

## QUORUM SENSING (QS)

sistema di regolazione trascrizionale globale (regolazione espressione genica) basato sulle fluttuazioni della densità della popolazione microbica.

I microrganismi (batteri, alghe, funghi) che fanno ricorso al QS sintetizzano e rilasciano **molecole segnale (autoinduttori)** le cui concentrazioni aumentano all'aumentare della densità cellulare.

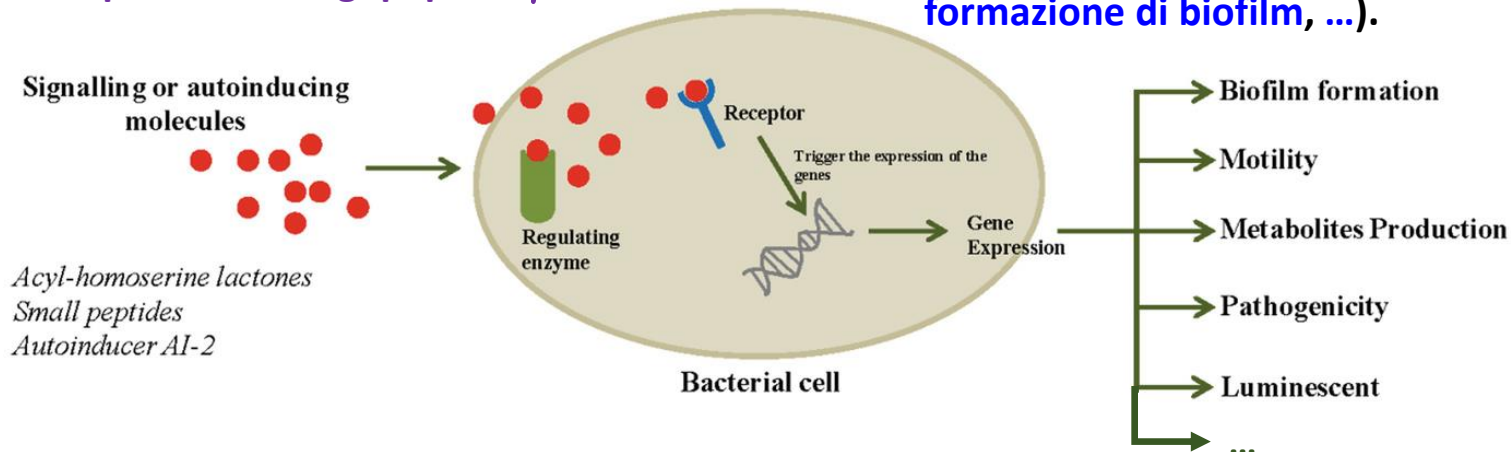
Il rilevamento della concentrazione dell'autoinduttore, oltre una determinata soglia, porta ad una modulazione dell'espressione genica.

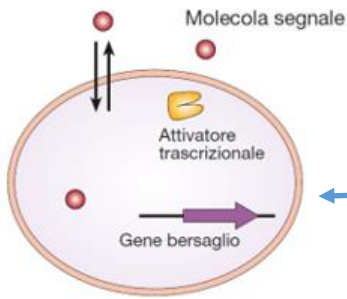
Il QS rappresenta una forma di comunicazione intercellulare basato sulla produzione di **autoinduttori**:

Gram-negativi → acil-omoserina lattone, autoinduttore 2 (AI-2)

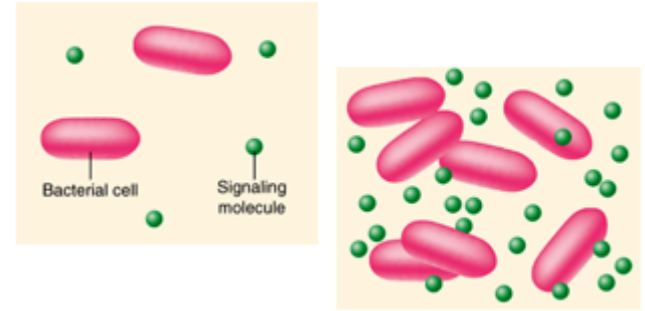
Gram-positivi → oligopeptidi,  $\gamma$ -butirrolattoni

Mediante questo sistema di comunicazione i microrganismi regolano numerose attività fisiologiche (**simbiosi, virulenza, autolisi, competenza, coniugazione, produzione di antibiotici, motilità, sporulazione, formazione di biofilm, ...**).

