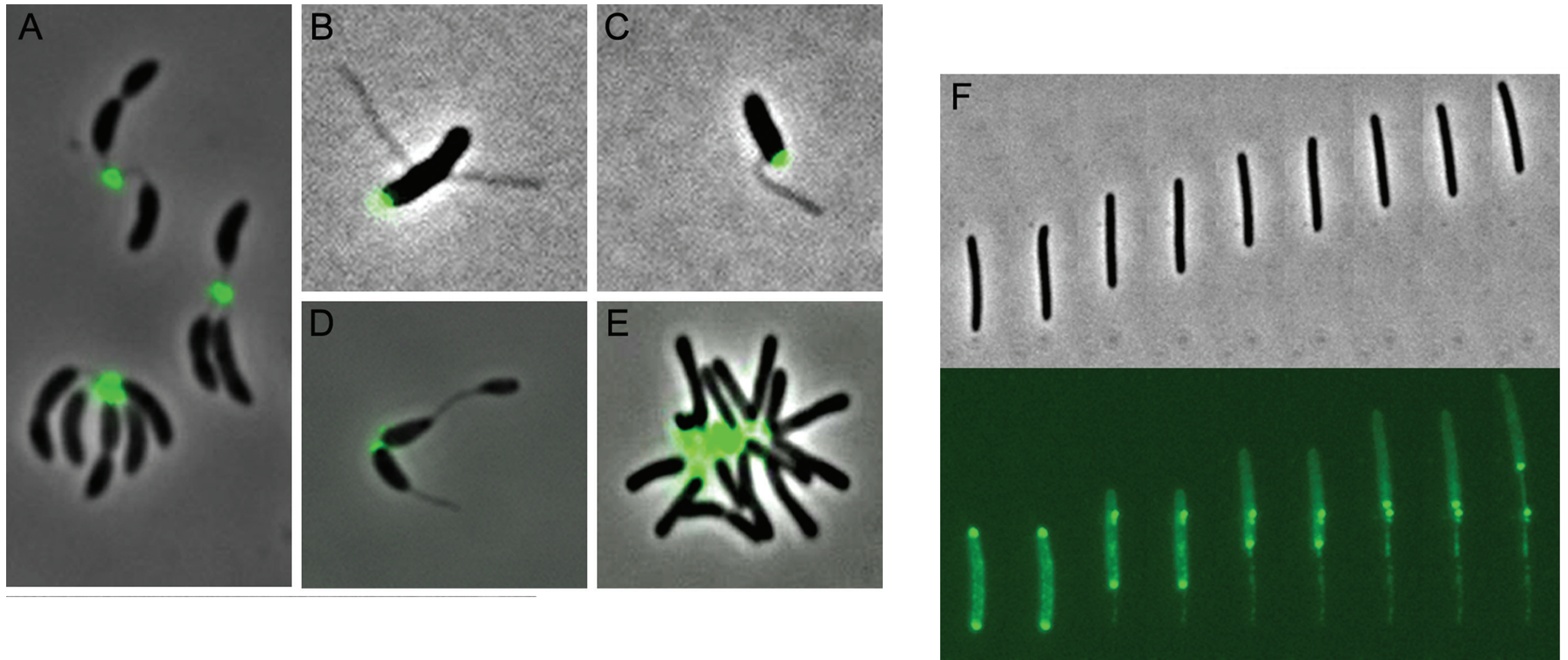


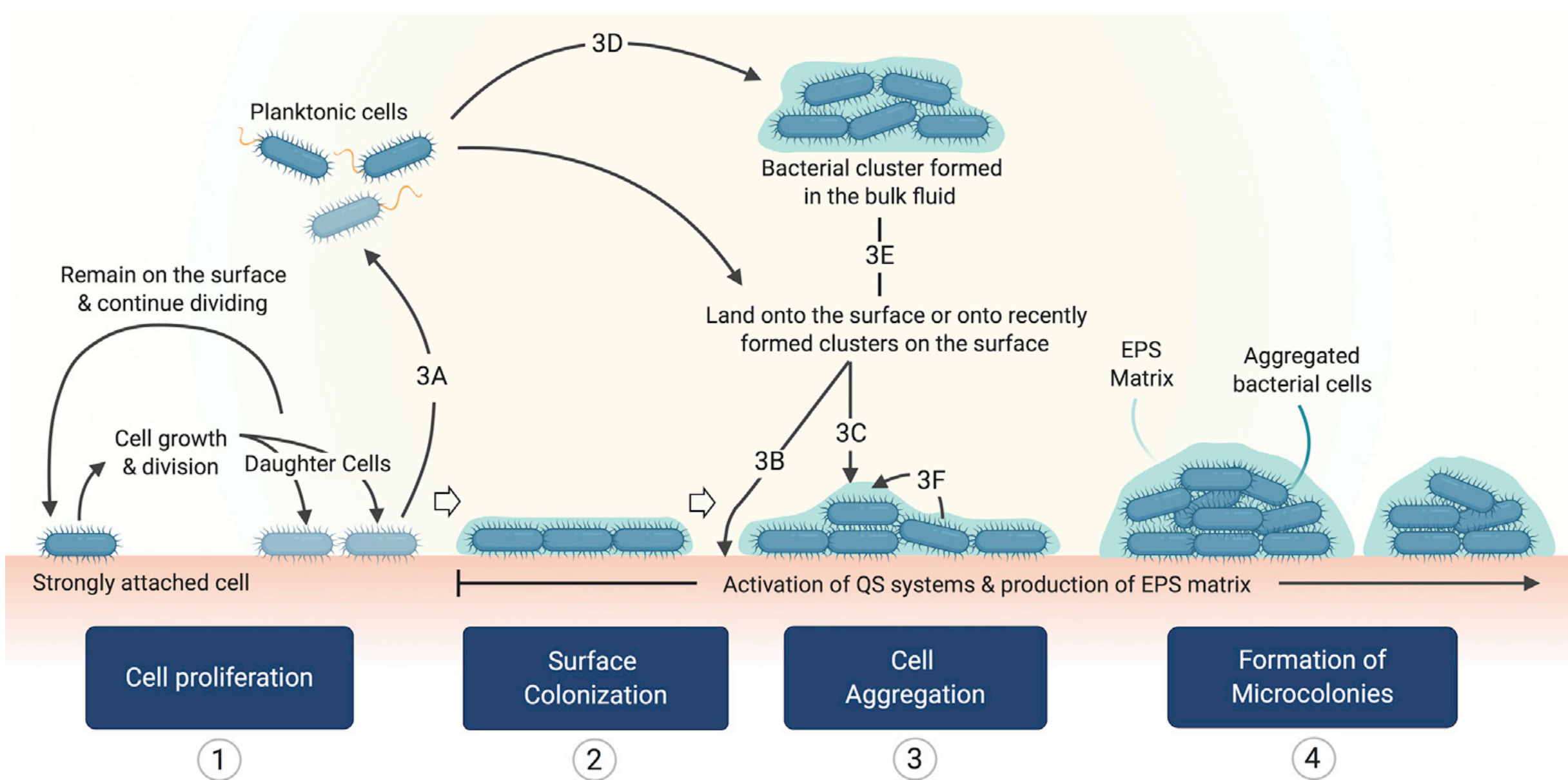
FIGURE 6 Selected examples of discrete polysaccharides. AF488-conjugated wheat germ agglutinin lectin labelling of the holdfast in (A) *C. crescentus*, (B) *A. biprosthecum* (courtesy of Chao Jiang), (C) *Asticcacaulis excentricus* (courtesy of Chao Jiang), and (D) *Hyphomicrobium vulgare* (courtesy 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>	β -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>	β -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 β -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>	β -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 α -D-mannose or α -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*

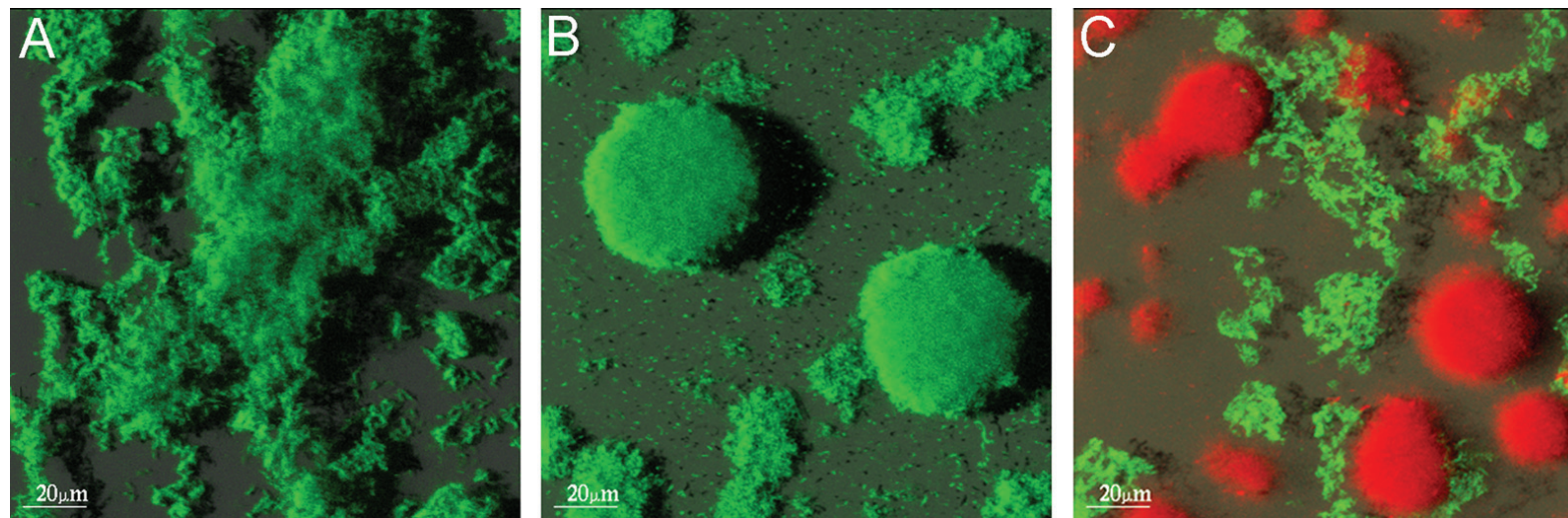


FIGURE 1 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images showing spatial structures in flow-chamber-grown 5-day-old biofilms formed by (A) Gfp-tagged (green fluorescent) *P. putida*, (B) Gfp-tagged *P. knackmussii*, and (C) a mixture of Gfp-tagged *P. putida* and DsRed-tagged (red fluorescent) *P. knackmussii*. 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**

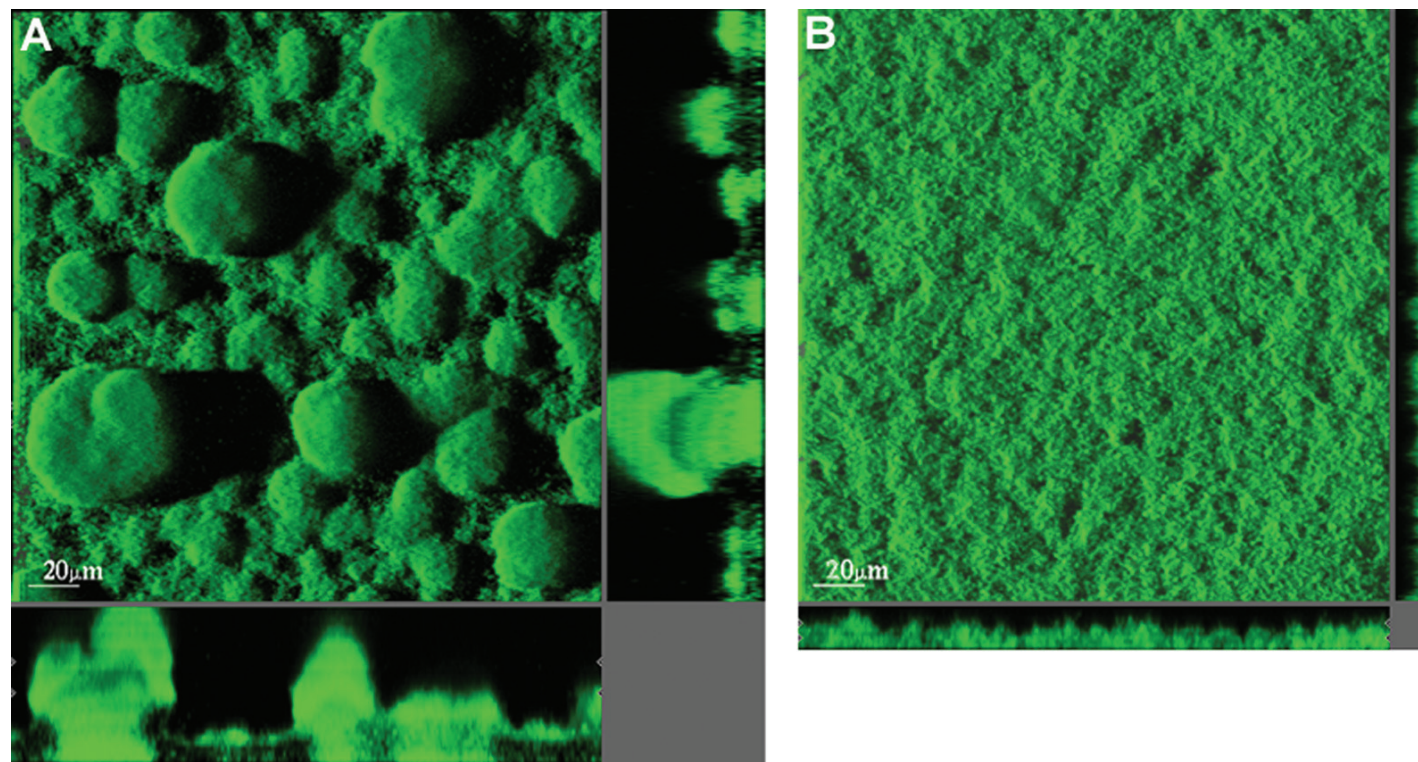


FIGURE 2 CLSM micrographs acquired in 5-day-old *P. aeruginosa* PAO1 biofilms grown on (A) glucose minimal medium and (B) citrate minimal medium. The central pictures show top-down fluorescence projections, and the flanking pictures show vertical sections. Bars, 20 µm. Adapted from reference 47 with 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

