

A cada persona ens fascinen coses diferents i això ens porta a aprendre sobre certs temes, que normalment uneixen allò que ens agrada i allò per al que servim. Hi ha realimentació positiva, ens surt més o menys bé i ens animem i continuem.

BIOFILMS ON THE ROCKS

Roldán M., Ramirez M. & Hernández-Mariné M.¹ marionahernandez@ub.edu

¹Botànica, Fac.Farmàcia. UB. Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona

Una cèl·lula viva té una beina de polisacàrids, proteïnes i lípids; està programada per ADN, es comunica per senyals químiques, es repara i es replica.

Tenen capacitat de resistència adquirida després de milers de milions d'anys d'evolució i, si canvia l'ambient, s'ajusten.

"Un biofilm és una comunitat microbiana sèssil, caracteritzada per cèl·lules unides irreversiblement a un substrat o interfase o entre elles, embegudes en una matriu de substàncies polimèriques extracel·lulars autogenerades i que, a més, presenten un fenotip diferent del de les formes lliures respecte a la taxa de creixement i a la transcripció genètica.



Collbató (Barcelona, Spain)



Catacumba Domitila (Roma, Italia)

Es formen biofilms en lents de contacte, pulmons o edificis. Nosaltres estudiem bàsicament les biofilms fotosintètics que es formen en llocs amb escassa llum, en coves o catacumbes, majorment pertanyents al patrimoni arqueològic. Amb la il·luminació per ser visitades s'afavoreix la colonització per microorganismes fototròfics i el creixement secundari de bacteris heterotròfics.

Els biofilms es desenvolupen en funció de les condicions ambientals i les propietats físico-químiques dels substrats.

L'activitat microbiana contribueix a l'alteració dels materials, causa deteriorament químic i / o mecànic en el suport i incrementa la pèrdua de partícules de l'estructura mineral.

Es consideren estèticament desagradables les pàtines polsoses

Biofilms

Estudiem i identifiquem els organismes fotosintètics que formen els biofilms i els seus pigments. També es descriu l'estructura tridimensional dels biofilms, la seva penetració dins del substrat, el possible dany i possibilitats de remei a la biodeterioració

La colonització pot ser duta a terme per una sola espècie o moltes però, un cop establertes i depenent de les condicions ambientals, la multiplicació cel·lular porta a la proliferació de les comunitats i la consegüent colonització del substrat. Els biofilms formen biocenosis complexes que poden incloure diversos tipus d'organismes com ara bacteris i cianobacteris, fongs, llevats, i algues. En alguns casos es treballen separatament les espècies amb enfoc polifàsic: fenètic (morfològic, fisiològic....) i genètic. Els biofilms solen ser específics de cada hàbitat. Els productes metabòlics d'un organisme poden servir per al creixement d'altres, de la mateixa manera que l'adhesió d'unes espècies poden servir de base per a la unió d'altres. D'altra banda, la competència pels nutrients i l'acumulació de productes tòxics generats pels colonitzadors primaris poden limitar la diversitat d'espècies del biofilm o afavorir el desenvolupament d'altres organismes.

Desenvolupament d'un biofilm

Els microorganismes son capaços de sobreviure molt de temps en estat quiescent, esperant la seva oportunitat

Poden colonitzar superfícies molt diverses. La capacitat d'una superfície per ser colonitzada es diu bioreceptivitat

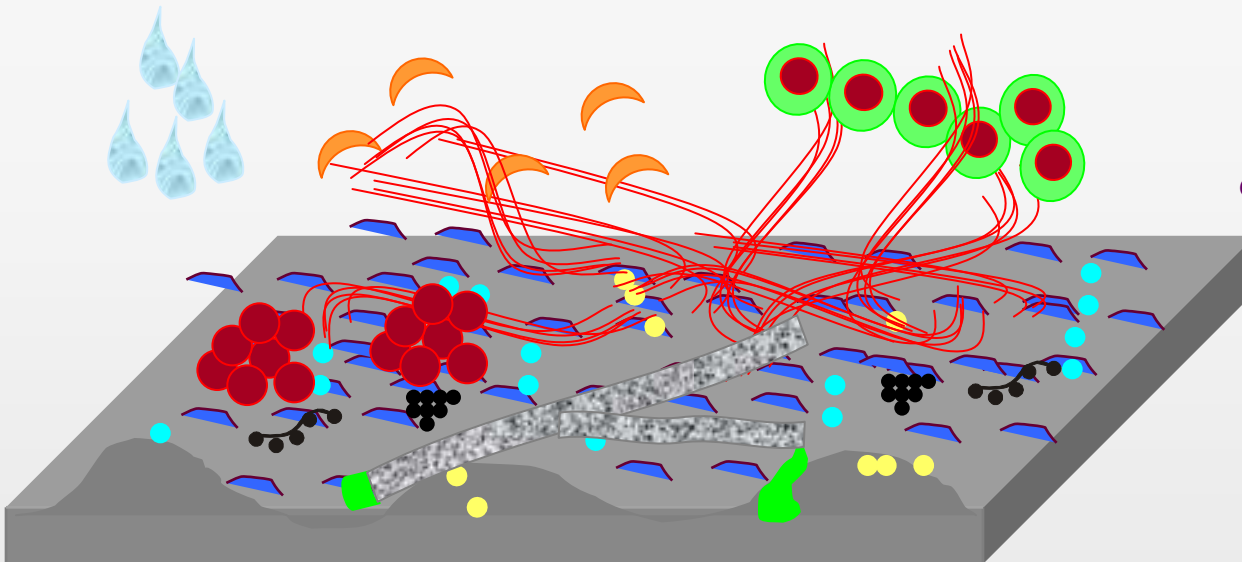
Els microorganismes poden canviar l'expressió dels gens, pasar de mòvils a quiescents, dividir-se i formar mucilag que els envoltara.

Es disposen de manera que maximitzen la captació de nutrients, deixant espais entre ells. Al mateix temps estan pròxims i intercanvien substàncies "quorum" que son senyals moleculars que els permeten regular el seu comportament

Segons la posició en el biofilm tenen activitats i gradients químics diferents . Actives i/o quiescents. Els biocides poden atacar i destruir alguns microorganismes, però d'altres, protegits i sense dividir-se, poden sobreviure

Els gradients químics creen microambients , de manera que els biofilms poden ser colonitzats per diverses espècies amb diferents nivells d'activitat.

Alguns dels microorganismes es separen del biofilm i donaran noves colònies.



CONTINGUT

i. TÈCNiques D'ESTUDI

ii. Quins organismes constitueixen els biofilms?

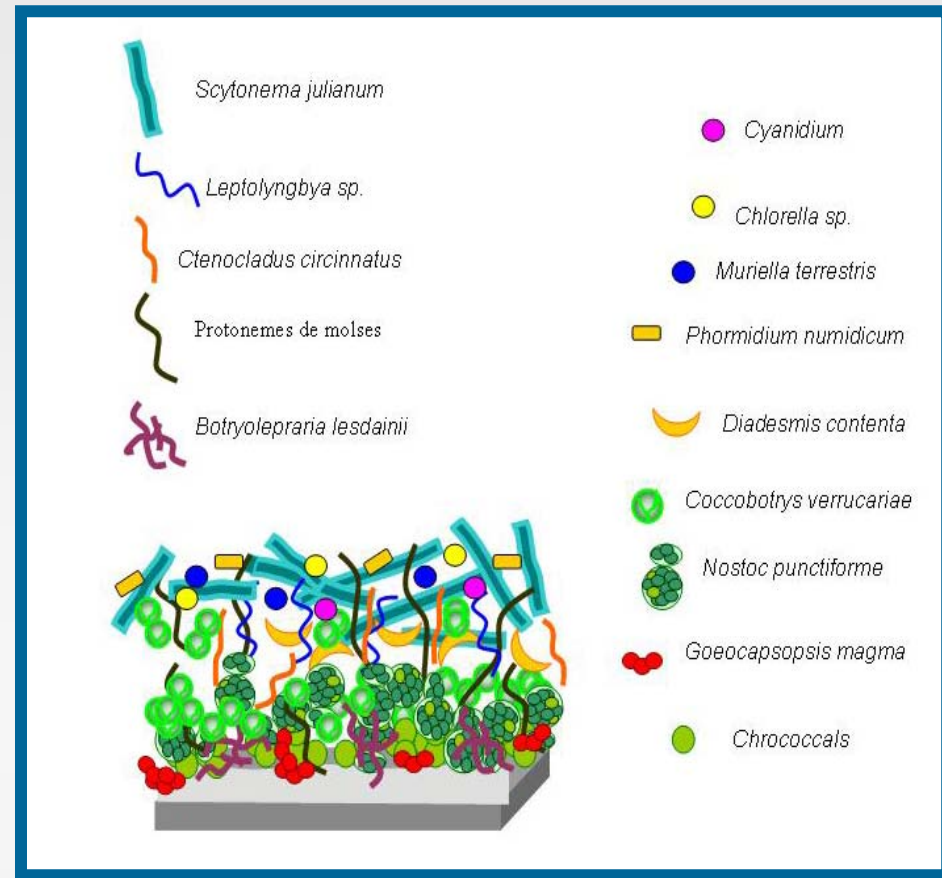
iii. Com s'organitzen dins d'aquestes comunitats? Arquitectura?

iv. Quins causen biodeterioració? Substrat?

v. Quins pigments/altres substàncies contenen?

vi. Com destruir-los?

vii. EXEMPLES



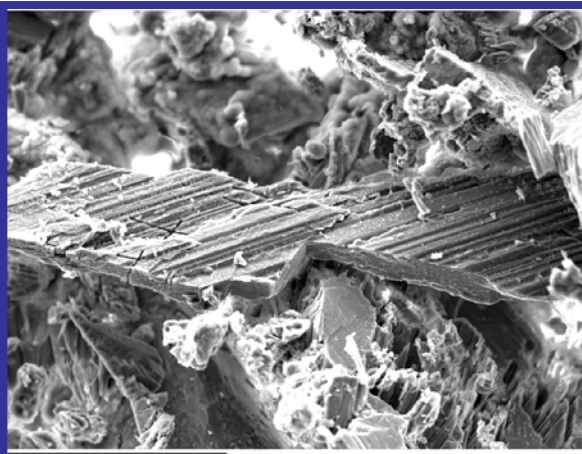
viii. Quins factors influencien la presència dels organismes i l'estructura dels biofilms?

BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS

Técnicas	Resultado	Resolución	Ventaja	Inconveniente
Fotografía convencional	Organización sobre superficies	c. 0,1 mm	Aspecto general	Baja resolución
Estereomicroscopia	Organización sobre superficies	c. 5 µm	Aspecto general pequeñas sup.	Baja resolución
Microscopía óptica	Microorganismos completos	c. 0, 20 µm	Asequible y facil manejo	Baja resolución
Microscopía láser confocal	Imágenes secuenciales	c. 0,05 µm	Iluminación en un sólo punto	Material fluorescente
SEM Electrónico de barrido *	Superficies	c. 1 nm	Alta resolución	Preparacion incómoda//vacío
ESEM E.ambiental de barrido *	Organismos casi vivos.	c. 1 nm	Escasa preparación Muestras húmedas	Peor imagen que en SEM
TEM Electrónico de transmisión *	Mapa de metales pesados/metalizado	c. 1nm	Alta resolución	Preparacion fuente de errores/ vacío
AFM Fuerza atómica	Topografía	Picómetros (10⁻¹² m)	Muy alta resolución	Pequeño tamaño
Refracción	Imágenes tridimensionales	c. 0, 20 µm	Información en tiempo real	Módelo no comercializado

* Permiten análisis químicos de los materiales;

Refracción: <http://www.technologyreview.com/Biotech/19227/>



Exemples de substrats. Identificació d'elements químics i de dipòsits associats als biofilms



SEM

Microscòpia
electrònica de rastreig
(topografia)