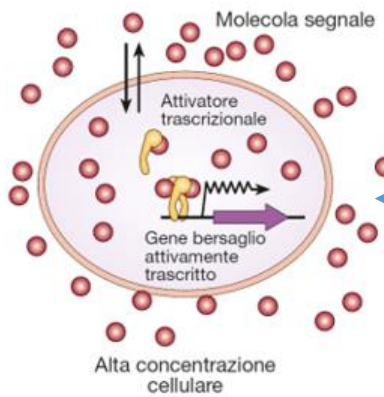




A bassa densità cellulare l'autoinduttore viene sintetizzato in modo costitutivo (costante, ma a bassi livelli). L'autoinduttore sintetizzato attraversa liberamente le membrane e diffonde nell'ambiente circostante.



Bassa concentrazione cellulare

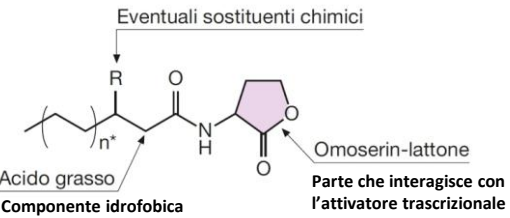


All'aumentare della popolazione cellulare, segue contemporaneamente un aumento della concentrazione extracellulare dell'**AUTOINDUTTORE**.

Quando l'autoinduttore, diffondendo nelle cellule in quantità sufficientemente alta, si lega all'**ATTIVATORE TRASCRIZIONALE** specifico ne induce una variazione conformazionale.



Il **complesso attivatore trascrizionale-autoinduttore**, legandosi ad un **promotore specifico sul DNA**, attiva la trascrizione dei geni quorum sensing-dipendenti.



$n^*$  = tipicamente da 4 a 16 atomi di carbonio

Struttura degli acil-omoserina lattoni (autoinduttori utilizzati dai Gram negativi)

Gli autoinduttori sono, di solito, **specifici delle specie** che li ha prodotti (**autoinduttori specie-specifici**), tuttavia, alcuni possono essere riconosciuti anche da specie diverse (**autoinduttori ad ampio spettro d'azione**).

La capacità di comunicare tra loro consente ai microrganismi di **coordinare l'espressione genica** e, quindi, il comportamento dell'intera popolazione.

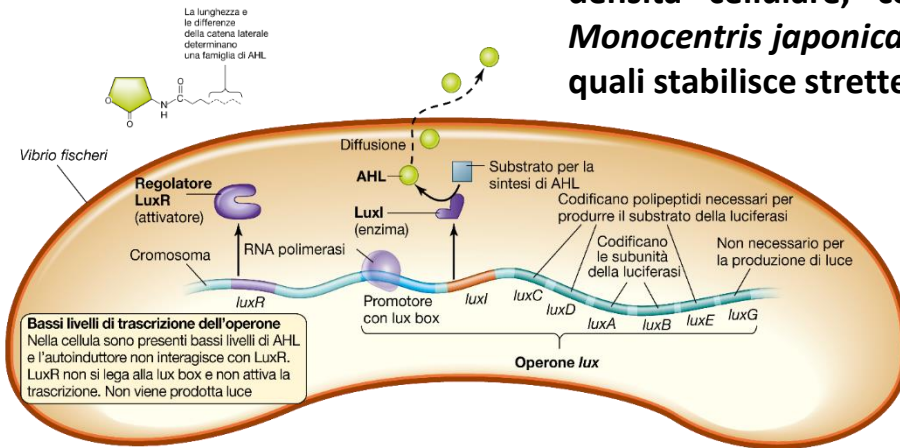


Presumibilmente, questo processo conferisce ai microrganismi alcune delle proprietà degli organismi superiori: l'evoluzione del QS potrebbe essere stata una delle prime fasi di sviluppo verso la pluricellularità.

Il QS è stato descritto per la prima volta negli anni '60/'70 nel batterio marino **bioluminescente** *Vibrio fischeri* (Gram -).



*V. fischeri*, attraverso l'attività di "autoinduzione" basata sulla densità cellulare, controlla la **bioluminescenza** nel pesce *Monocentris japonica* e nel calamaro *Euprymna scolopes*, con i quali stabilisce strette **associazioni simbiotiche**.