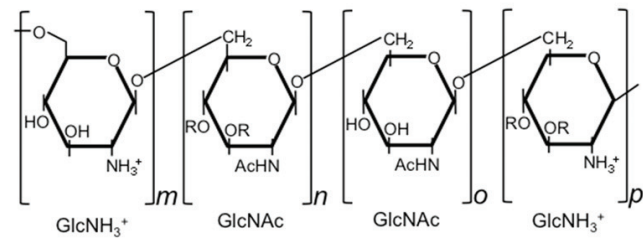
varían en composición y por lo tanto en propiedades fisicoquímicas
tamaño
en asociación con lectinas, proteínas, lípidos, ADNe

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

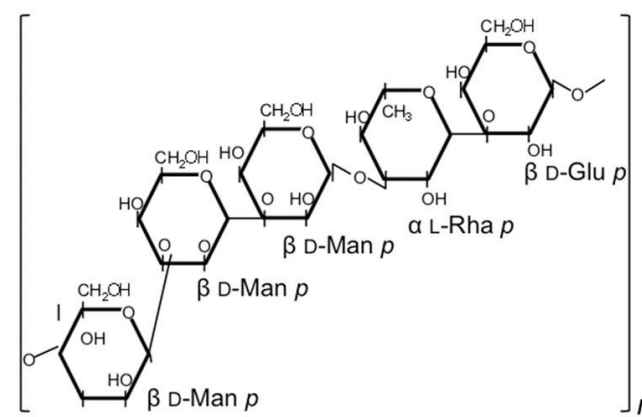
	Localization	Charge	Functions		
			Aggregative	Protective	Architectural
Pel	Secreted	NA	X	X	X
Psl	Secreted/cell associated	Neutral	X	X	X
PIA	Secreted	Polycationic	X		X
Cellulose	Secreted	Neutral	X	X	
Alginate	Cell associated	Polyanionic		X	X
CPS	Covalently attached	Polyanionic		X	
Levan	Cell associated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

Matriz exopolisacáridos

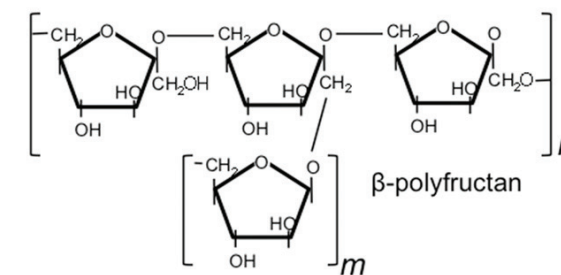
A. PIA



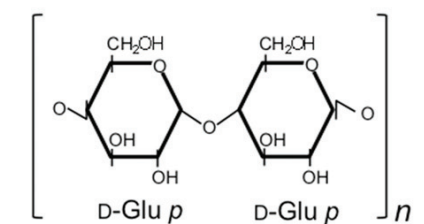
B. Psl



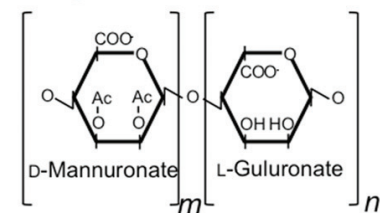
E. Levan



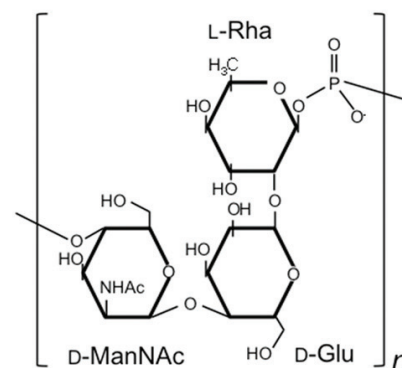
F. Cellulose



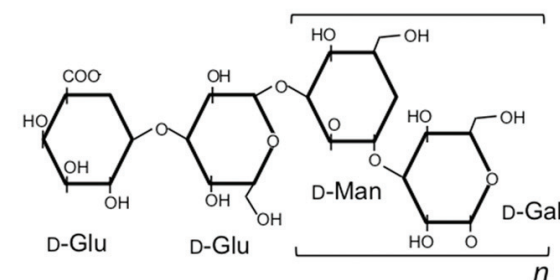
C. Alginate



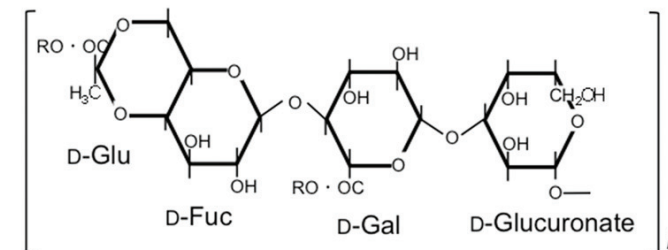
Dii. *S. pneumoniae* CPS (serotype 19F)



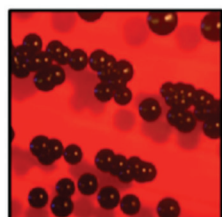
Di. *E. coli* CPS (K30 Antigen)