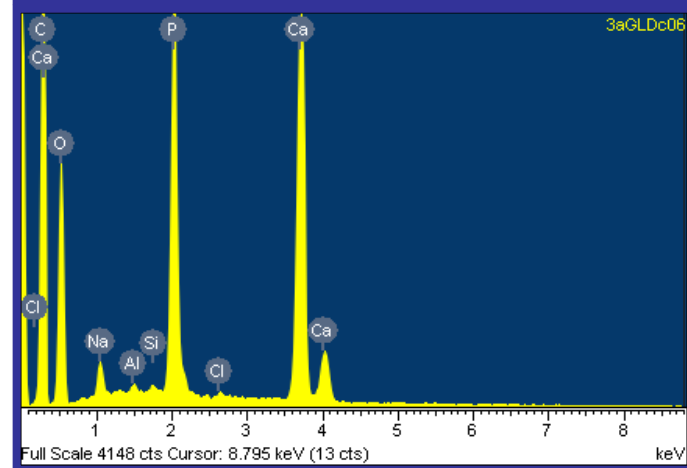
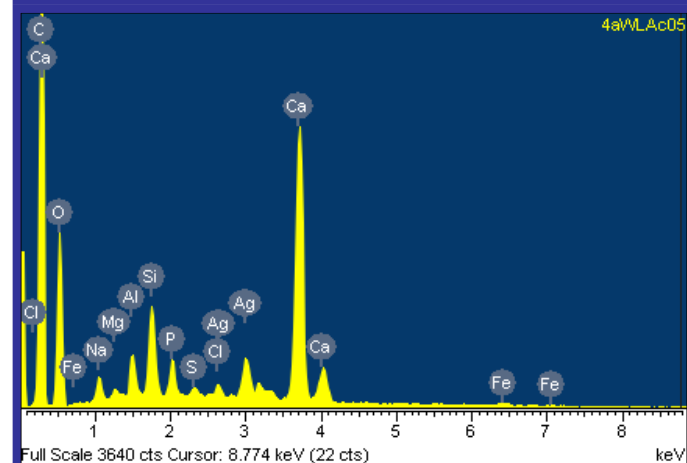
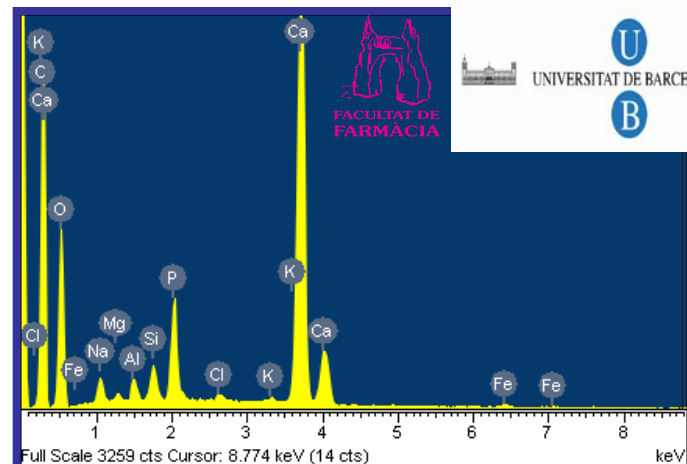
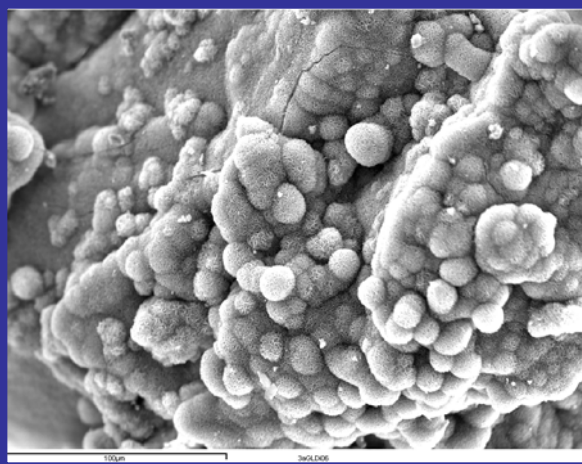
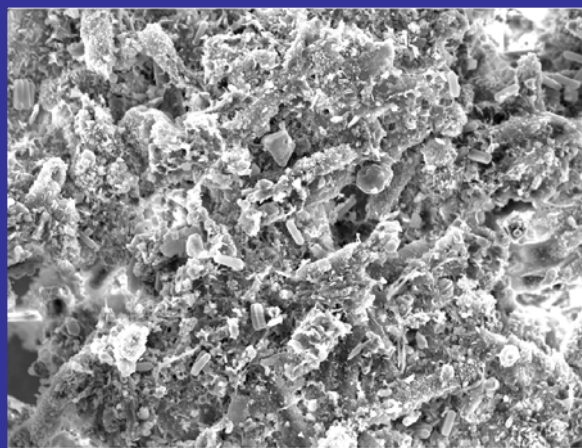


BSE

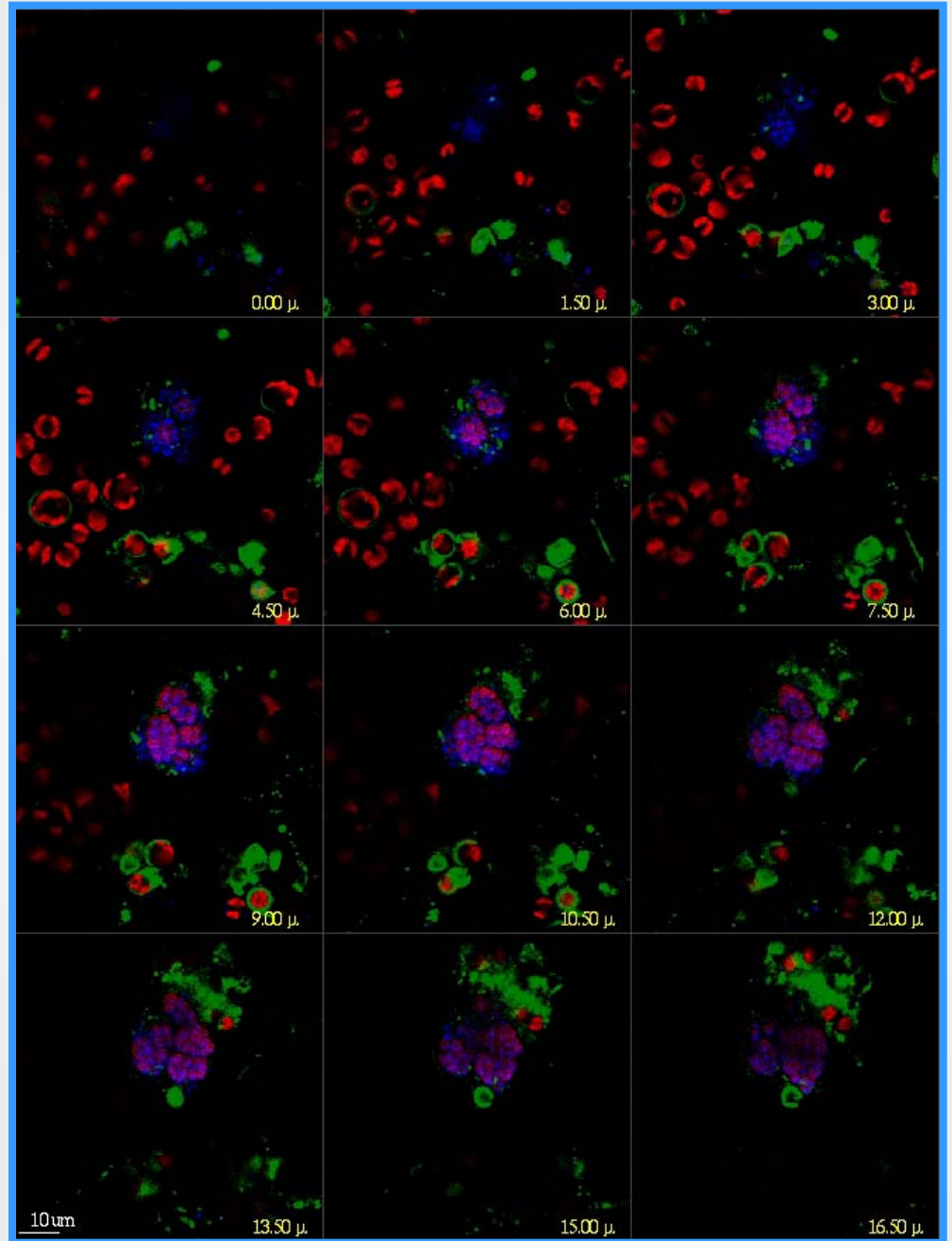
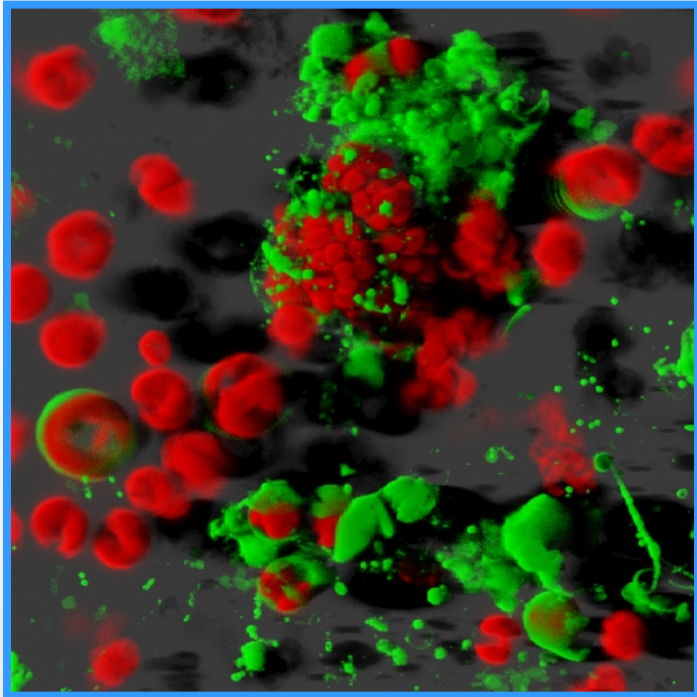
Electrons
retroprojectats



Orgànic-inorgànic

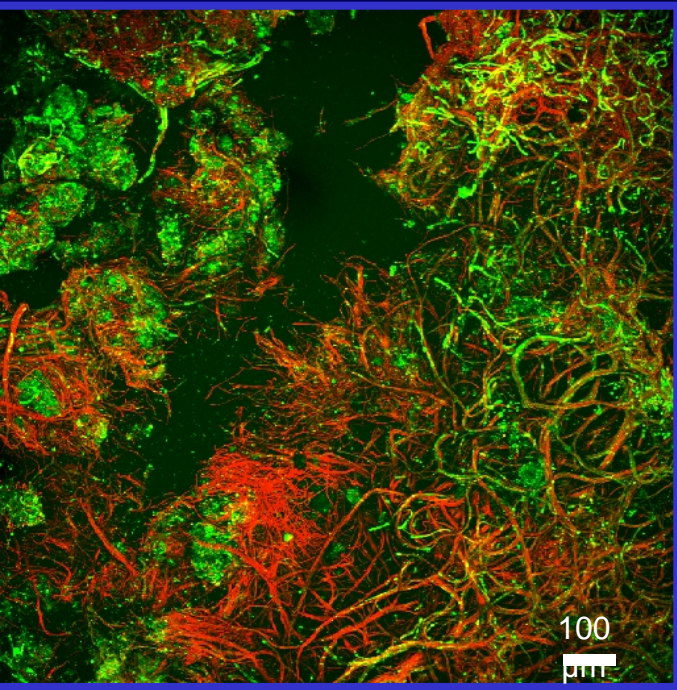


Exemples de processat
d'imatges de biofilms:
màxima intensitat de
projecció i galeria

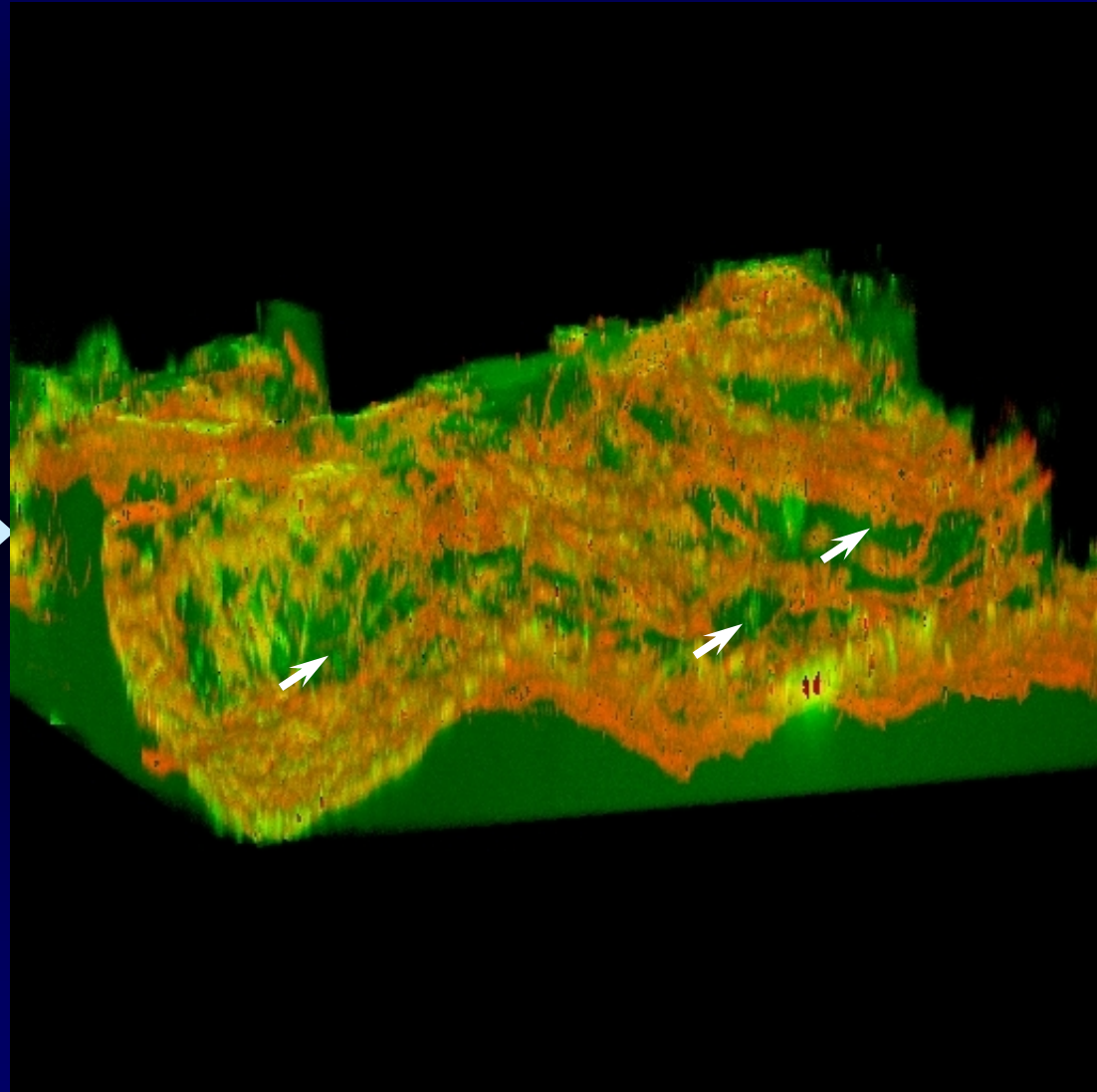
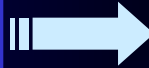