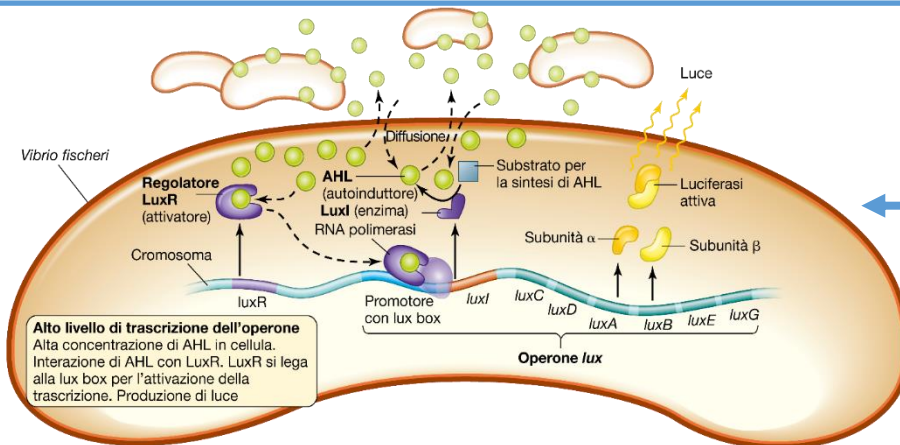


Quando i batteri sono in numero limitato la produzione di autoinduttore (AHL), da parte di **LuxI**, è bassa.



non viene attivata la sintesi dei prodotti genici coinvolti nell'emissione di bioluminescenza.

A. Bassa densità di popolazione; bassa concentrazione di AHL



Solo quando la densità batterica aumenta la concentrazione di **acil-omoserina lattone**, raggiunto un valore soglia, si lega ad una proteina regolatrice specifica (**LuxR**).



Il **complesso proteina regolatrice-autoinduttore (LuxR-AHL)**, legandosi ad un promotore specifico sul DNA, attiva la **trascrizione dei geni** sotto il suo controllo.

B. Elevata densità di popolazione; elevata concentrazione di AHL

Wessner, Dupont, Charles – Microbiologia – 2015 CEA



A. Colonie luminose di *V. fischeri*

Alcuni ceppi di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) e Shiga-tossina (STEC) sono patogeni enterici.



Producono una potente **tossina** responsabile di gravi forme morbose nell'uomo.

Esistono numerosi **sierotipi VTEC**, individuati attraverso gli antigeni somatico O e flagellare H.

Sebbene si conoscano oltre 100 sierotipi VTEC, solo alcuni sono stati associati a patologie gravi nell'uomo.

### *E. coli* O157:H7

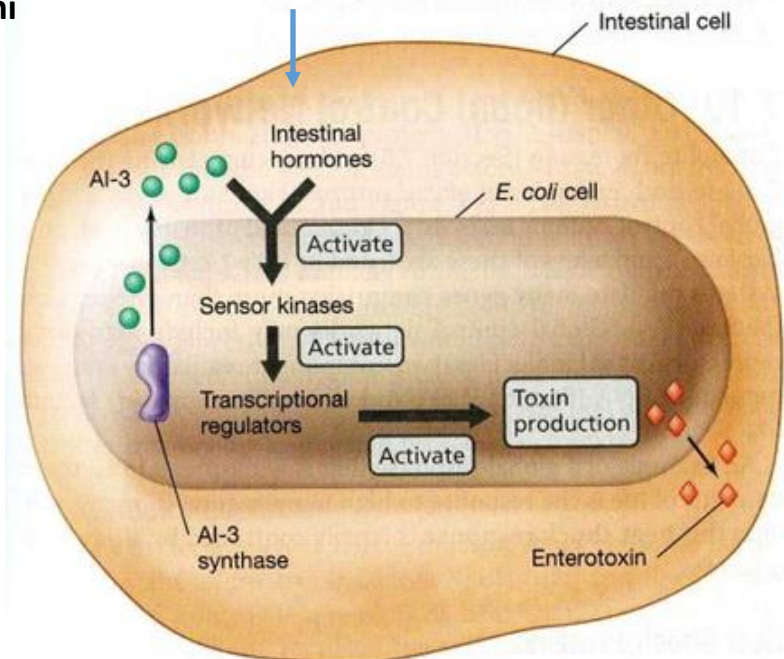
*E. coli* O157:H7 produce **AI-3** per attivare la sintesi di alcuni fattori di virulenza.