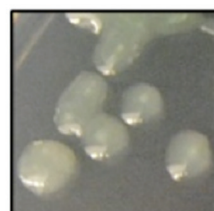
G. Colanic acid



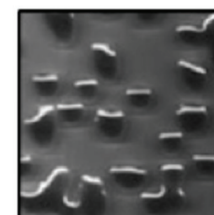
A. *S. aureus* PIA



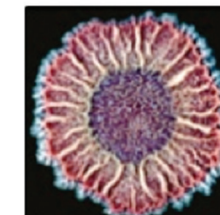
D. *P. aeruginosa* Alginate



E. *E. coli* Colanic acid



G. *B. subtilis* EPS



H. *E. coli* Cellulose



Matriz

ADN extracelular

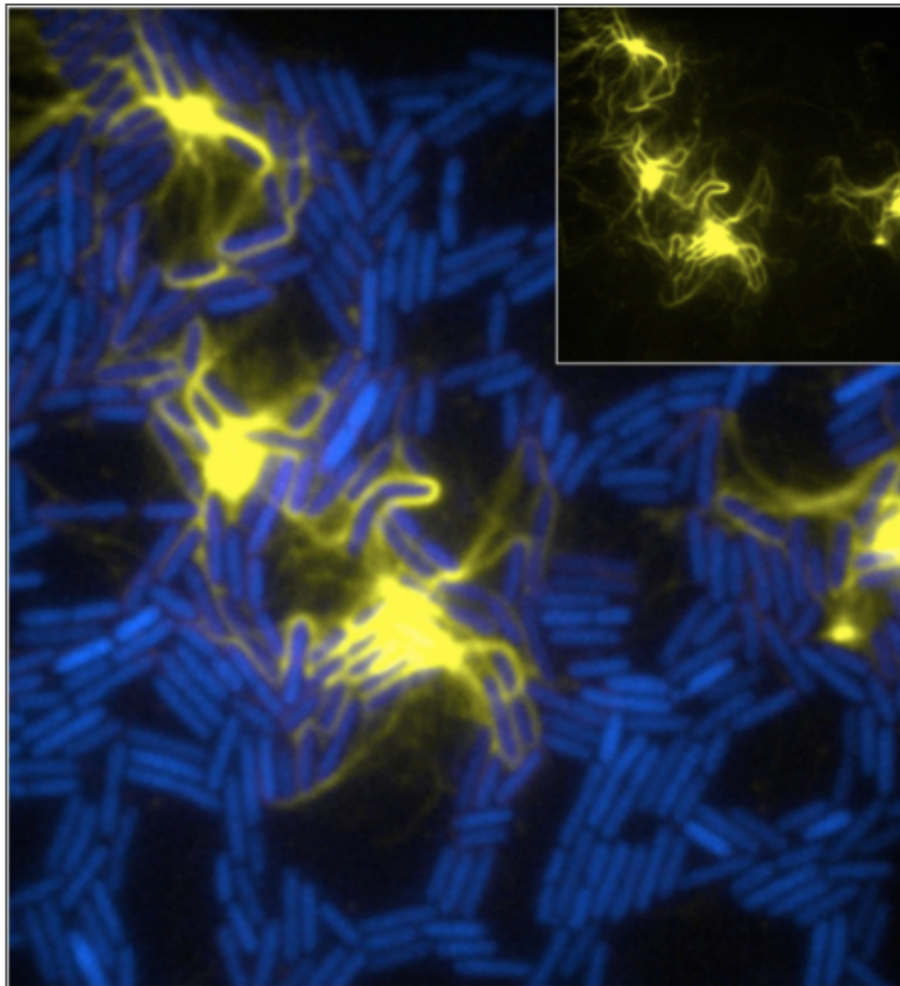
quorum sensing involucrado

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

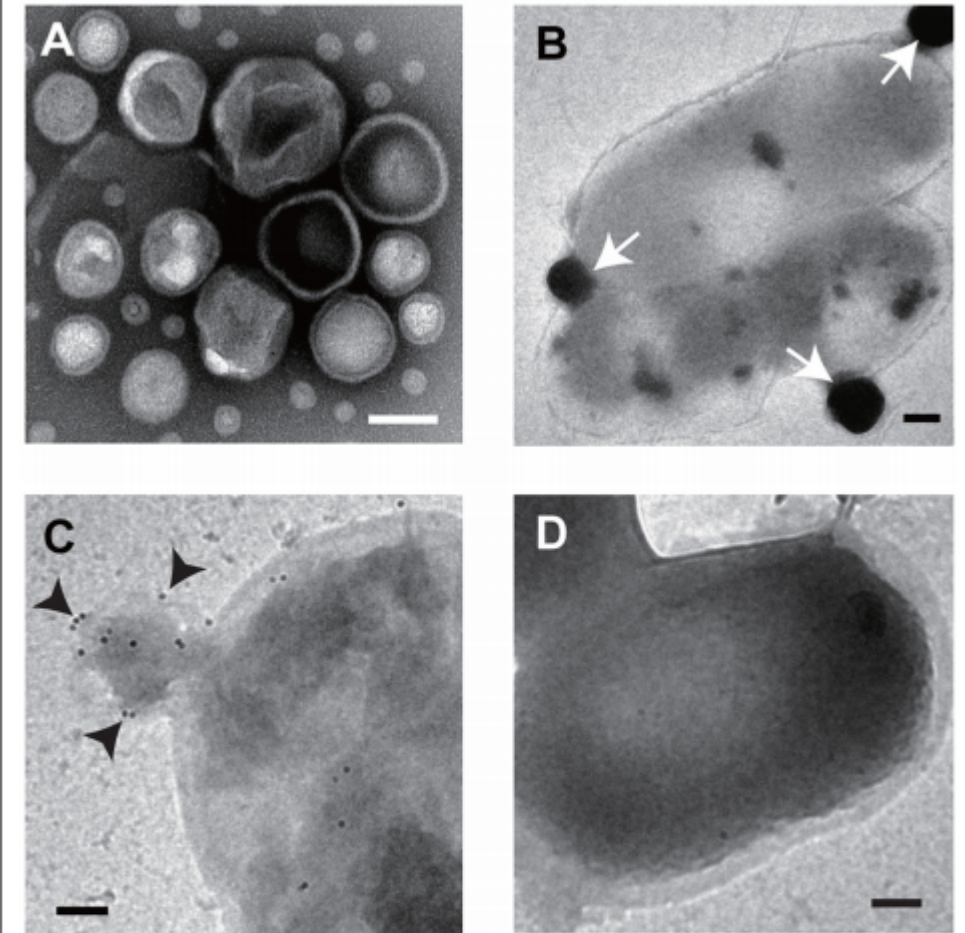
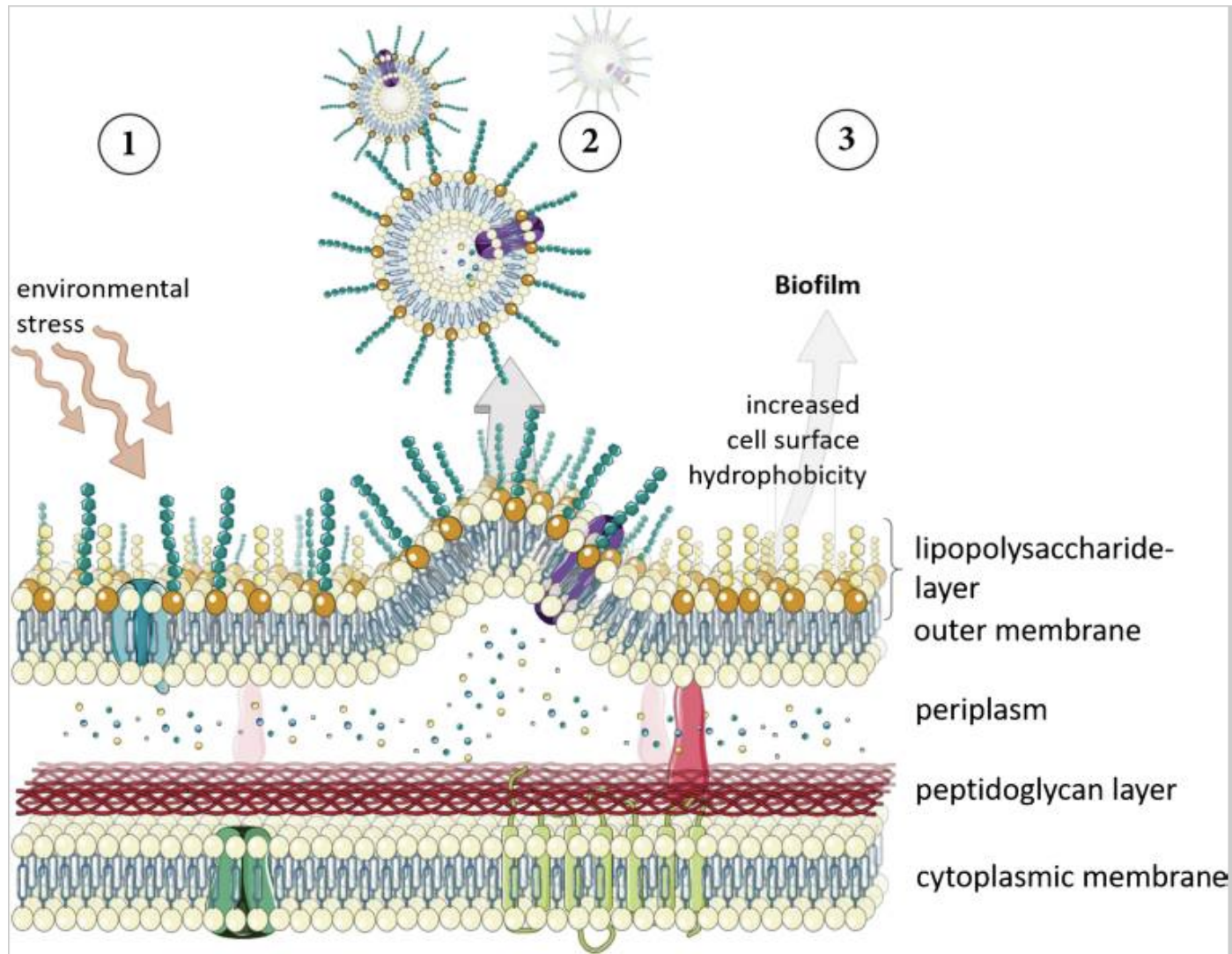
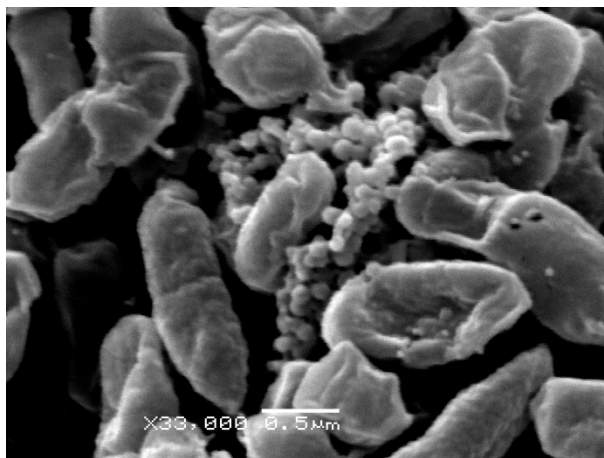


FIGURE 3 | TEM imaging. (A) Image of purified MVs derived from *B. agrestis* CUETM77-167. (B) Association of FM4-64-labeled MVs with cells. The white arrows indicate MVs, which have a high density due to FM4-64 labeling. (C) Association of FITC-labeled MVs with cells. Cell-associated MVs were detected 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.

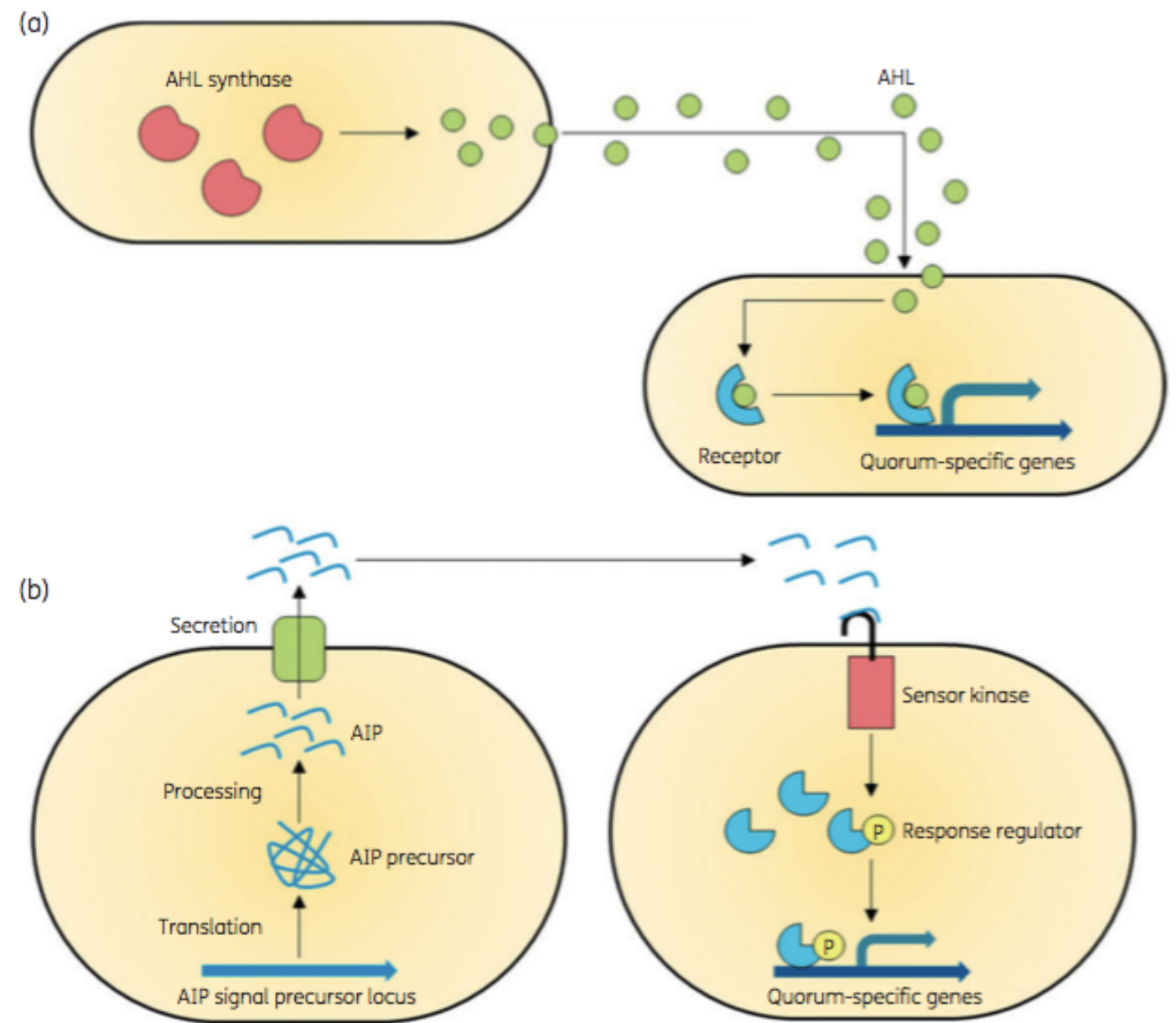
AHL-LuxR, dimeriza y se une al ADN y
transcribe genes específicos de QS

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**

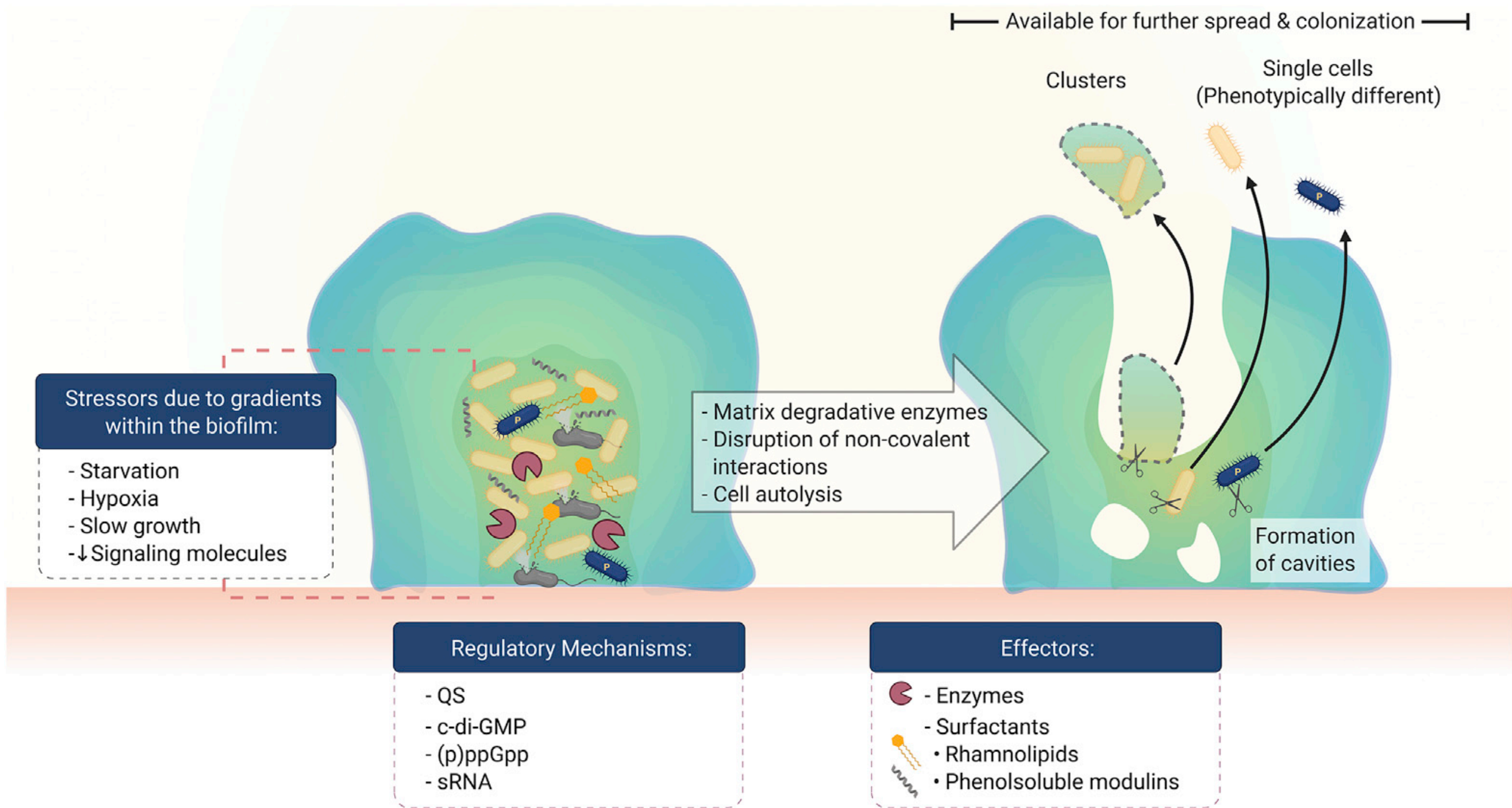
liberación **coordinada** de bacterias de dispersión
diferenciadas
móviles
quemotácticas