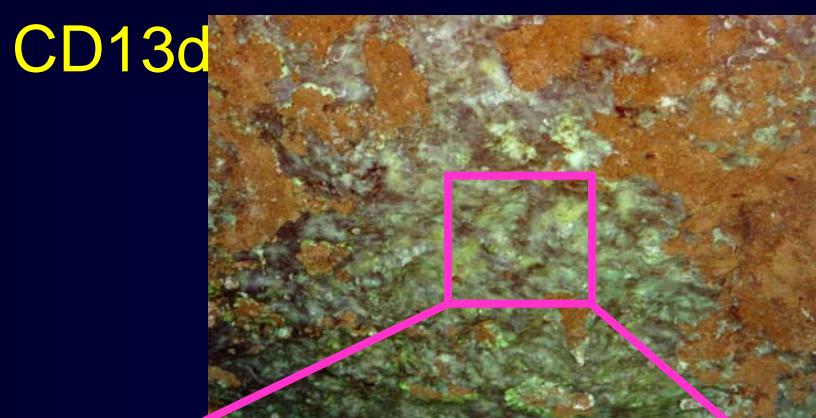
Perspectiva

Max. Intensitat de Projecció



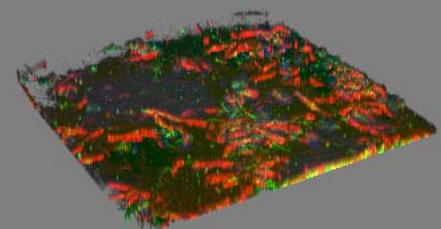
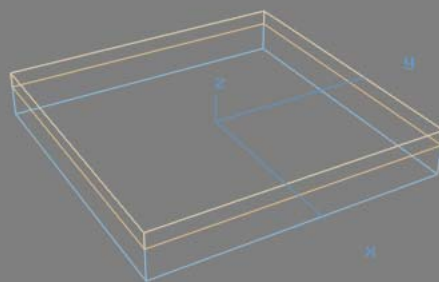
Csc16c



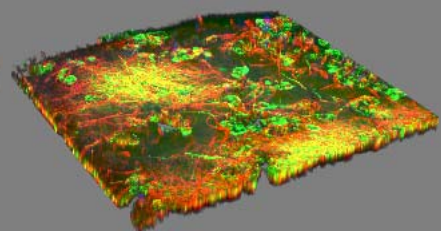
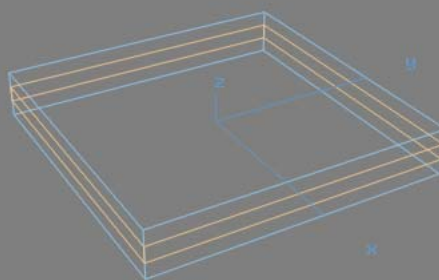


Perspectiva

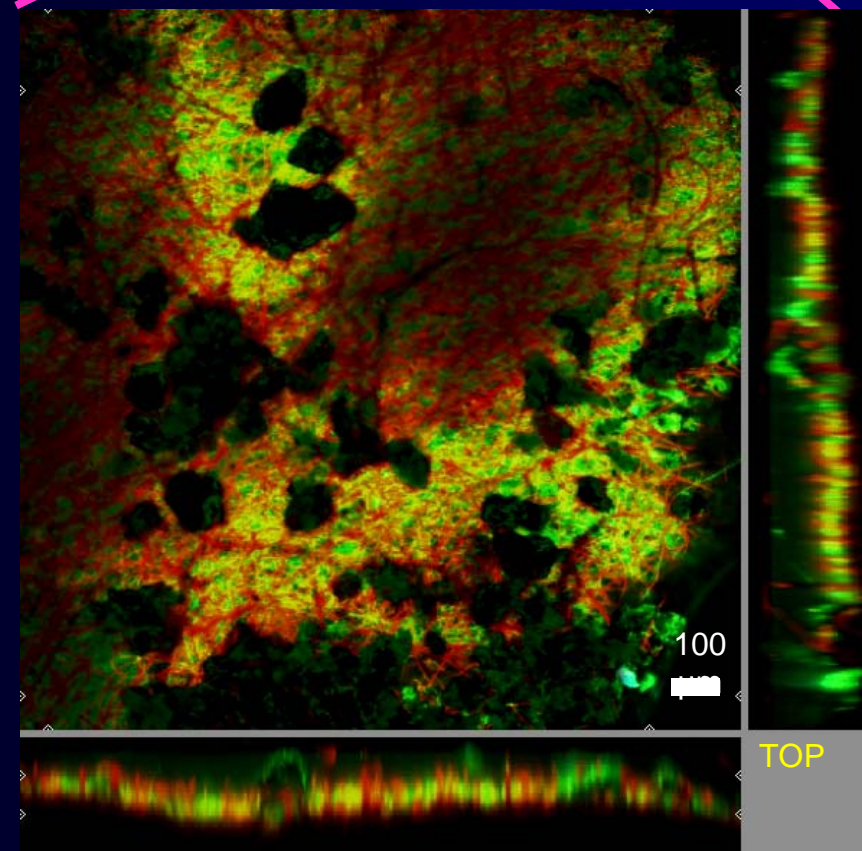
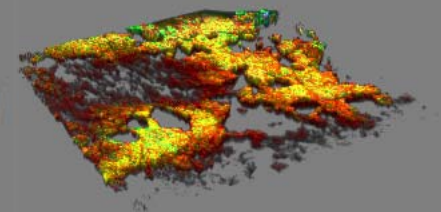
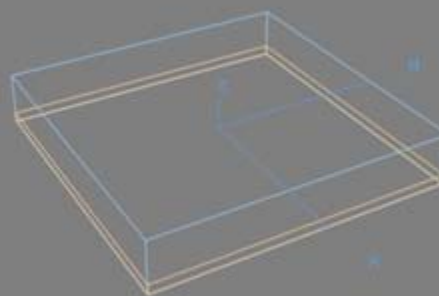
TOP



INTERMEDIATE



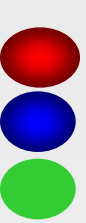
BOTTOM



TOP

Substrat

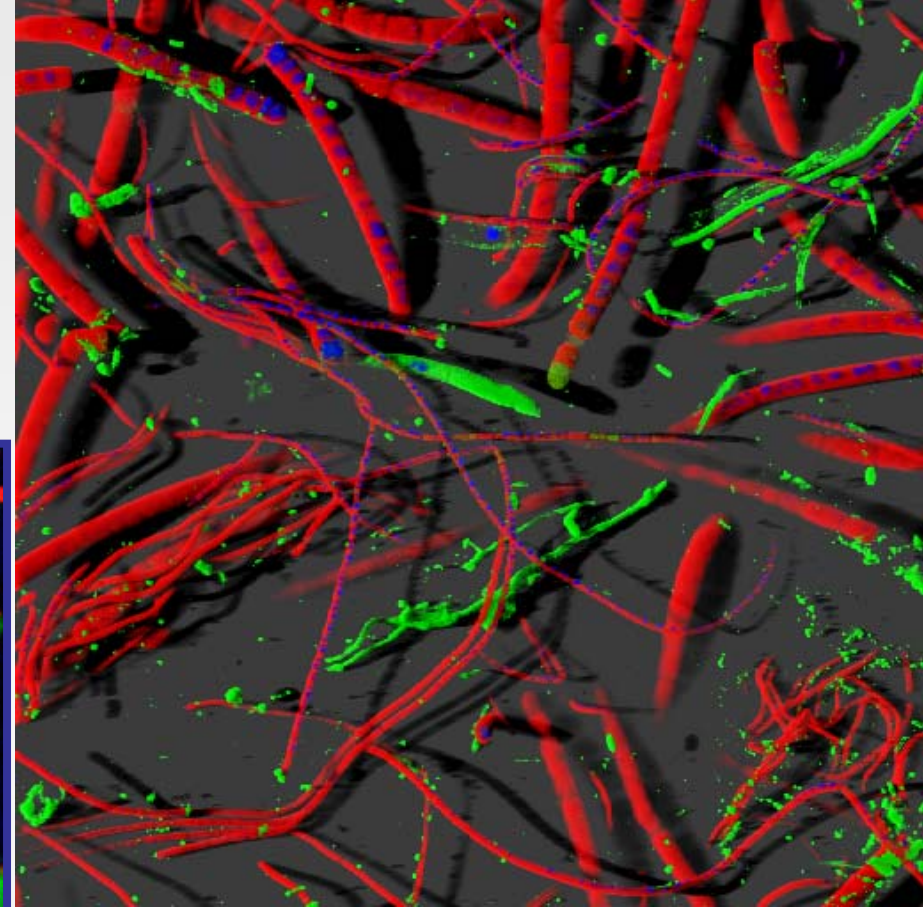
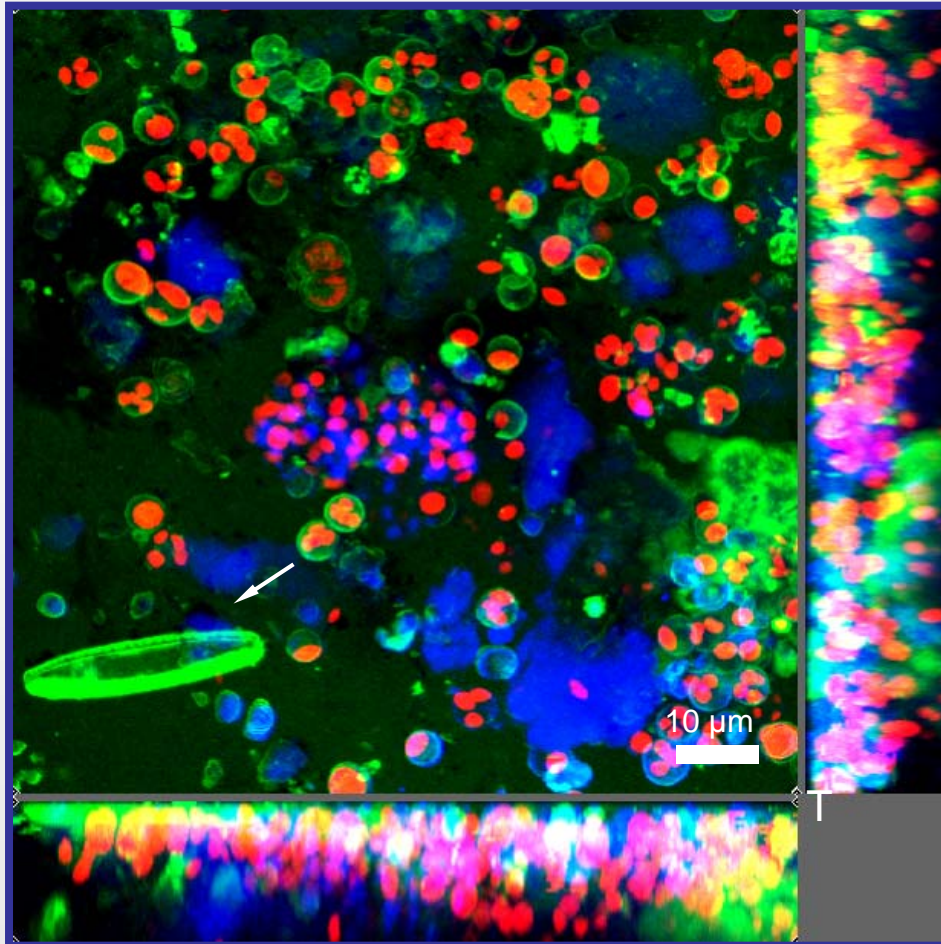




Chl a + ficobilines

DNA

Polisacàrids con-A



Exemples de processat d'imatges de biofilms: màxima intensitat de projecció i "expanded phocus", incloent fluorescència de pigments