van a colonizar nuevas superficies y comenzar el ciclo

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

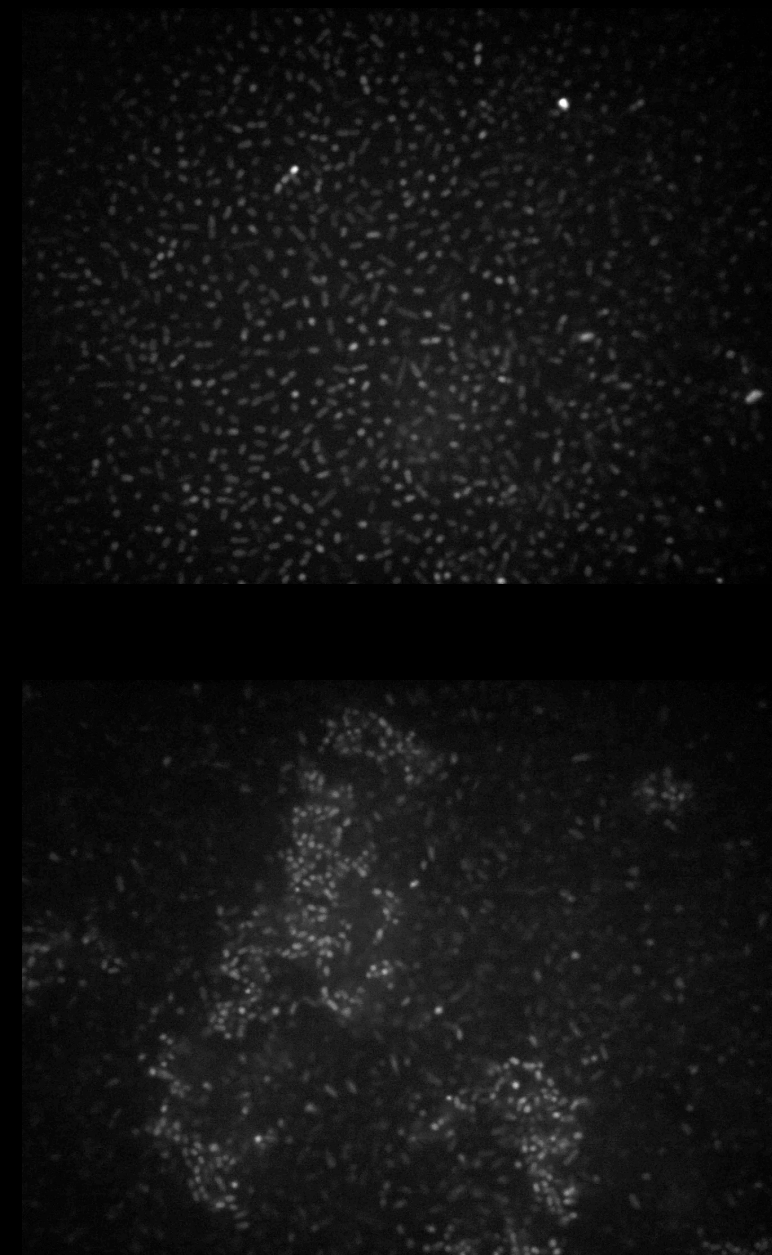
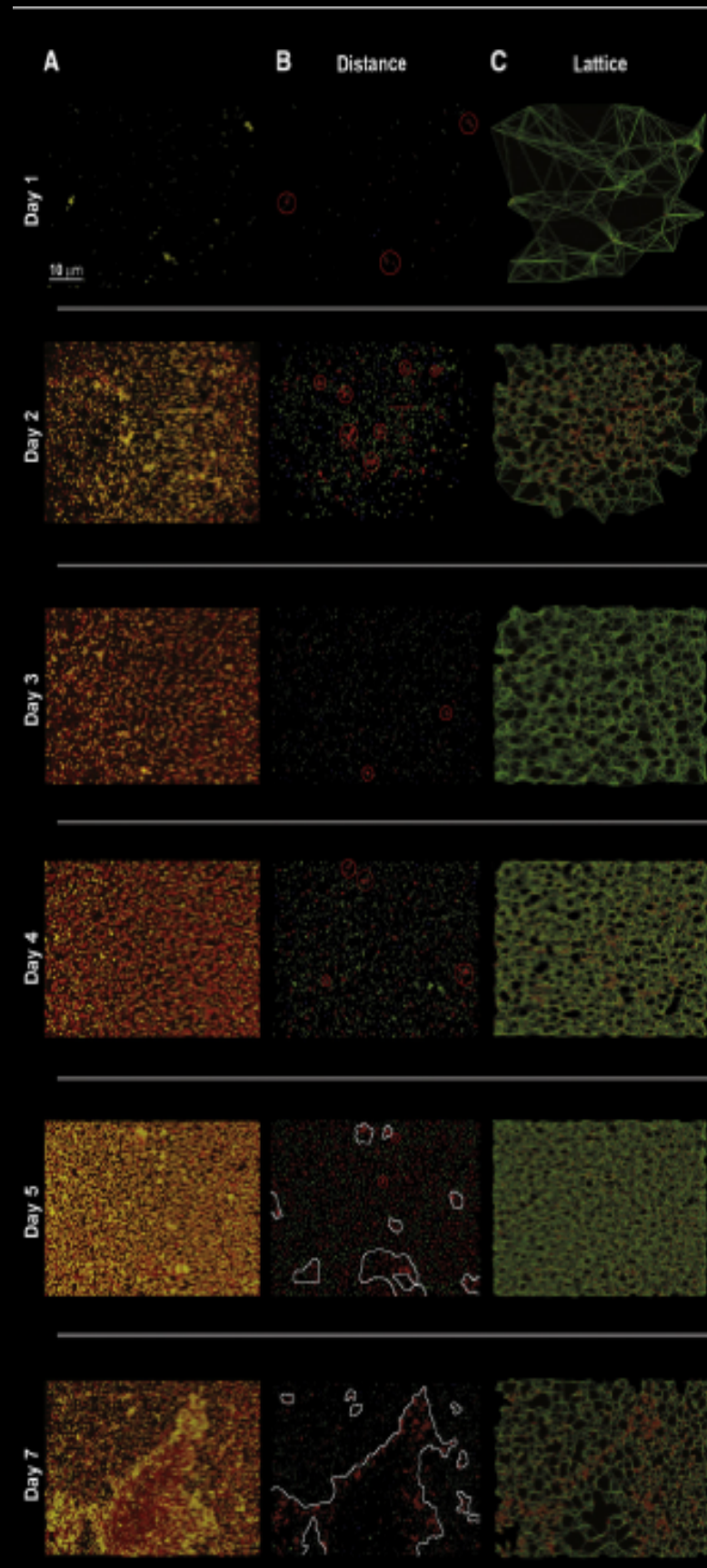
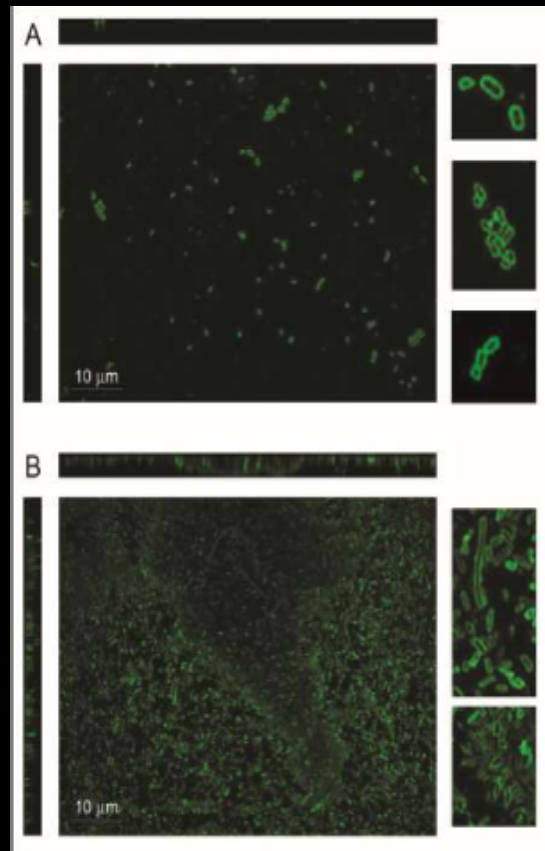
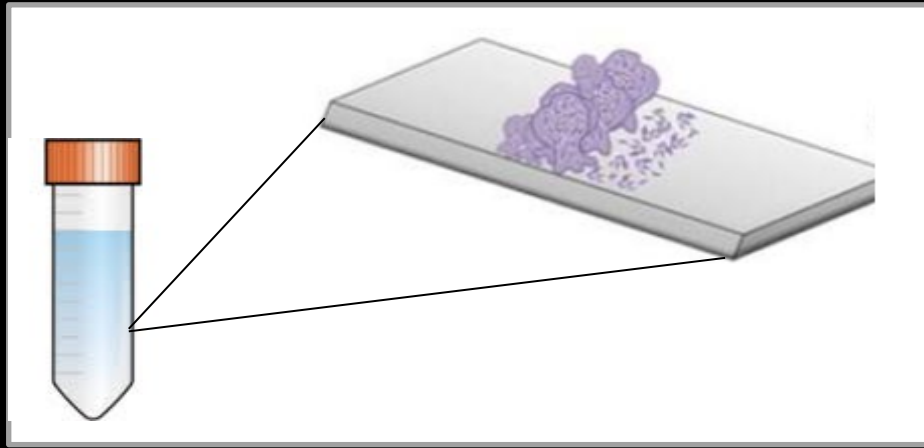
asociado con **gradientes** específicos de nutrientes y O₂

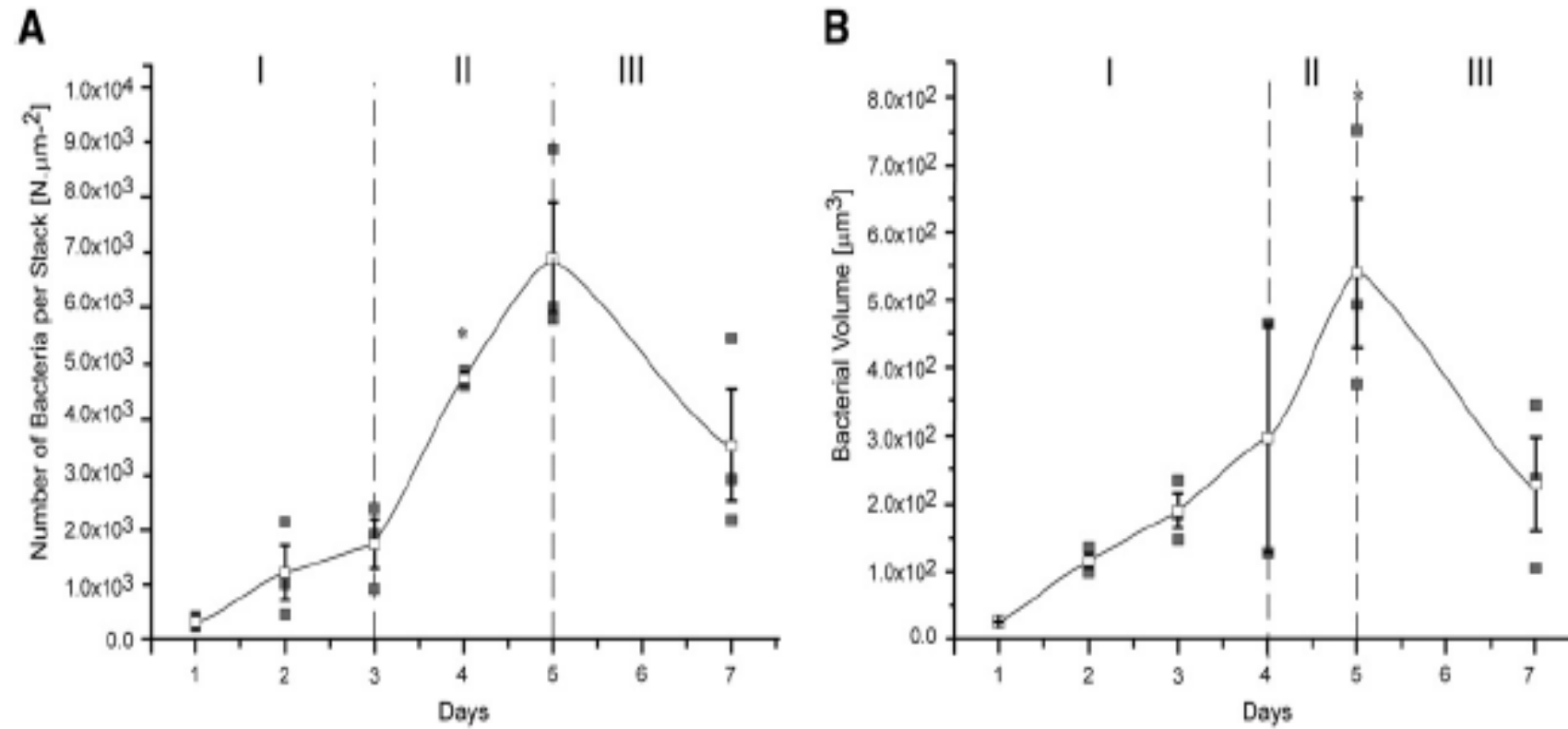
down regulation de genes del fenotipo biofilm como exopolisacáridos y fimbrias y **up regulation** de flagelos y factores quemotaxis



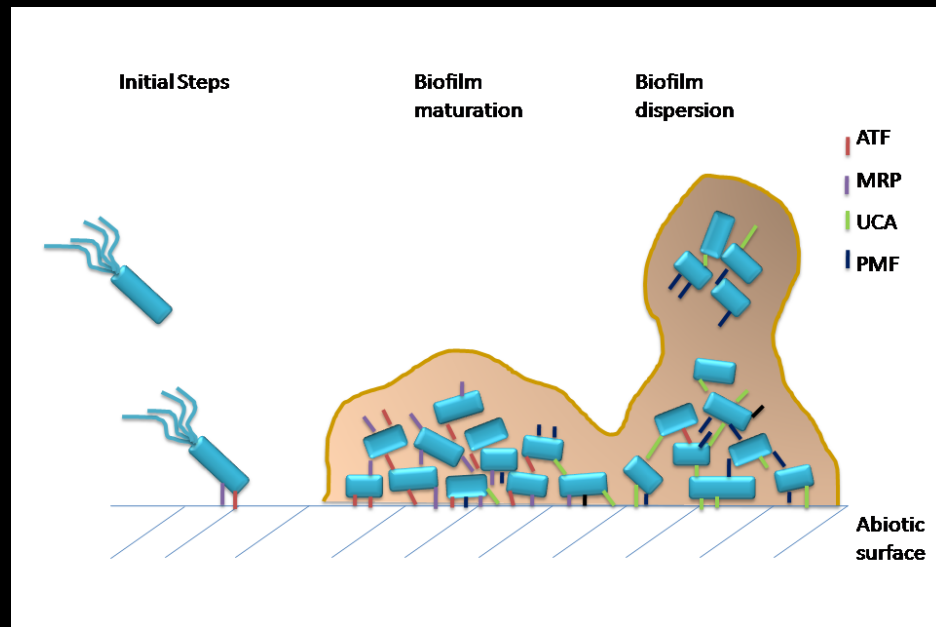
Modelo estático

Formación de biofilms *P. mirabilis*

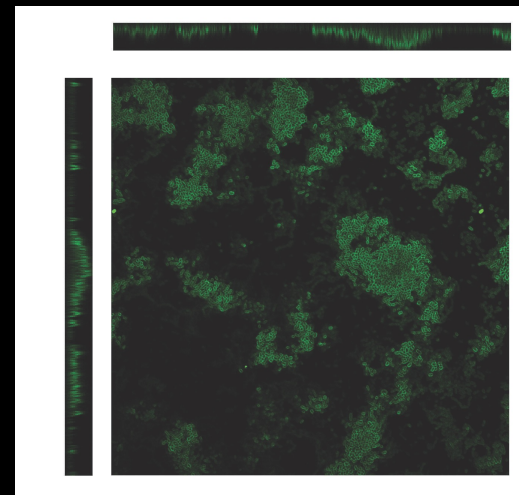




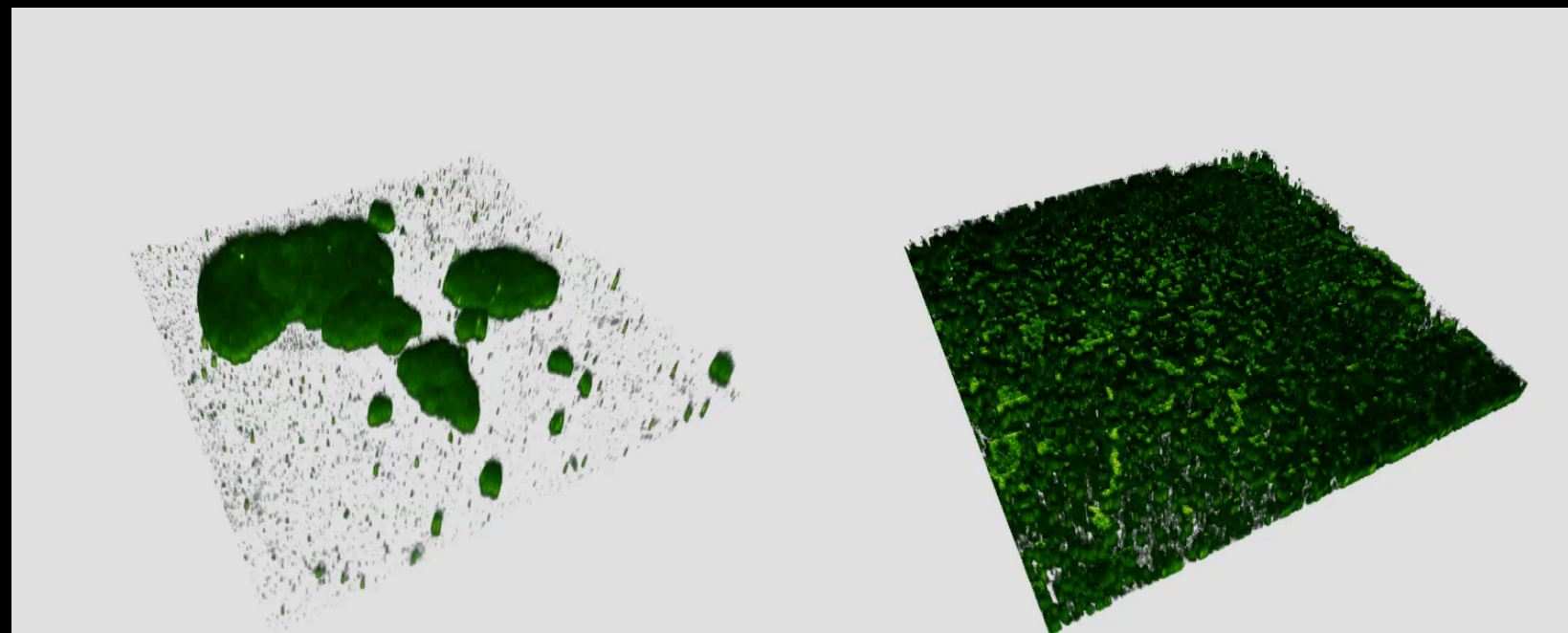
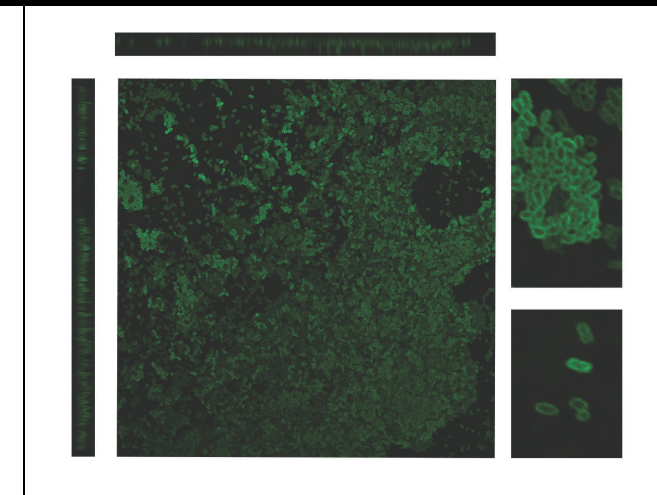
Parámetros morfo-topológicos obtenidos de las imágenes



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)

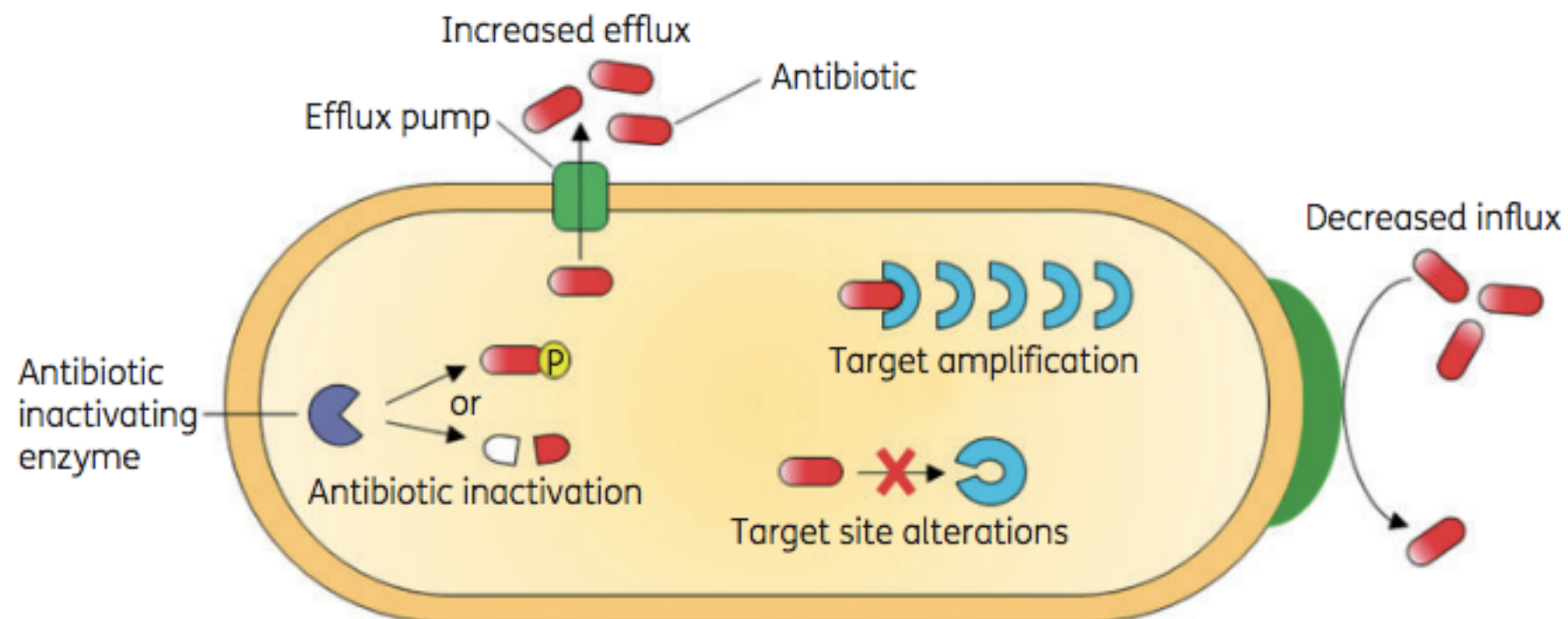
Implicadas en la **resistencia** a **antibióticos**
evidencia creciente rol en **biofilms**