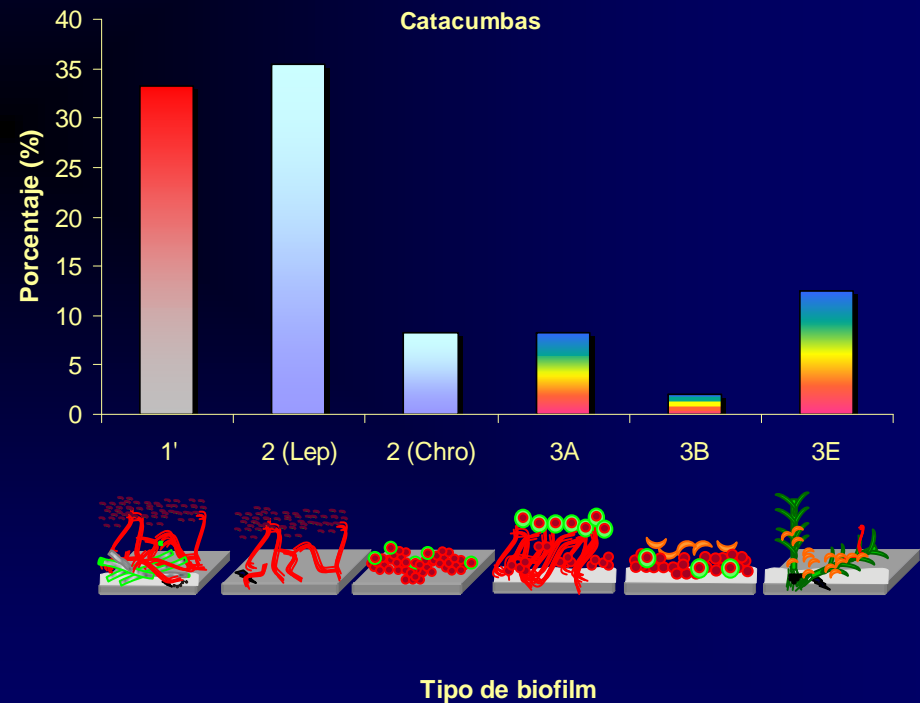
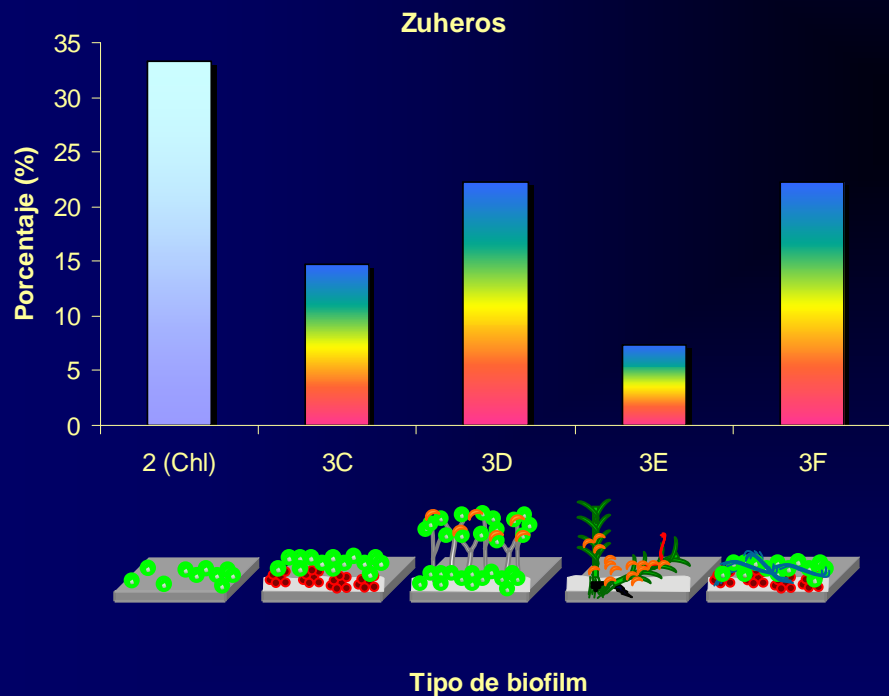
16.40 μm de gruix

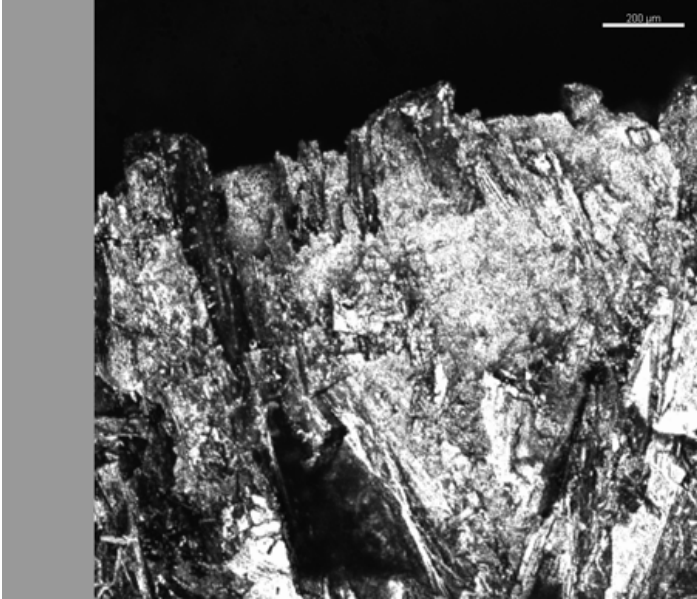
Gruix total*: 50.3-167 μm

Gruix del biofilm: 6.5-25.5 μm

Gruix total*: 116-564 μm

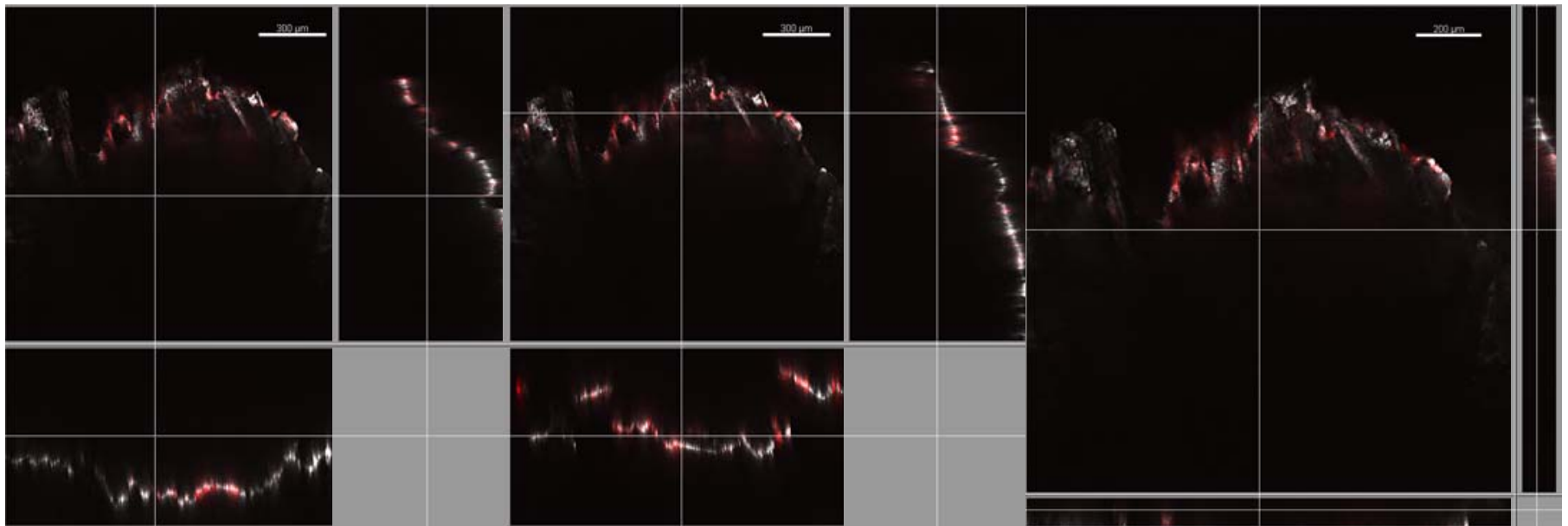
Gruix del biofilm: 14.7-84.8 μm





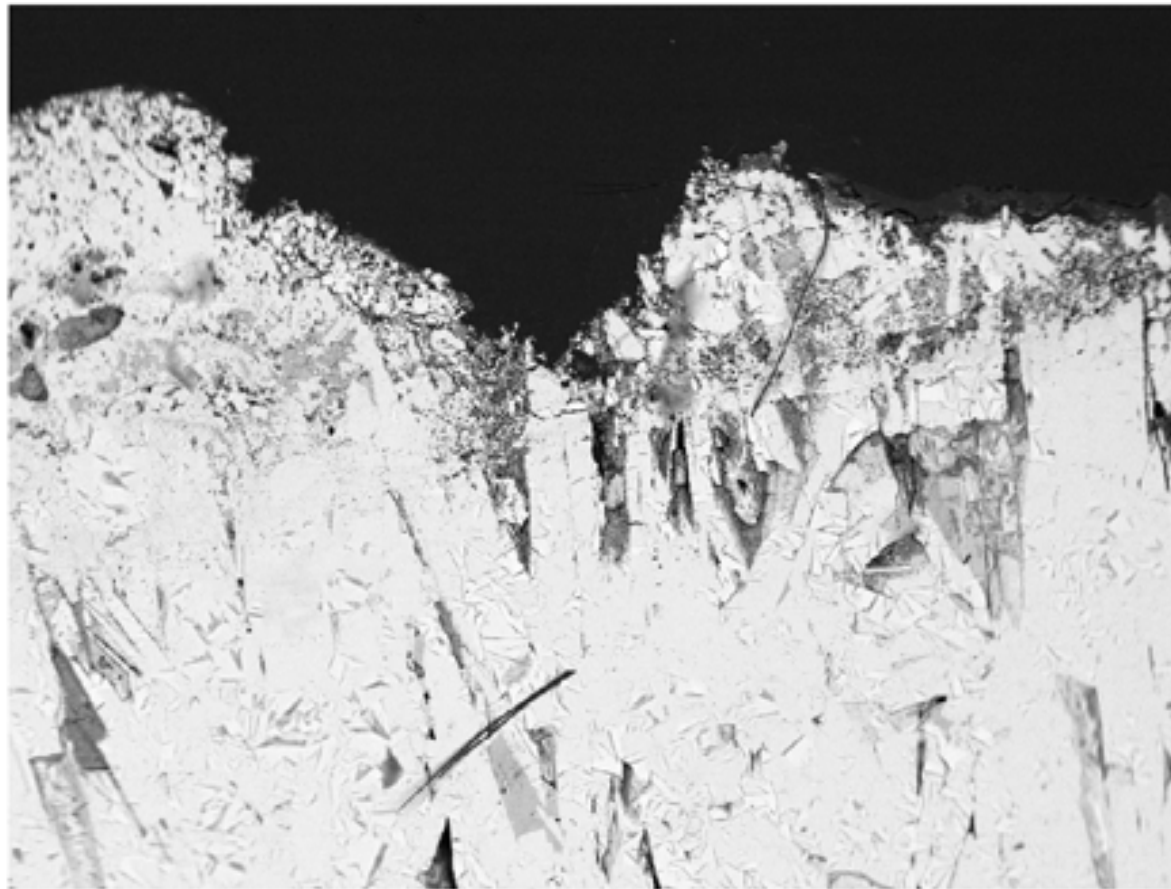
Substrat en blanc. Els microorganismes fotogròfics, en vermell, es troben en el interior de la roca.

CSLM imatge. Gruix total 873,4 μm. Màxima intensitat de projecció of 152 imatges.



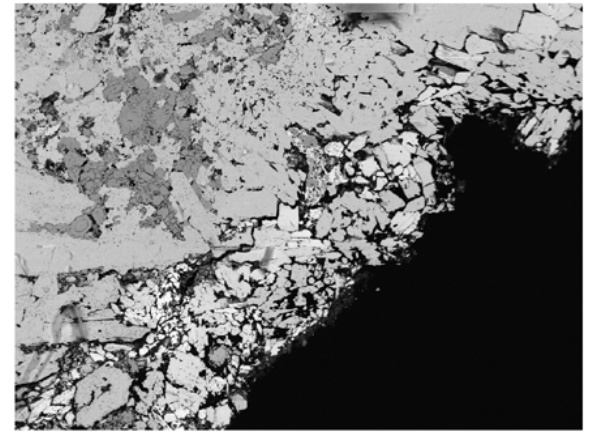
Nerja (Malaga)