Bombas de flujo

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**



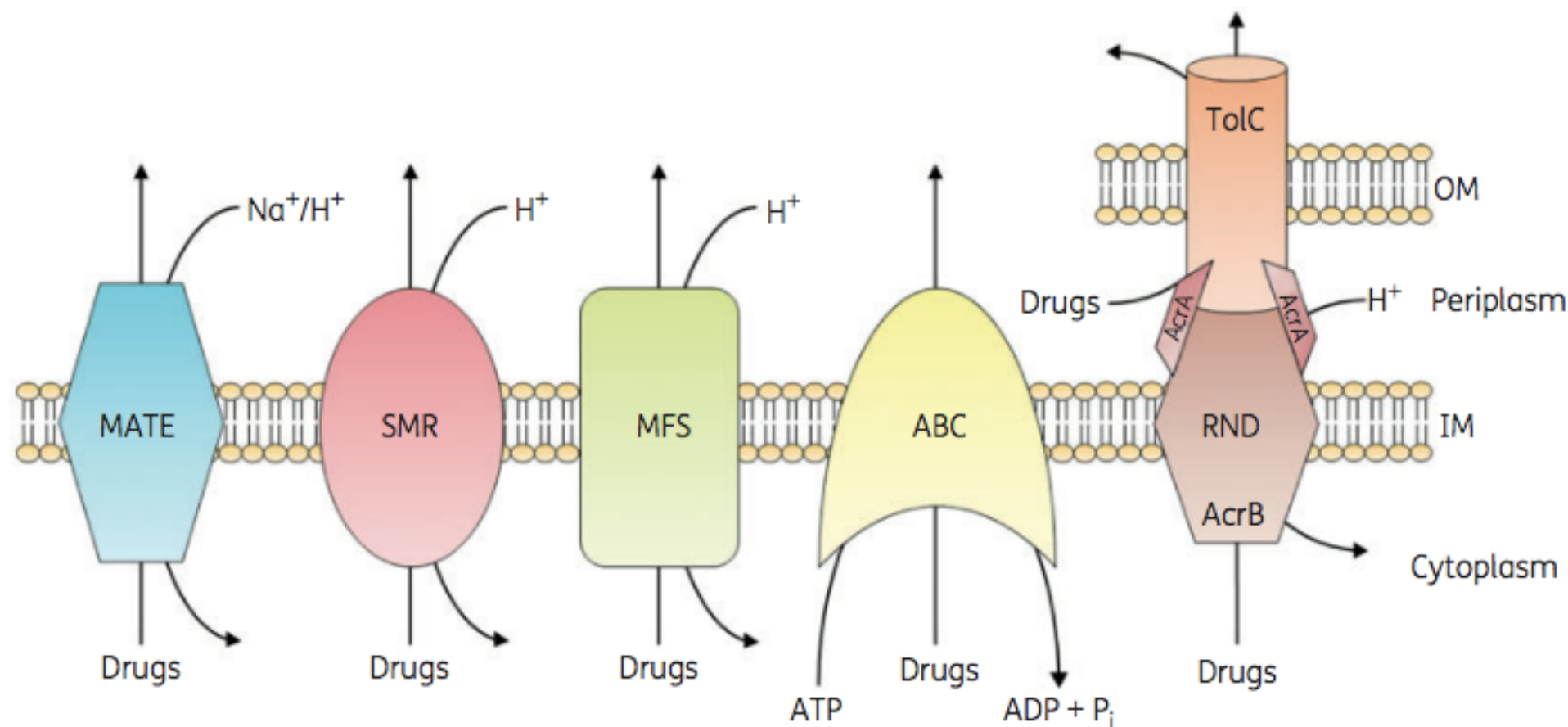
Proteínas de membrana involucradas en **exportar** sustancias nocivas desde el interior celular al medio externo

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



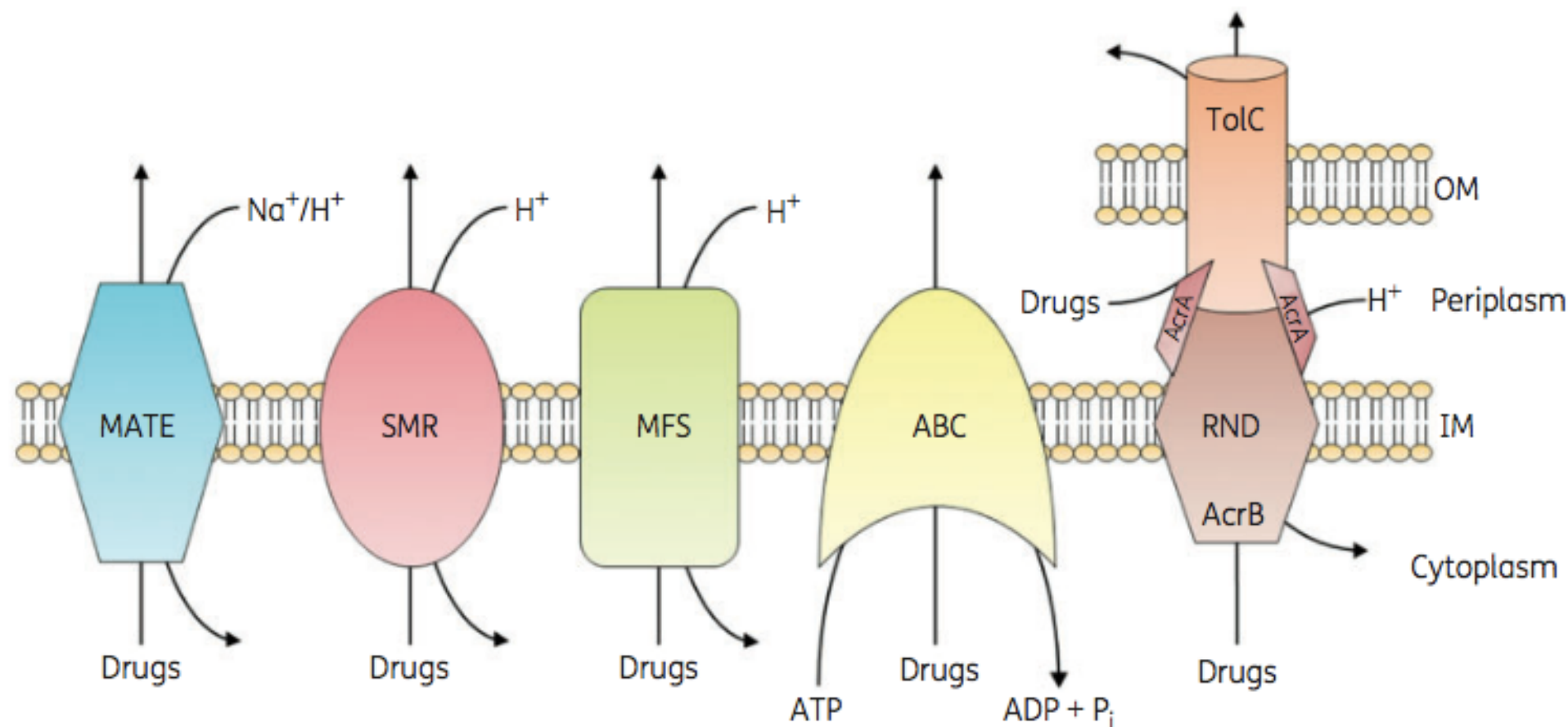
MATE: Multidrug and toxin extrusion

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



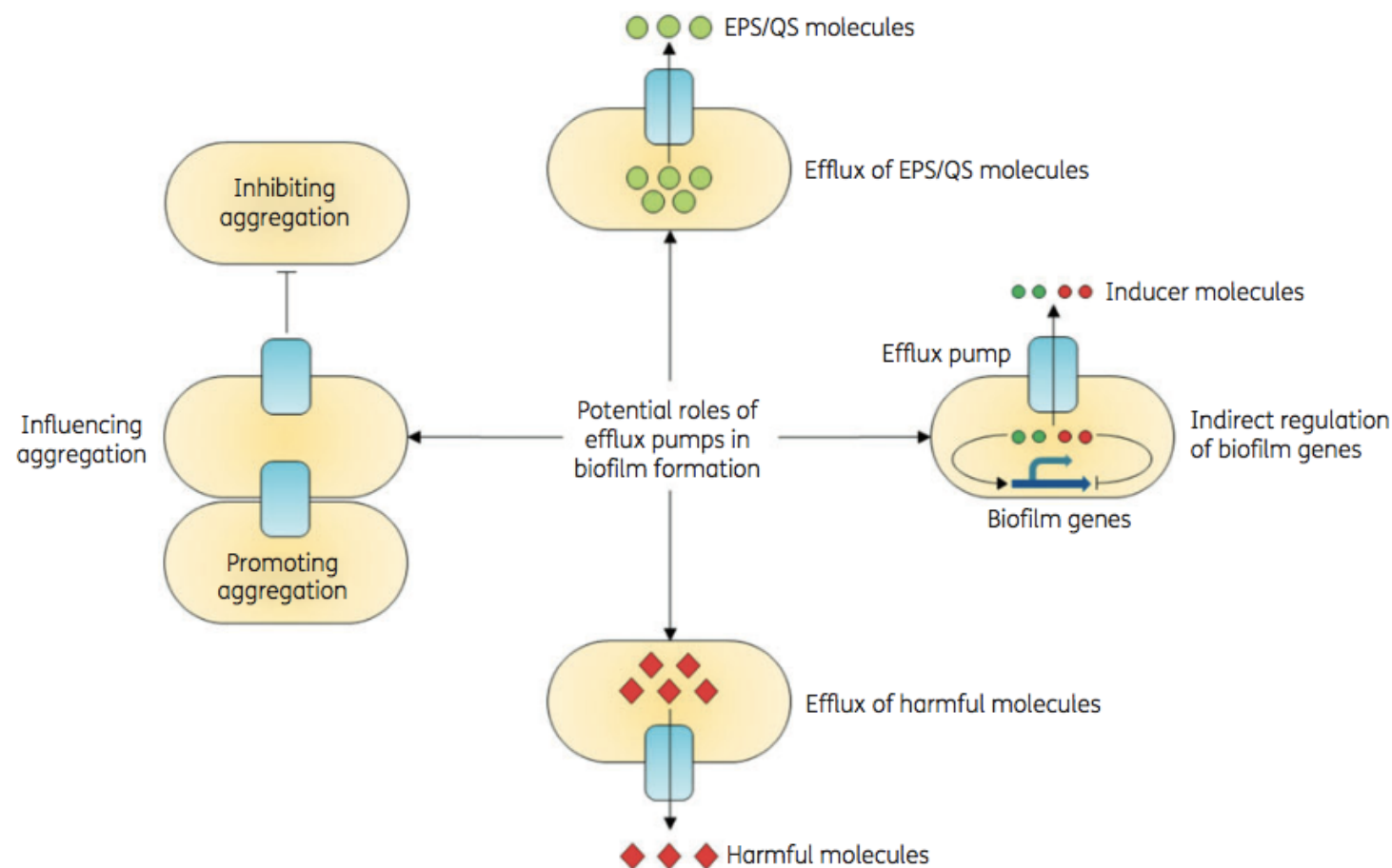
Formación de **biofilms**, quorum sensing (QS), patogenicidad y virulencia

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

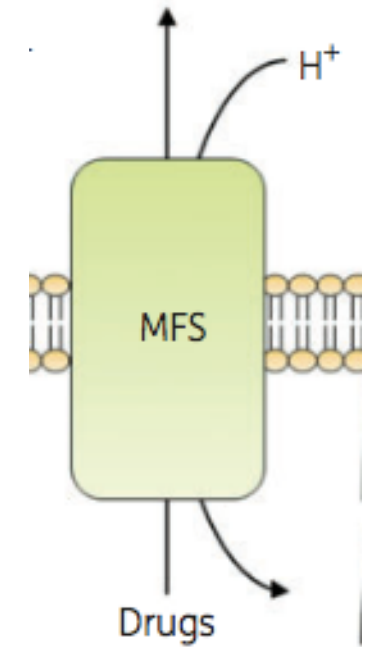
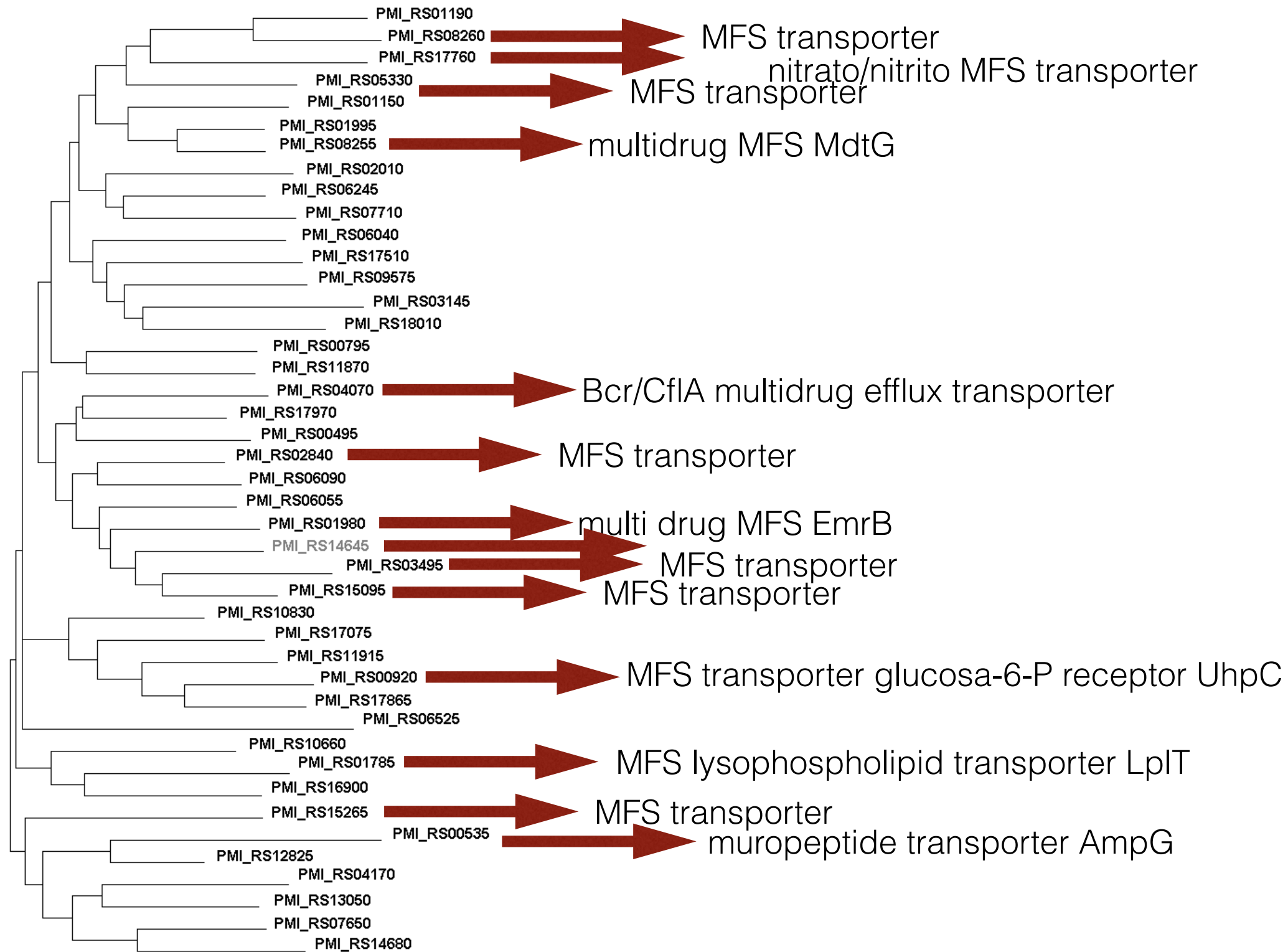
regulación indirecta de **genes** involucrados en la formación de biofilms

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

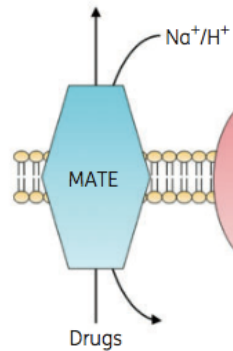
influencia en **agregación** promoviendo o previniendo la adhesión



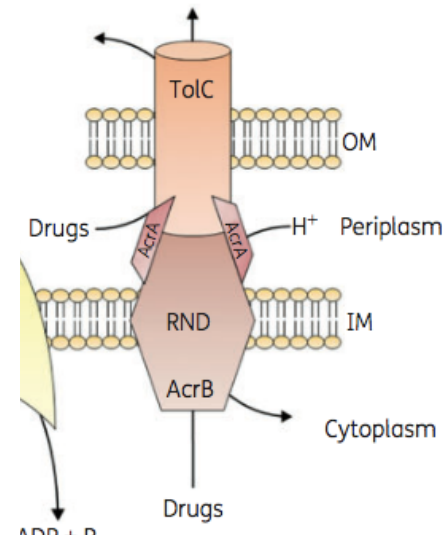
Proteus mirabilis bombas del tipo MFS



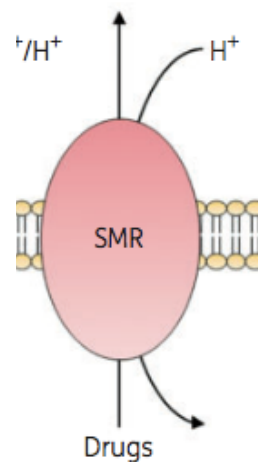
Proteus mirabilis bombas



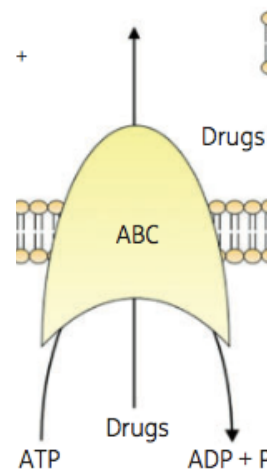
PMI_RS00720



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

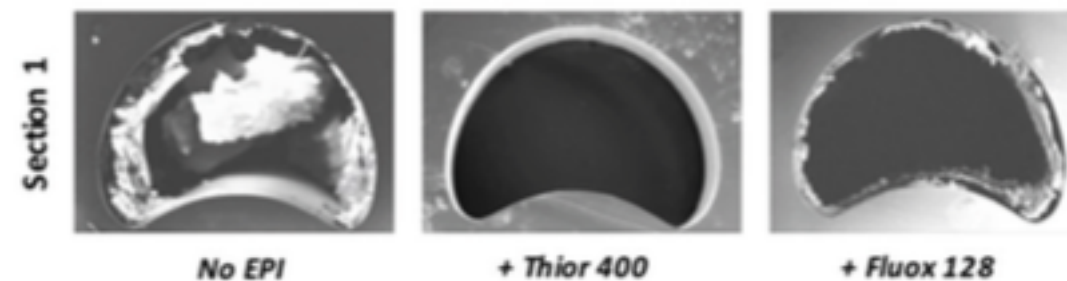
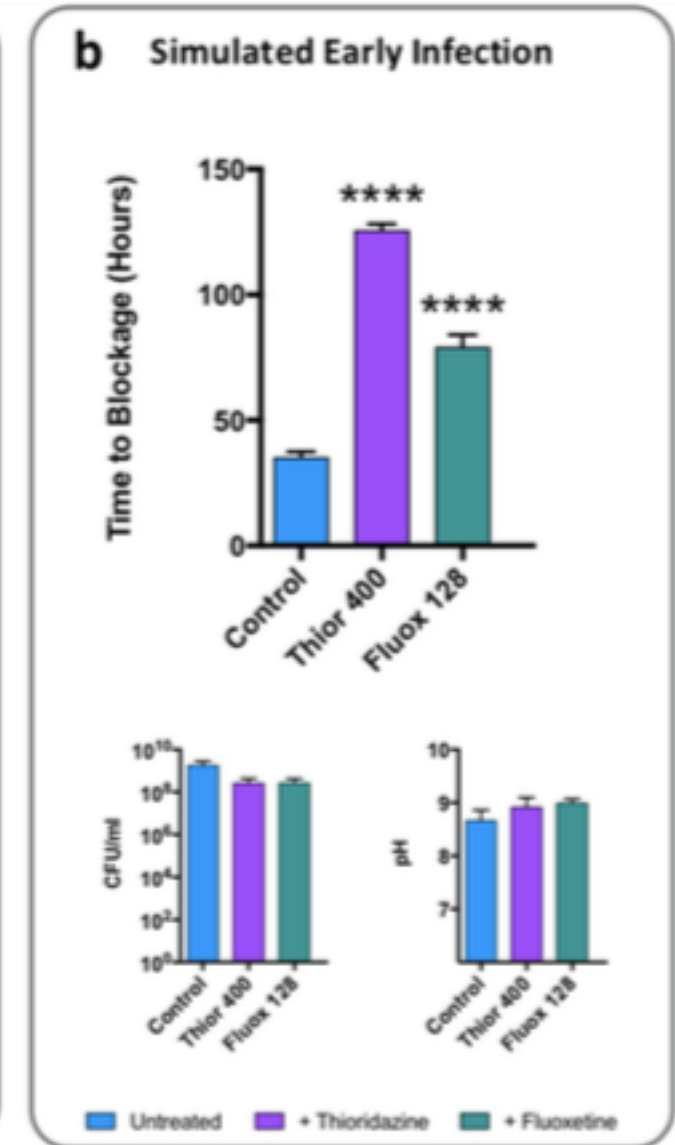
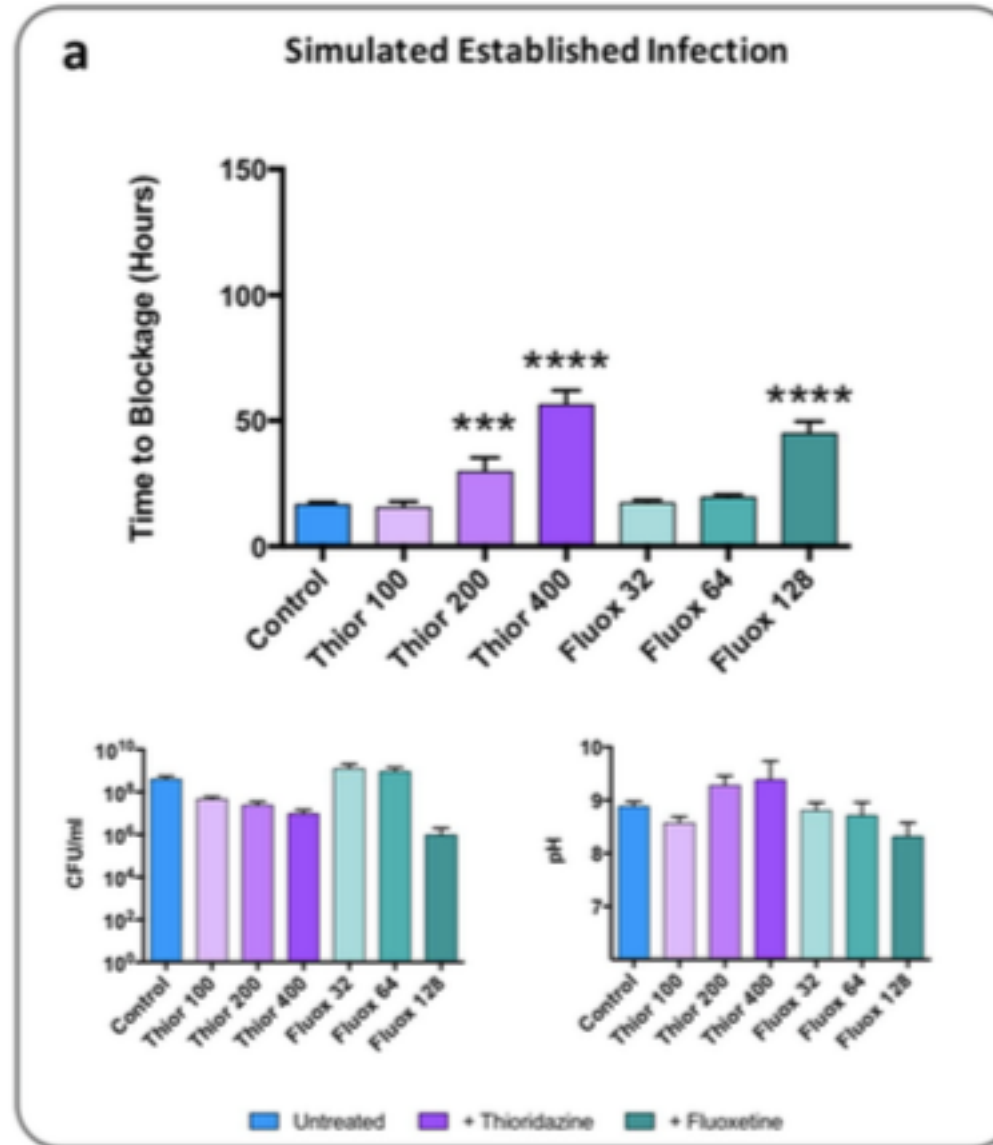
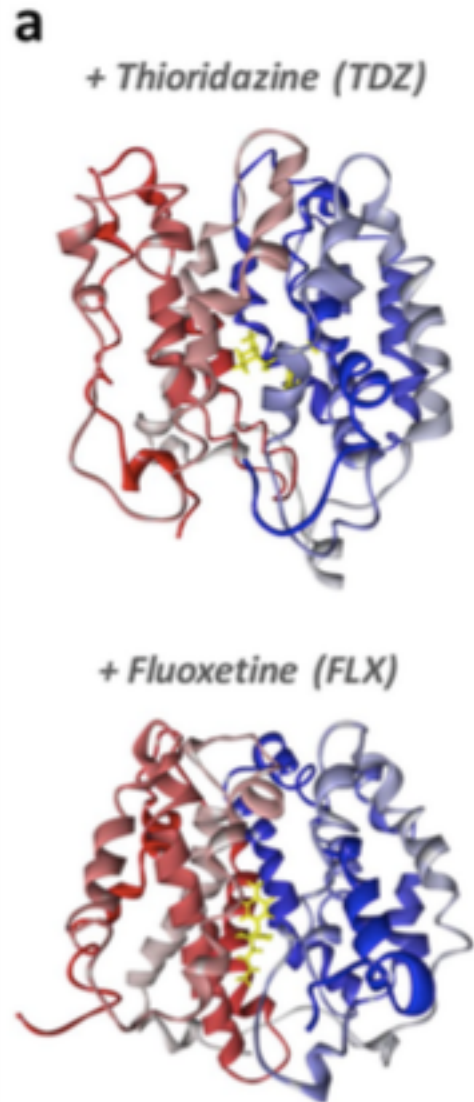