CSLM. Seccions individuals



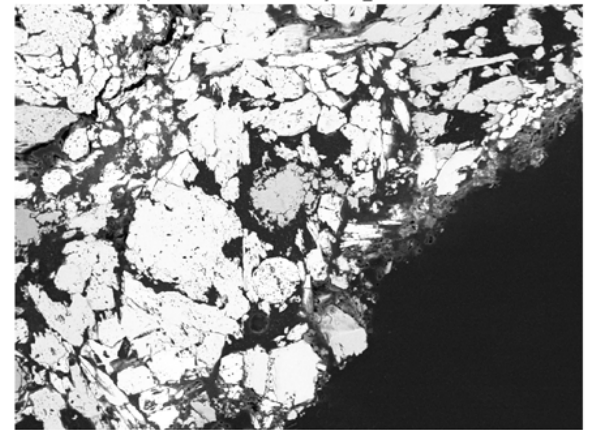
2mm

nerja004_068



600µm

nerja004_046

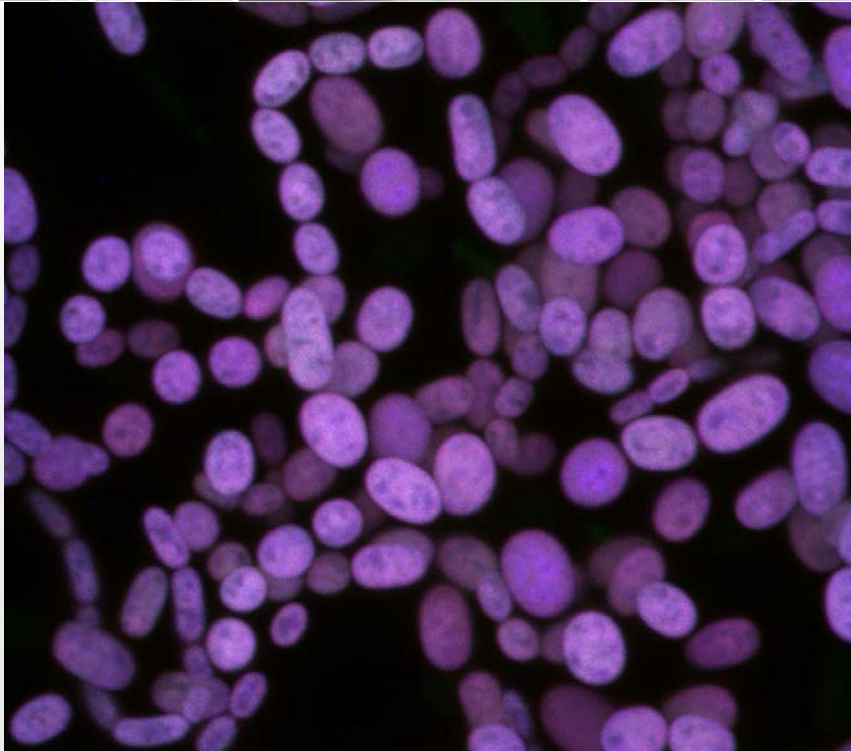
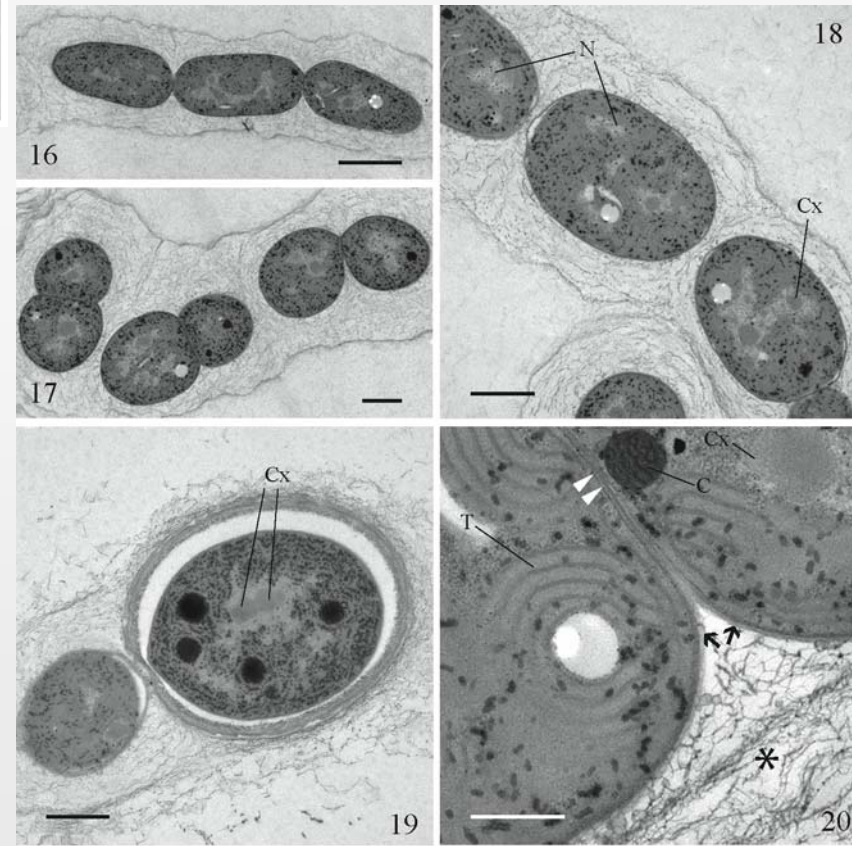
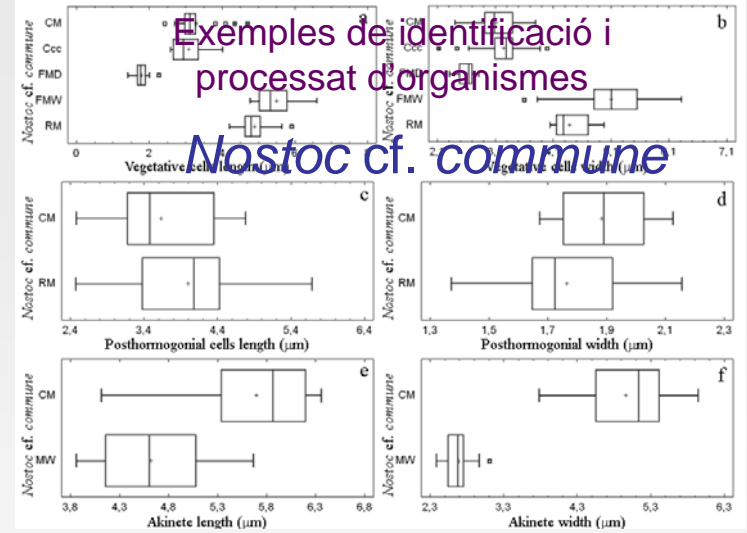
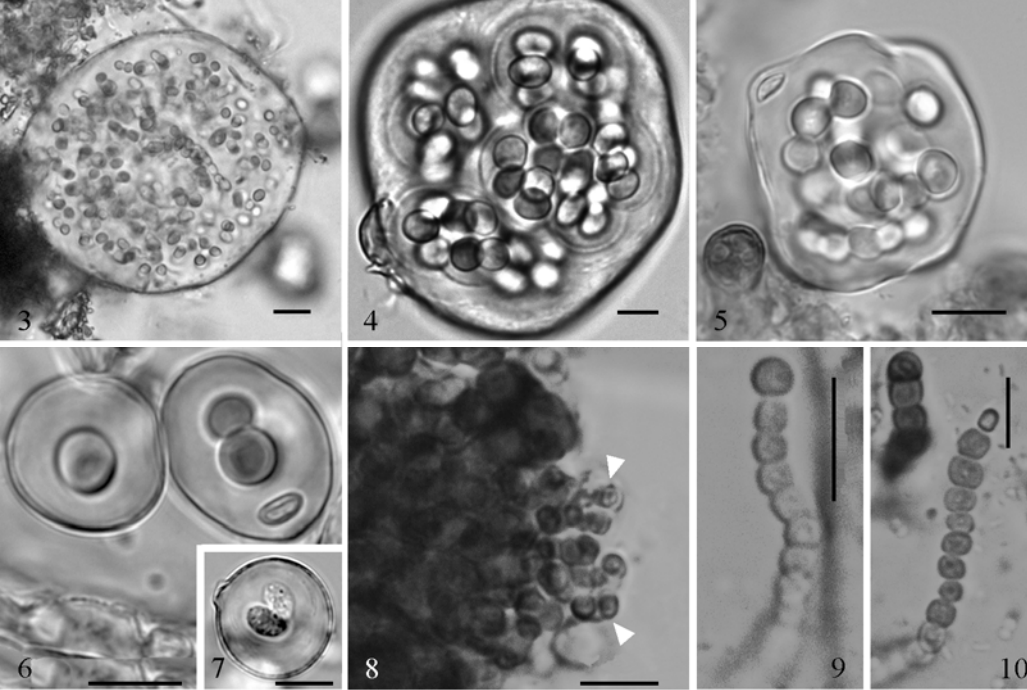


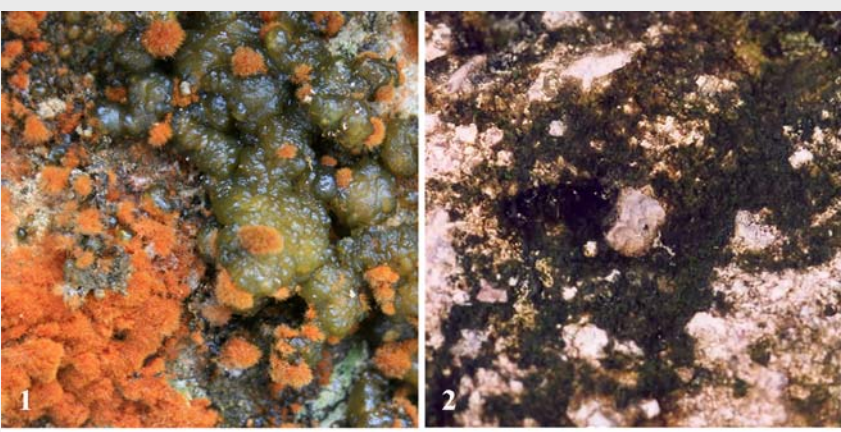
200µm

nerja004_064

SEM (microscòpia electrònica de rastreig) usat per al monitoratge de les relacions entre els biofilms i el substrat; BSE (imatge d'electrons retroprojectats) per detectar diferències entre els materials orgànics i inorgànics.

Nerja (Malaga, Spain)

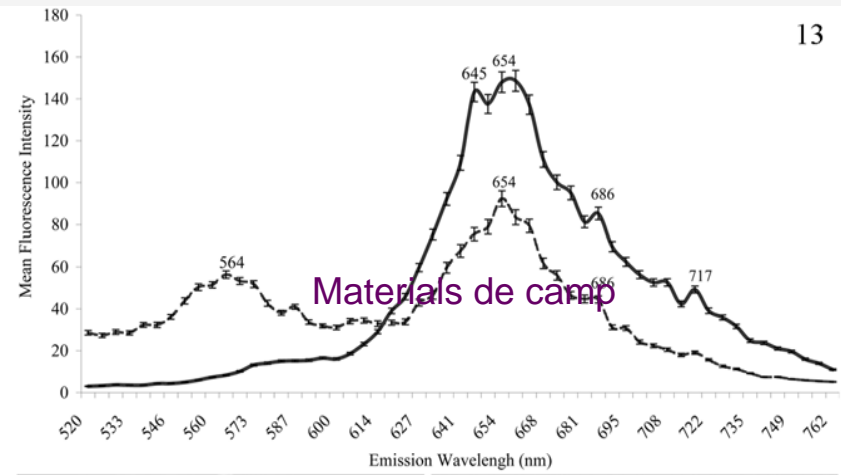
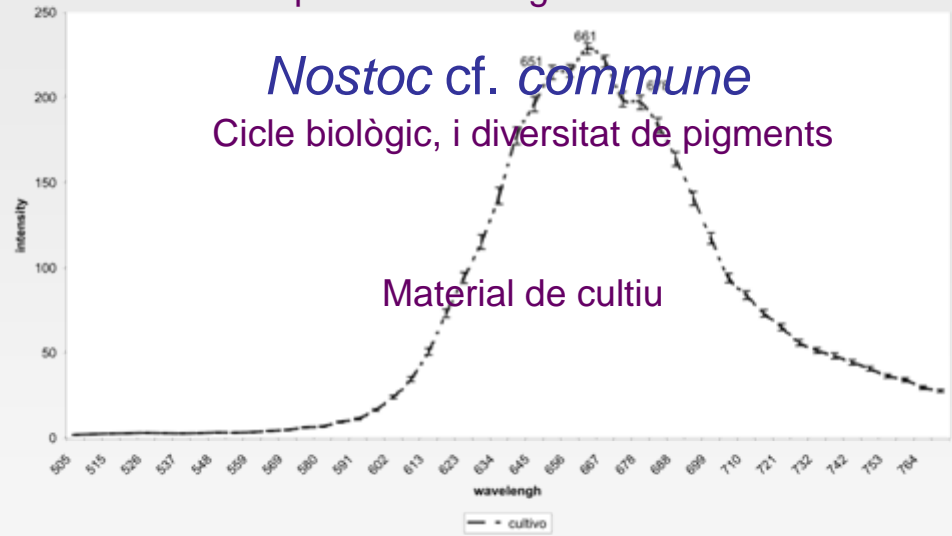




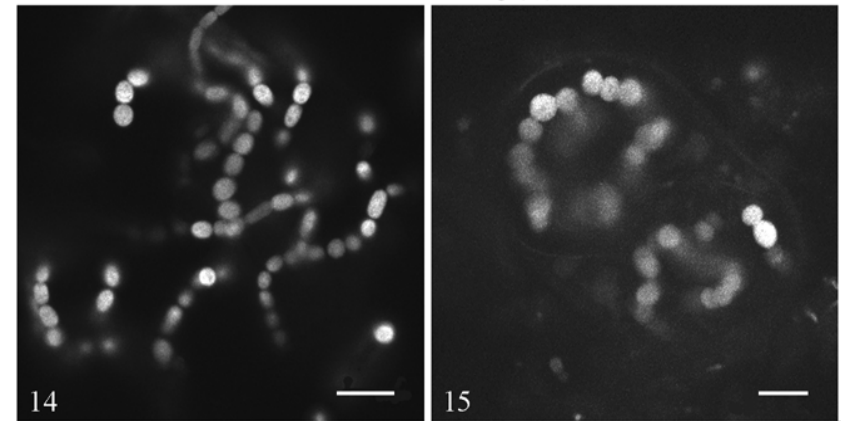
Exemples de identificació i processat d'organismes