172 genes que codifican para ABC transporters

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

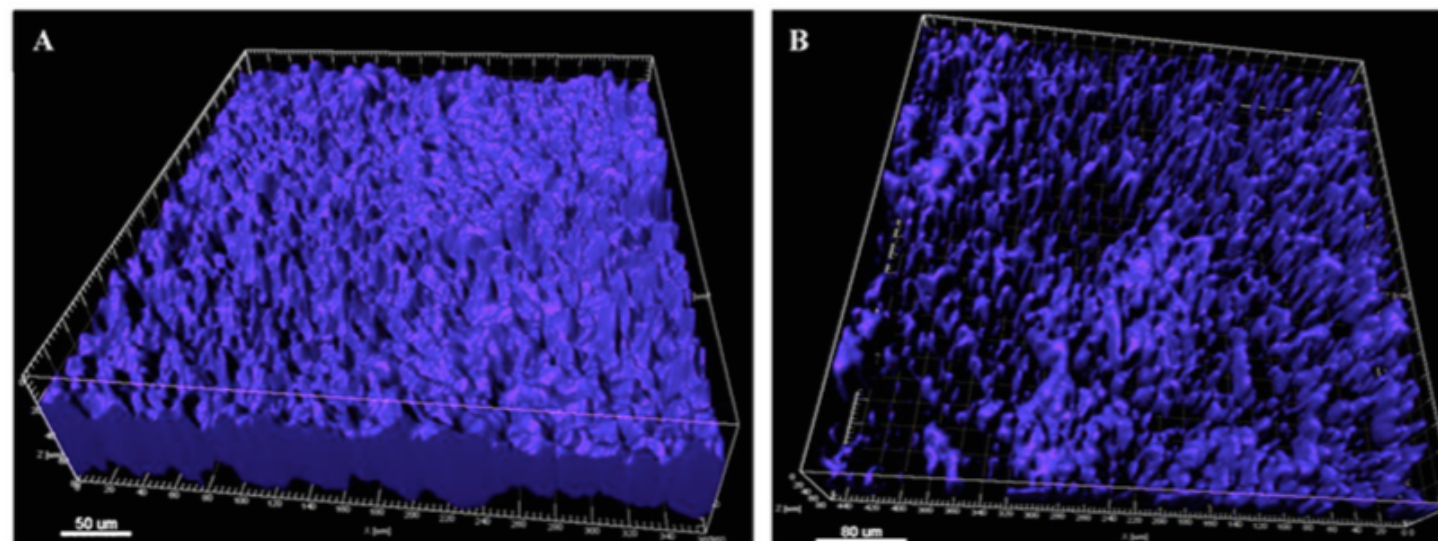


Figure 1. Biofilms of *E. coli* strain MG1655. Biofilms cultured (A) for 3 days under aerobic conditions and (B) for 6 days under anaerobic conditions. The

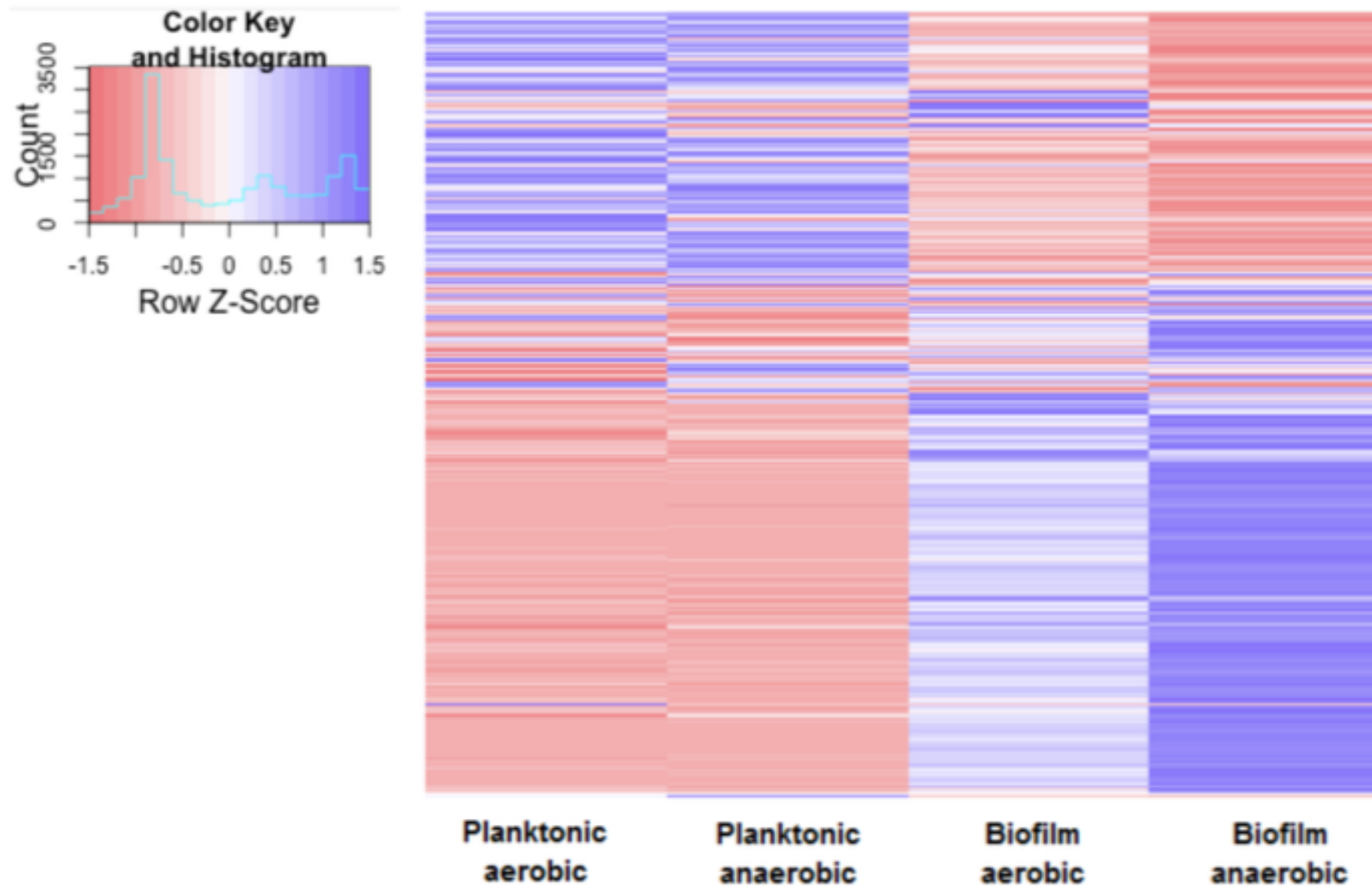


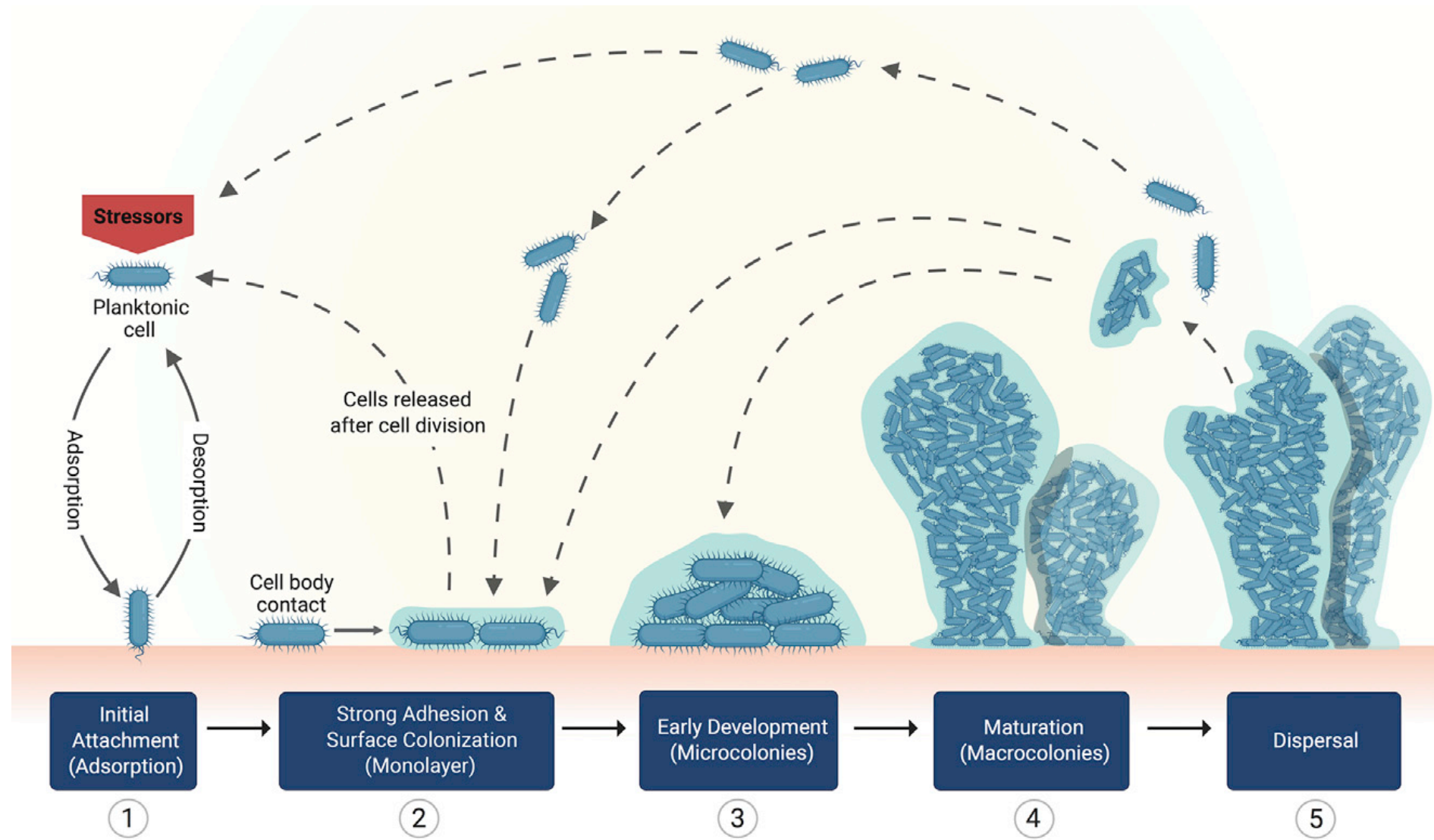
Figure 2. Whole-gene expression profile of planktonic and biofilm cultures growing under aerobic and anaerobic conditions. A heatmap of a hierarchal cluster of

Function		Name	Product	Fold difference
Amino acids	Asparagine	<i>asnA & 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 α , ϵ , β , γ , δ 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 & C</i>	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod	*	
	<i>flgK & 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 & 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 G¹, 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.