Nostoc cf. commune

Cicle biològic, i diversitat de pigments

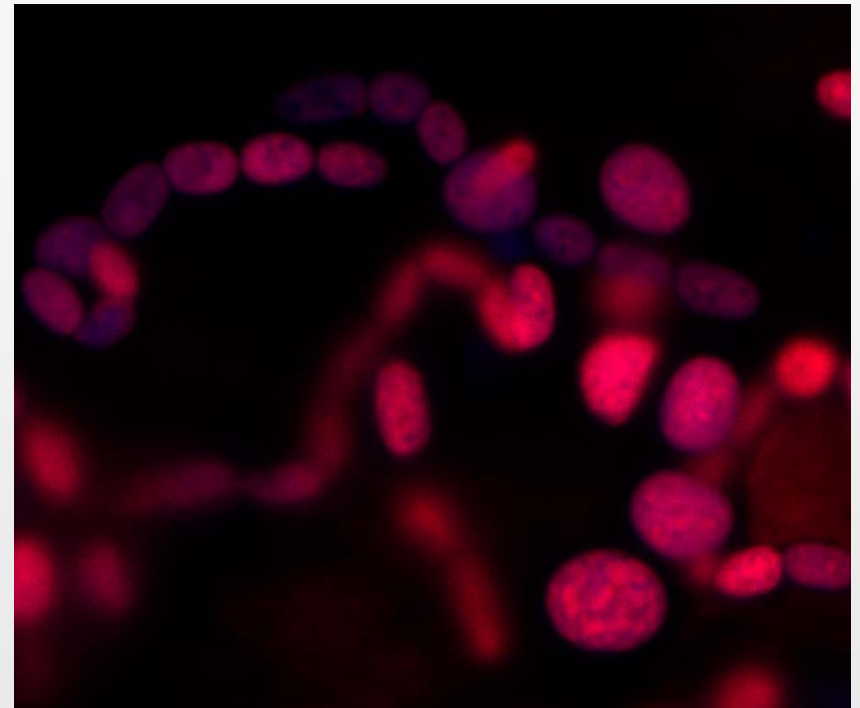


13



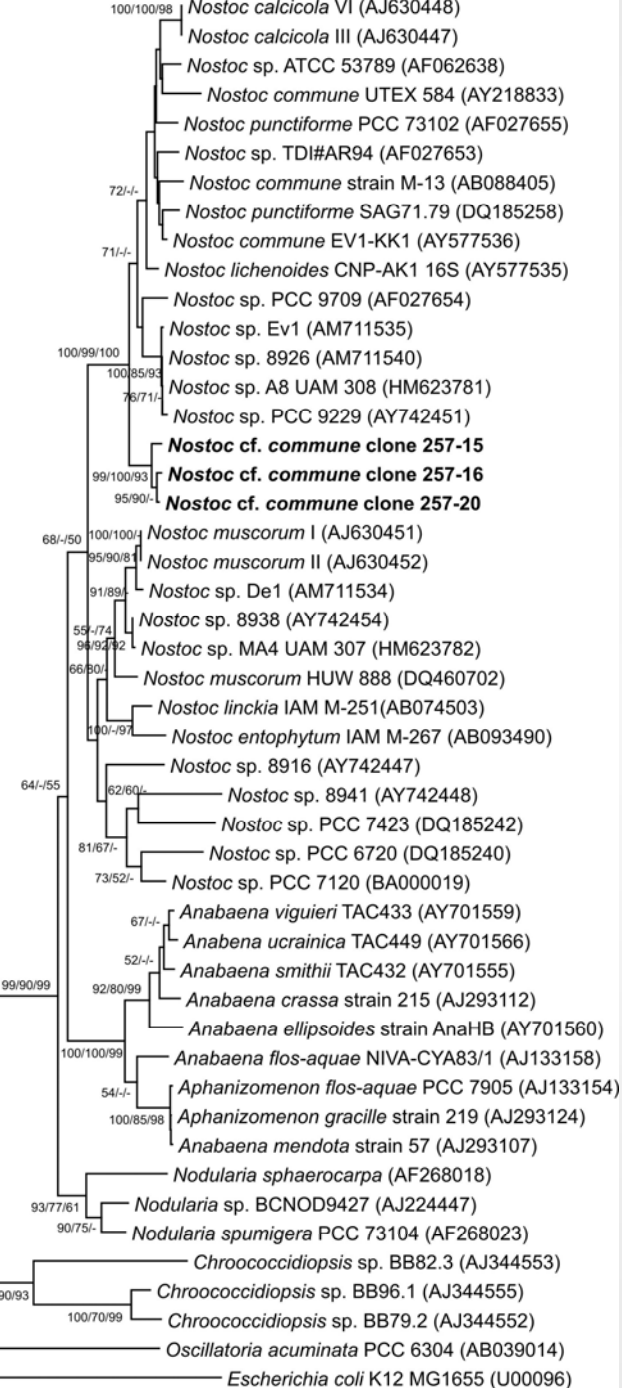
14

15



Nostoc cf. commune

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>Nostoc</i> sp. A8 UAM 308																	
2. <i>Nostoc punctiforme</i> SAG71.79	98.0																
3. <i>Nostoc calcicola</i> VI	98.3	98.3															
4. <i>Nostoc calcicola</i> III	98.3	98.5	100														
5. <i>Nostoc</i> sp. ATCC53789	97.3	98.5	98.8	98.8													
6. <i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	98.1	98.7	98.7	98.7	98.8												
7. <i>Nostoc</i> sp. PCC9709	98.7	97.7	98.2	98.2	97.1	98.0											
8. <i>Nostoc</i> sp. TDI#AR94	98.1	98.7	98.5	98.5	98.4	98.6	98.3										
9. <i>Nostoc</i> sp. 8926	100.0	98.0	98.4	98.4	97.3	98.1	98.7	98.1									
10. <i>Nostoc</i> sp. PCC9229	99.9	97.8	98.2	98.2	97.1	97.9	98.5	97.9	99.9								
11. <i>Nostoc</i> sp. Ev1	99.9	98.0	98.4	98.4	97.2	98.0	98.6	98.0	99.9	99.8							
12. <i>Nostoc commune</i> UTEX584	96.6	98.3	98.1	98.1	98.3	97.5	96.9	97.6	96.6	96.4	96.6						
13. <i>Nostoc commune</i> strain M-13	97.4	98.6	98.3	98.3	98.7	98.2	97.5	98.5	97.4	97.3	97.4	98.1					
14. <i>Nostoc cf. commune</i> clone 257-15	98.2	96.8	97.3	97.3	96.9	97.3	97.6	96.9	98.2	98.1	98.2	96.5	97.4				
15. <i>Nostoc cf. commune</i> clone 257-16	98.3	97.0	97.5	97.5	97.0	97.3	97.8	97.1	98.3	98.1	98.4	96.6	97.4	99.4			
16. <i>Nostoc cf. commune</i> clone 257-20	98.3	97.1	97.6	97.6	97.1	97.4	97.9	97.2	98.4	98.2	98.4	96.6	97.5	99.5	99.5		
17. <i>Nostoc commune</i> EV1-KK1	99.0	99.4	98.4	98.4	98.7	99.1	98.7	99.2	99.0	98.8	98.6	98.3	99.1	98.7	98.3	98.4	
18. <i>Nostoc lichenoides</i> CNP-AK1	98.7	98.6	98.6	98.6	98.4	98.7	98.1	98.7	98.7	98.6	98.6	97.9	98.9	98.7	98.3	98.4	98.3



A polyphasic approach for identifying *Nostoc cf. commune* (*Nostocales*, *Nostocaceae*) growing on Mayan monuments, a paradigm of survival.

M. Ramírez, M. Hernández-Maríné and M. Roldán

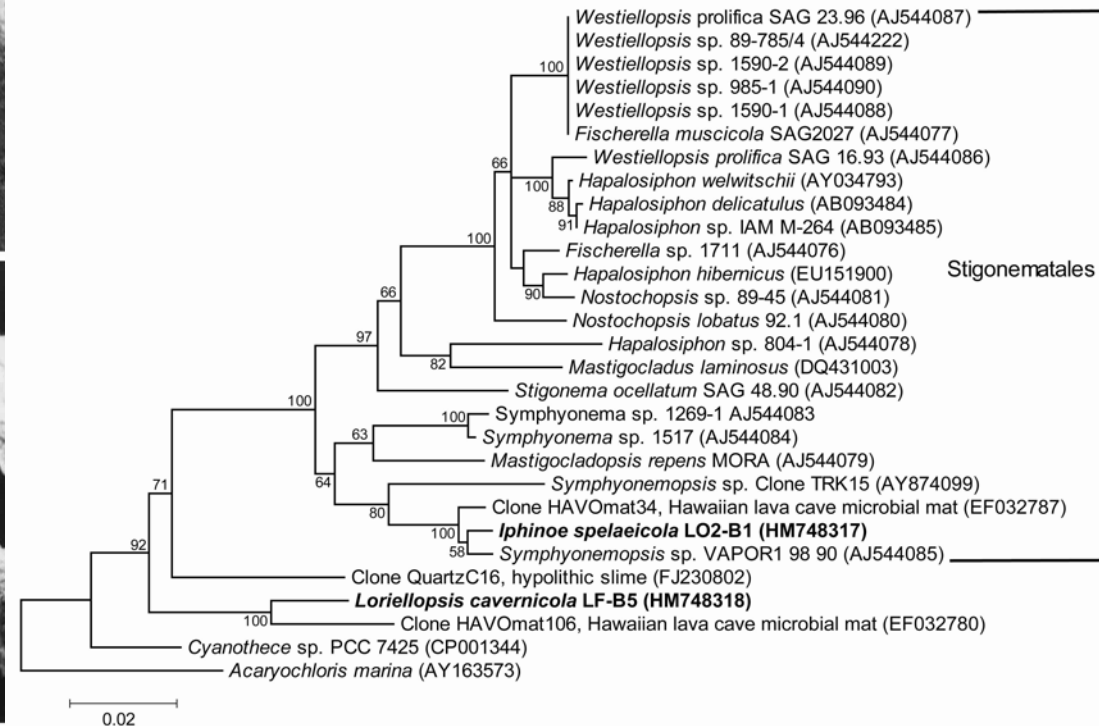
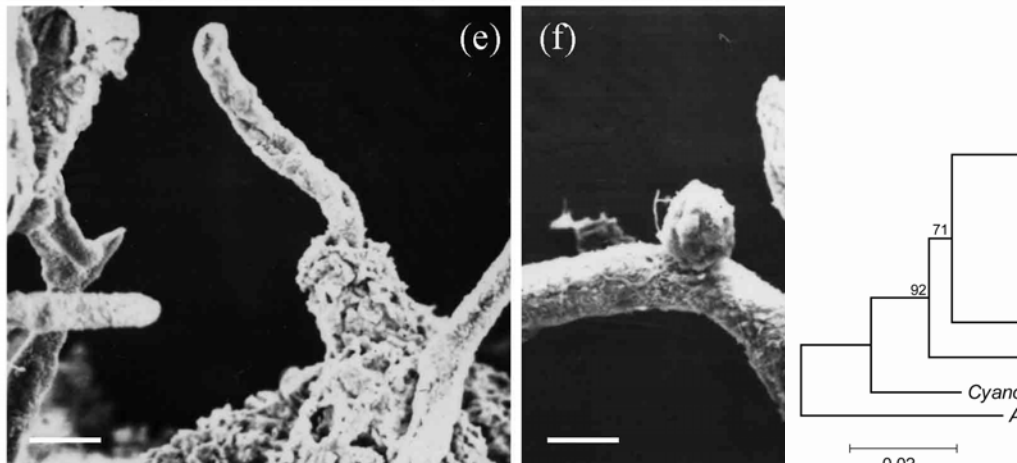
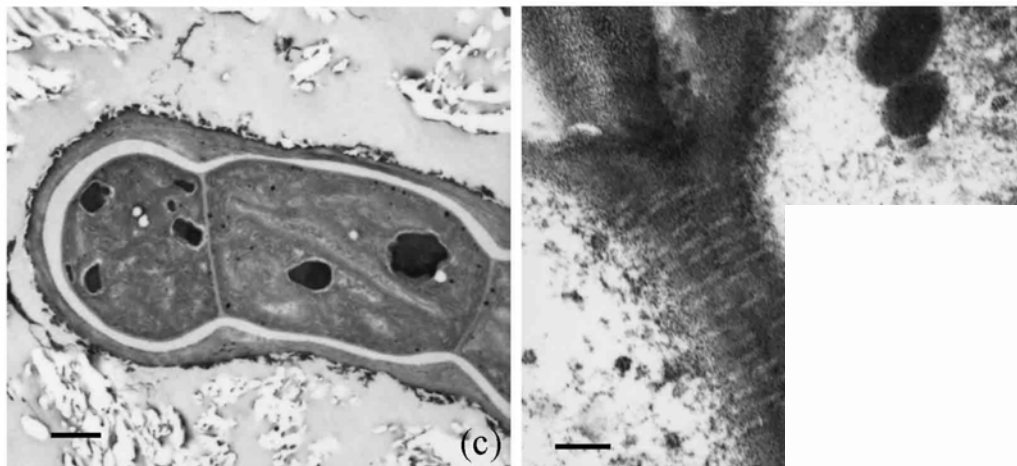
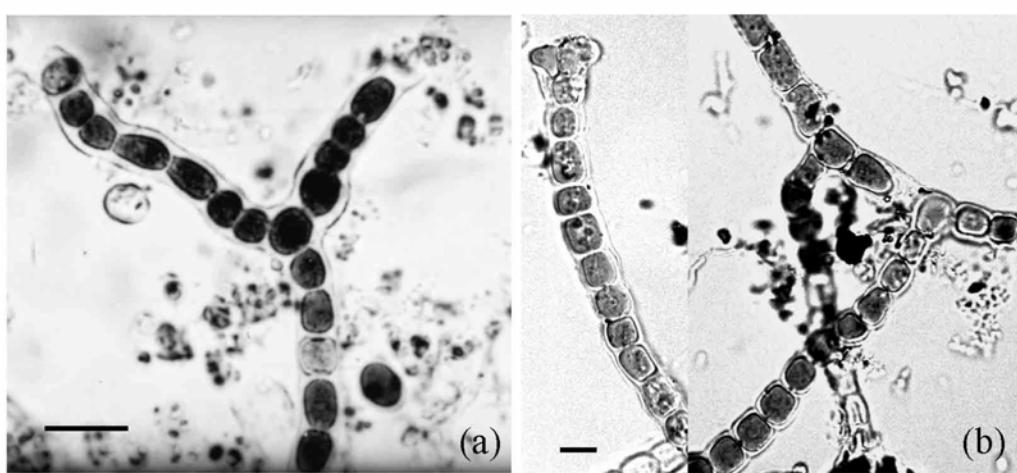
Fottea 2011

0.02

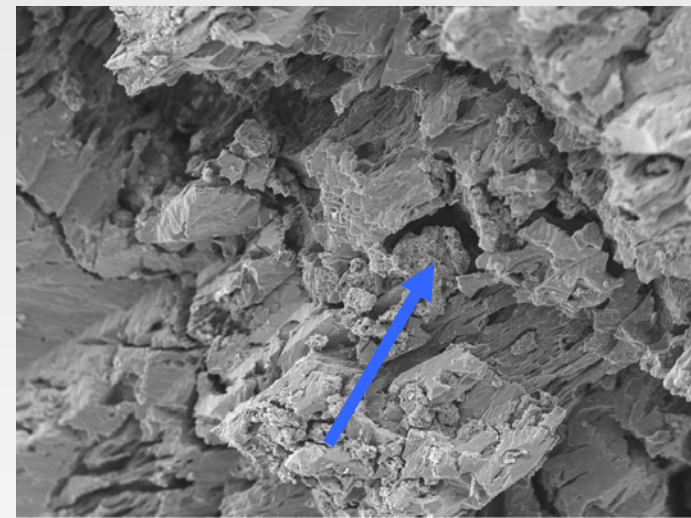
Exemples de identificació i processat d'organismes

Two new stigonematalean cyanobacteria: *Iphinoe spelaicola* gen. nov., sp. nov. and *Loriellopsis cavernicola* gen. nov., sp. nov. from Greek and Spanish caves. Morphology and Molecular Evaluation.

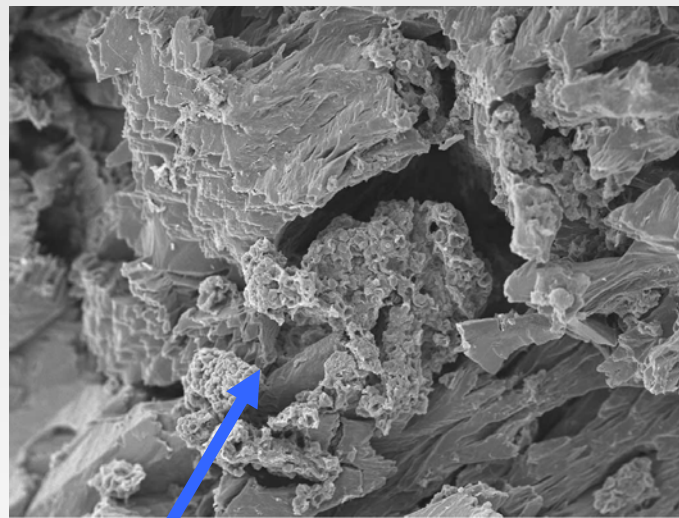
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2011



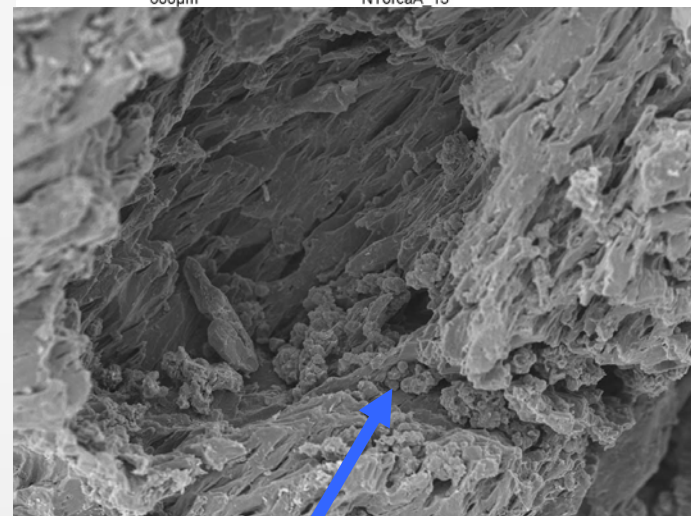
Les fotos de SEM són de trossos intactes. Es veuen els organismes, una mica col·lapsats, a l'interior de les esquerdes o forats.



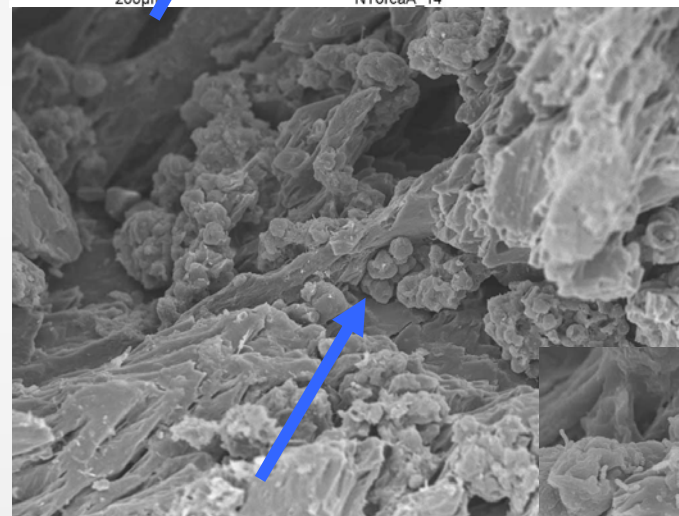
NTorcaA_13



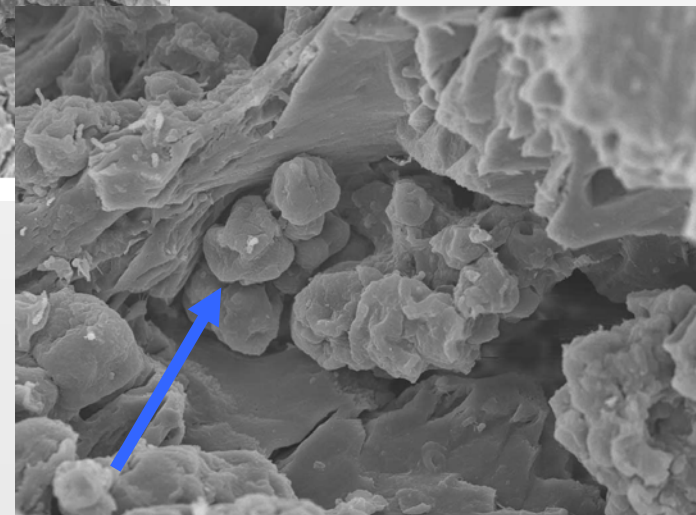
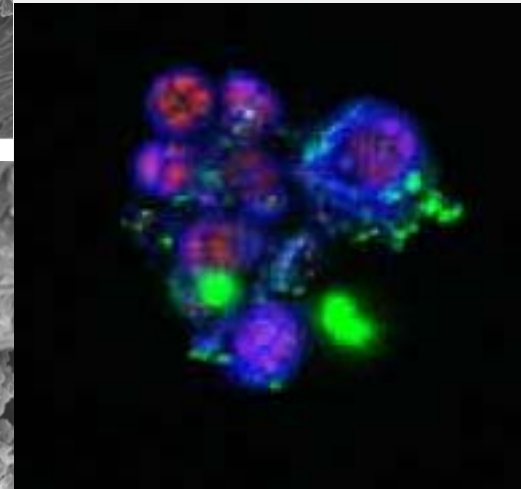
NTorcaA_14



NTorcaA_08



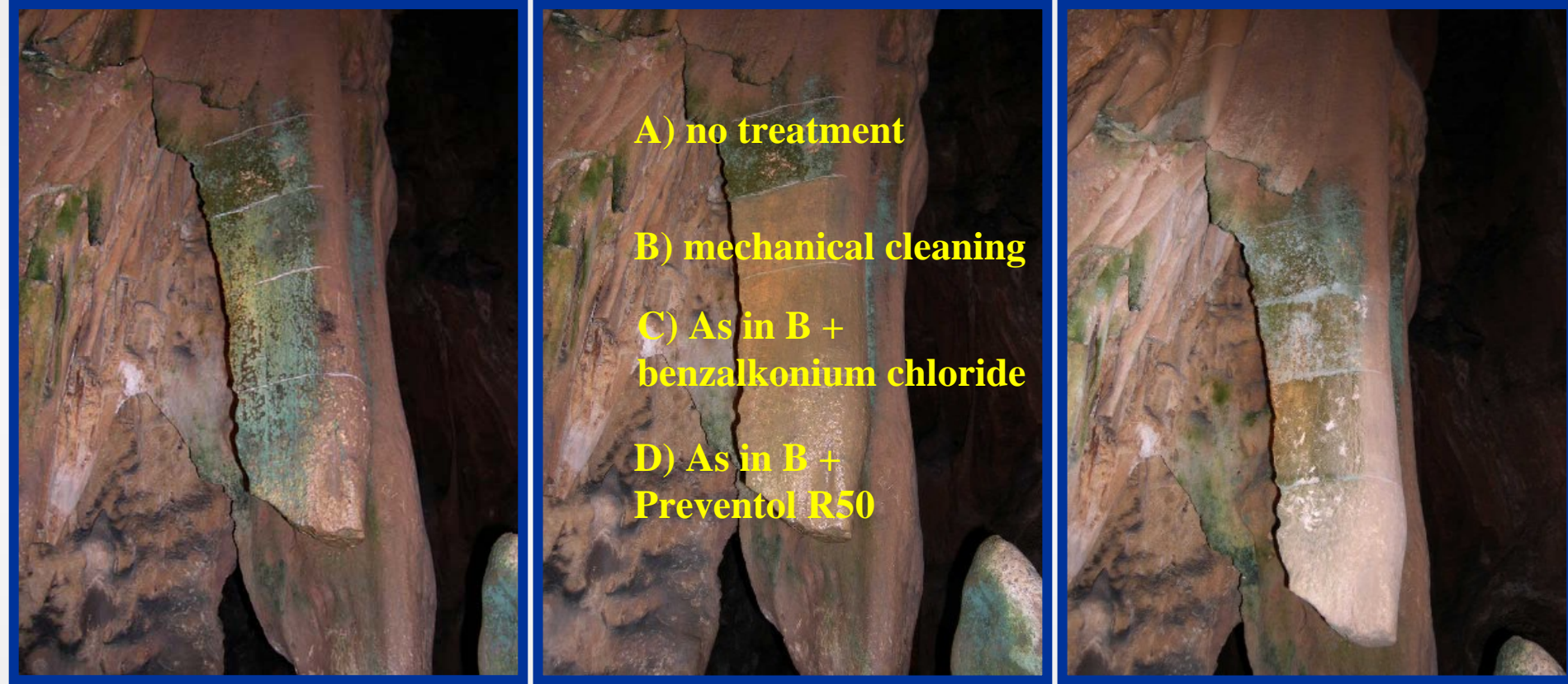
NTorcaA_09



NTorcaA_10

L'anàlisi combinat de SEM i CLSM ens mostra la presència i distribució d'organismes dintre del substrat. La combinació amb microscòpia i cultius ens permet identificar els organismes i relacionar-ho amb la bibliografia. *Chroococciopsis* spp. es considerat un dels colonitzadors de monuments mes danyós, per la seva penetració i resiliència.

Touristic caves: Collbató Cave

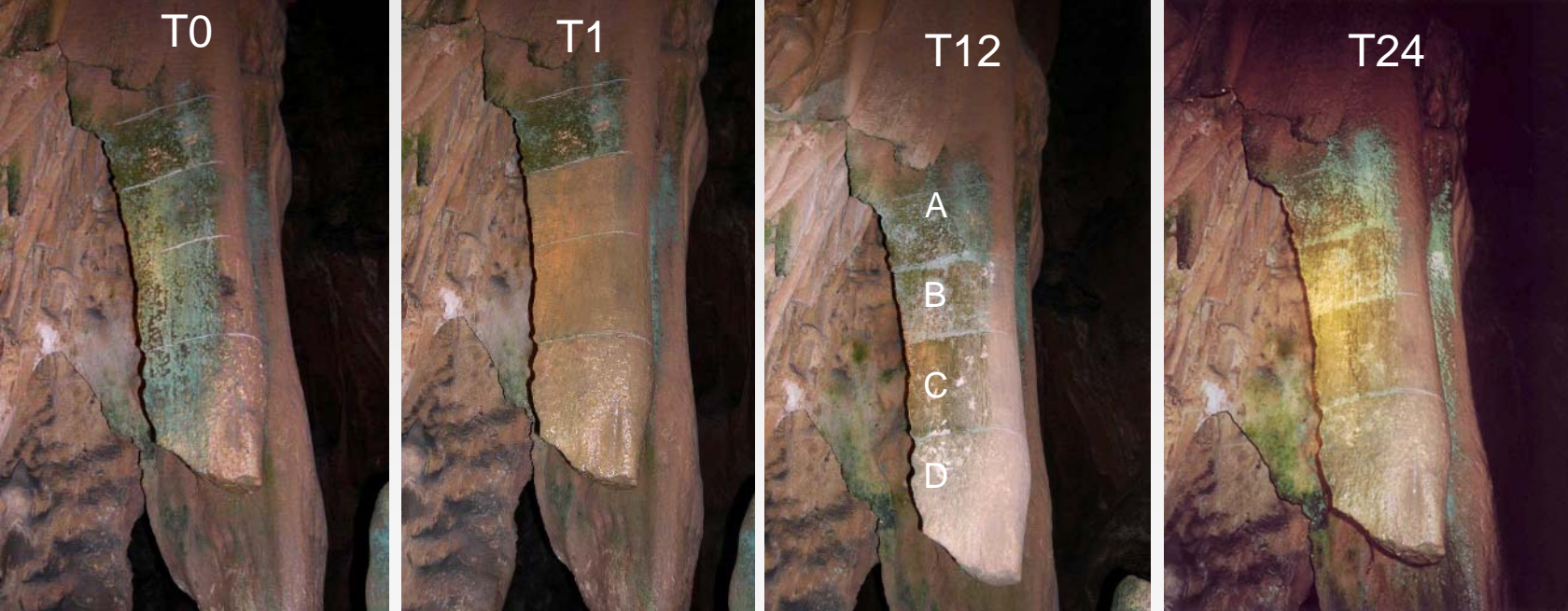


Before treatment

Time 0

12 months

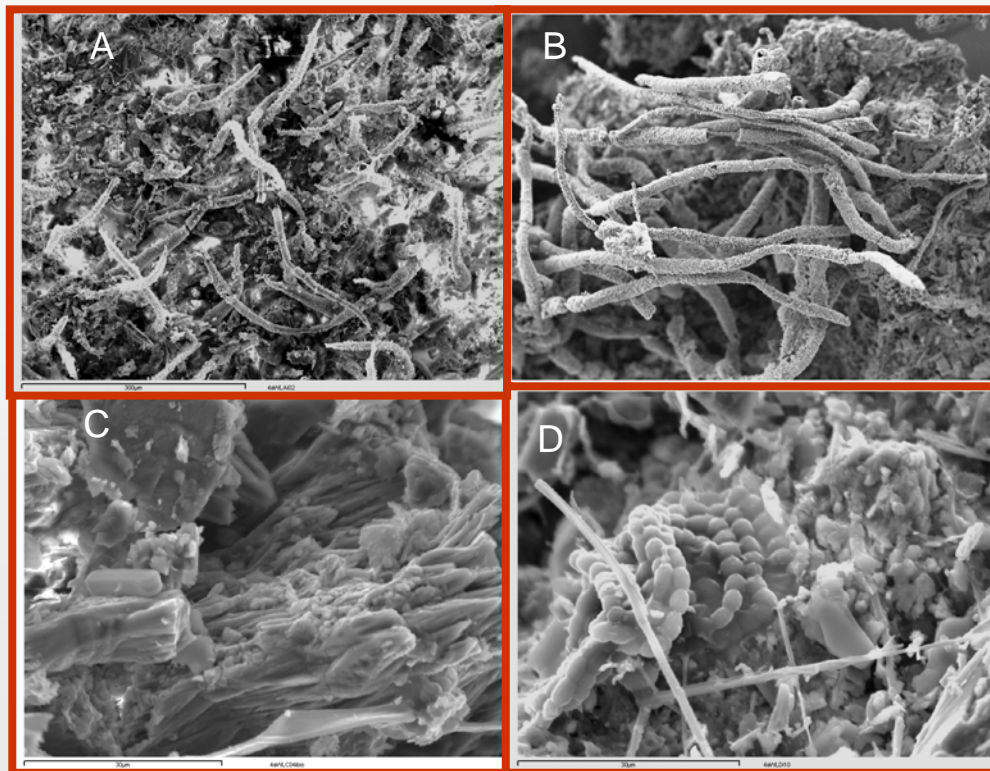
4a WL



4a
WL

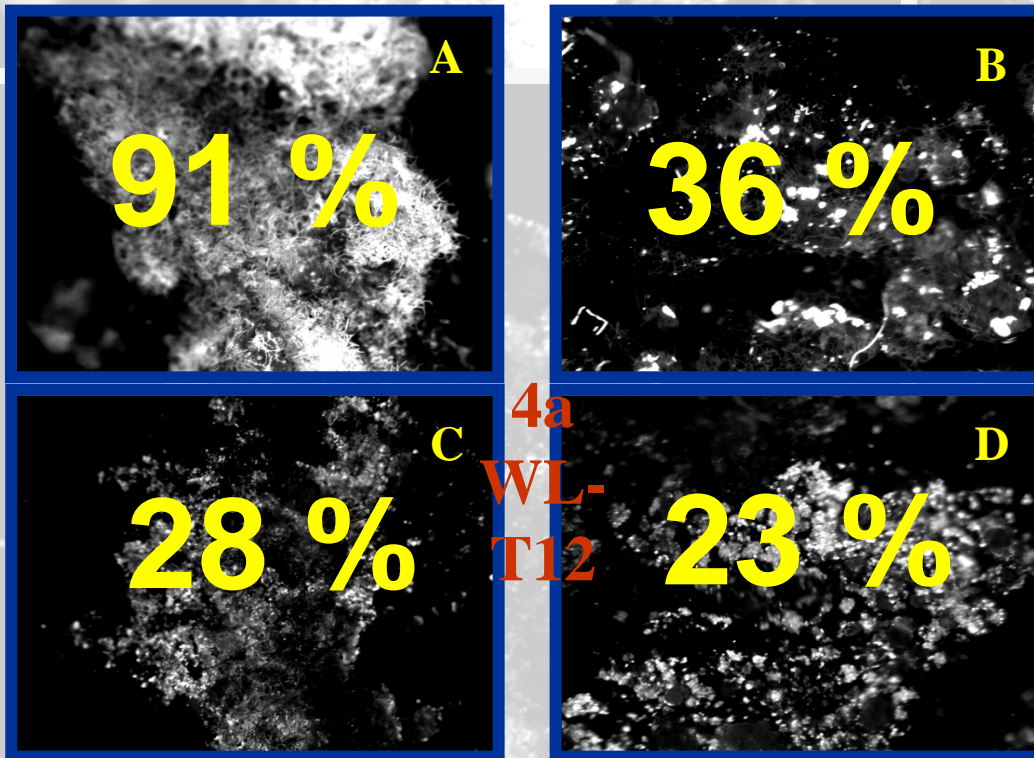
A
B
C
D

Response of particular biofilms to biocide action is unpredictable. Activity, spatial distribution and interactions can only be studied *in situ*. Since different species show different effective levels, common methods of evaluation in laboratory have disadvantages and the model needs to be tested for each particular case.



IMAT software (Unitat d'Anàlisi d'Imatges SCTUB) was used to measure fluorescence pixel by pixel.

Data sets were exported into Microsoft Excel for analysis. For each image the percentage of fluorescent area (grey pixels in between 70 and 255) in respect to the total area was calculated. Several images for each of the sites and treatments were processed and the media obtained. Differences among fluorescent areas are used for comparison, to understand the effect of biocides.



The biocide treatments should consider resilience, community replacement, and the preventive effect of EPS

*when biofilm-forming microorganisms are involved


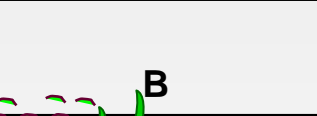
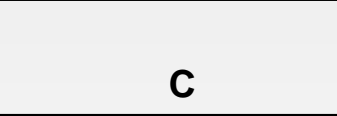




*when rising damp eliminate the biocide in field treatments

If needed, the biocides must be applied after cleaning and other methods of prevention must be applied simultaneously

+

I
R
R
A
D
I
A
N
C
E

*** Abundant ** Scarce * Present

				
4aWLA Pabelló de la Verge S: Stalactites			<i>Nostoc minutissimum</i> ** <i>Gloeocapsopsis magma</i> ** Moss protonemata *	
3bWL Confessionari S: Clay			<i>Scytonema julianum</i> ** <i>Phormidium numidicum</i> ** <i>Leptolyngbya sp.</i> ** <i>Diademsis contenta</i> ** <i>Chlorella-like</i> ** <i>Cocciobotrys verrucariae</i> ** <i>Ctenocladus circinnatus</i> **	
2aWL Sagrada Família S: Stalactites + Clay			<i>Scytonema julianum</i> ** <i>Phormidium numidicum</i> ** <i>Leptolyngbya sp.</i> ** <i>Diademsis contenta</i> ** <i>Chlorella-like</i> ** <i>Cocciobotrys verrucariae</i> ** <i>Ctenocladus circinnatus</i> **	

BIOCIDE RESISTANCE

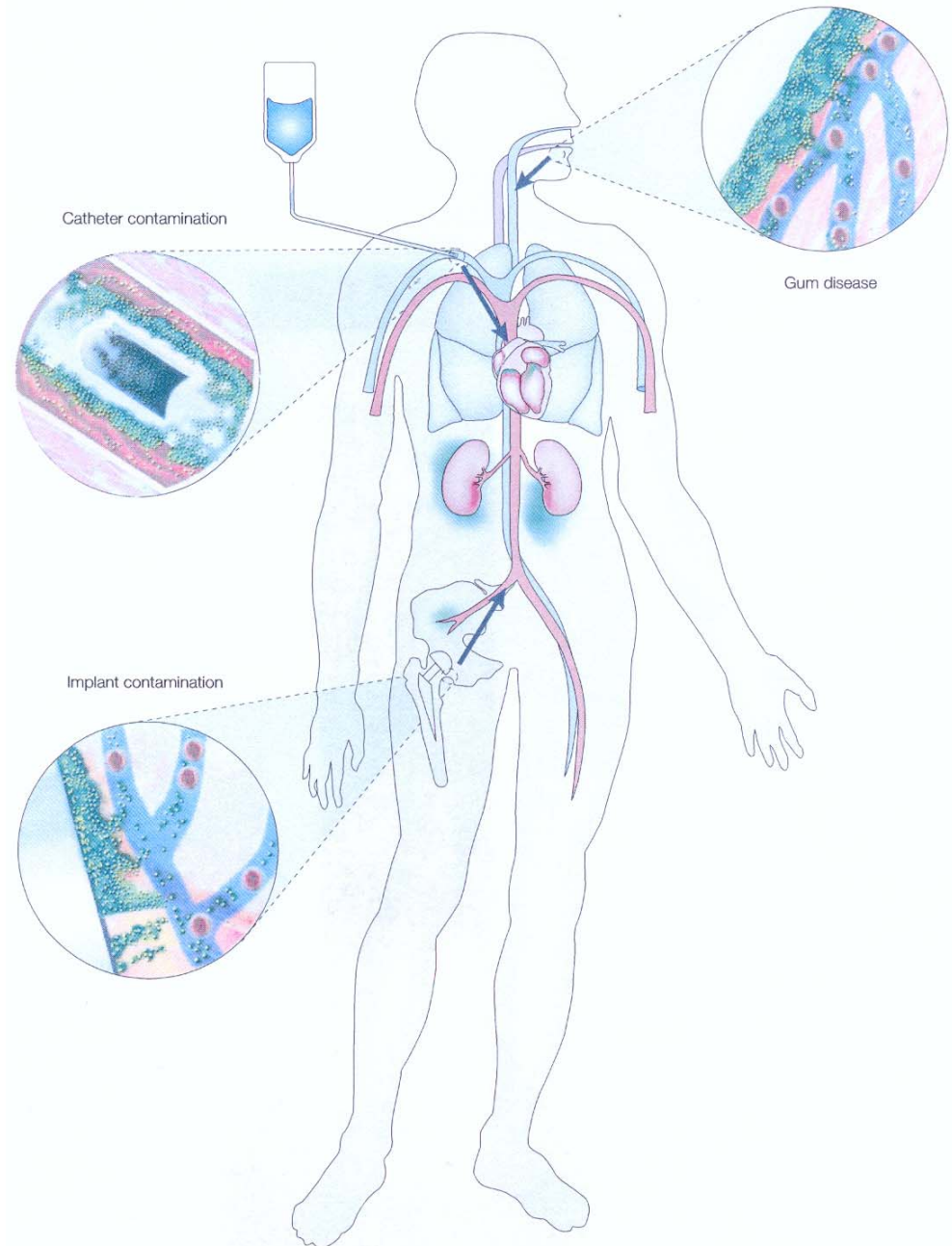
+

Biofilms en medicina

Esquema que mostra tres exemples de possibles punts d'entrada al cos de biofilms infecciosos; catèter, reemplaçament de maluc, i malaltia periodontal. El biofilm (verd) pot ser disseminat per tot el cos, ja sigui per cèl·lules individuals o grups.

En qualsevol plàstic o metall susceptible de ser colonitzat per bacteris pot créixer un biofilm molt ràpidament i poden passar al sèrum. Així, en el catèter urinari, les possibilitats de formació del biofilm i la infecció són prop de 10% per cada dia que el catèter està en el seu lloc. El pacient, al cap de 10 dies té un 100% de probabilitat de contraure una infecció.

Els biofilms tenen un paper molt important en la patogènesis de moltes infeccions cròniques. Les més conegudes són la fibrosi quística i les relacionades amb els catèters. Es treballa en el desenvolupament de terapèutiques noves per al tractament de les infeccions que produeixen els organismes que s'agrupen formant biofilms. Alguns agents que poden tenir utilitat clínica són els enzims de degradació de la matriu mucilaginosa, els surfactants, i el bloqueig de senyals de quòrum.



Per saber-ne més

http://en.wikipedia.org/wiki/Quorum_sensing

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Els biofilms formats per bacteris, lliures o patògens tenen pautes comuns de creixement i dispersió i també tècniques d'estudi comunes.

La detecció de quòrum és un tipus de procés de presa de decisions dels grups descentralitzats per coordinar les seves activitats. Moltes espècies de bacteris utilitzen la detecció de quòrum per coordinar la seva expressió gènica d'acord a la densitat local de la seva població.

Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008. 322: 85-105. Review

Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C, Mocheccchegiani F, Saba V, Scalise G. 2007. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms infection by the quorum inhibitor RIP. *Antimicrob agents Chemother*. 51: 2226-9

Chen L, Wen YM. 2011. The role of bacterial biofilm in persistence infections and control strategies. *Int J Oral Sci*3: 66-73. Review

*Costerton JW, Stewart PS, Grenberg EP. 1999. Bacterial biofilms:a common cause of persistent infections. *Science* May 21; 284 (5418): 1318-22.

Irie Y, Parsek MR. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 322: 67-84. Review

*Kaplan JB. 2010. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J Dent Res* 89(3):205-218. Review

Ramírez, M., Hernández-Mariné, M., Novelo, E. and Roldán, M. 2010. Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico, *Biofouling*, 26: 4, 399 -409.

Moltes gràcies!