AI-3 e gli **ormoni intestinali** si legano a due diverse chinasi sensore inducendone la fosforilazione.

Le **chinasi fosforilate** si legano al **regolatore trascrizionale** che attiva la trascrizione dei geni coinvolti nella **motilità** e nella sintesi dell'**enterotossina**.

Nel corso dell'infezione le cellule intestinali producono **ormoni dello stress**:

- **adrenalina**
- **noradrenalina**



(a) Virulence factor production in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

*E. coli* O157:H7

AHL: AI-3 that induces virulence genes (motility and secretion of the enterotoxin)

QS

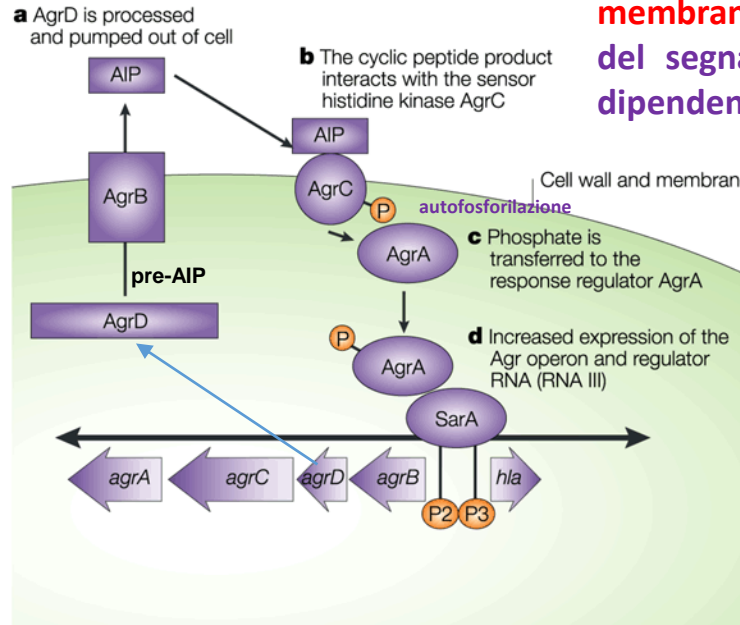
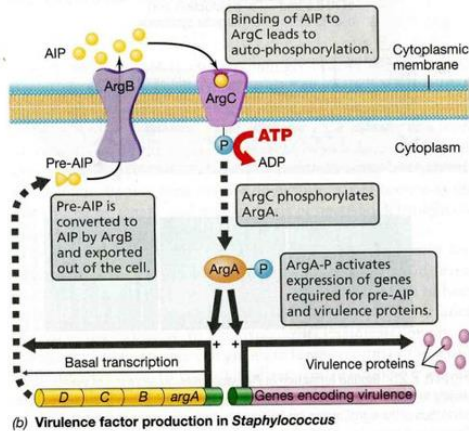
**comunicazione intercellulare**  
basato sulla produzione di  
**autoinduttori**

La comunicazione intercellulare utilizza diversi linguaggi chimici  
Gram-negativi → acil-omoserina lattoni, autoinduttore 2 (AI-2)  
Gram-positivi → oligopeptidi (feromoni),  $\gamma$ -butirrolattoni

**Il QS nei batteri Gram positivi (*Staphylococcus aureus*)**

Il gene **agrD** codifica per un polipeptide (**AgrD, pre-AIP**) che, in seguito a modificazione post-traduzionale, viene trasformato nell'**autoinduttore (AIP)** e pompato all'esterno della cellula tramite **AgrB**.

L'autoinduttore **AIP** (peptide autoinduttore) non può rientrare nella cellula, ma può interagire con specifici **recettori di membrana (AgrC)** da cui parte la trasduzione del segnale per l'attivazione dei geni QS-dipendenti.



Il legame di AIP con la **proteina sensore AgrC** induce la formazione di **AgrC-P** (autofosforilazione) che, a sua volta, trasferisce il gruppo fosfato alla **proteina regolatrice della risposta AgrA (AgrA-P)**.

Attivazione dei geni per ulteriore sintesi di **AIP** e dei **geni per le proteine di virulenza**.

AgrC ed AgrA rappresentano un sistema di regolazione a 2 componenti (TCRS).

*S. aureus*  
AIP: autoinducing peptide induces via a TCRS a range of virulence proteins (damage of host cells and interference with immune system)

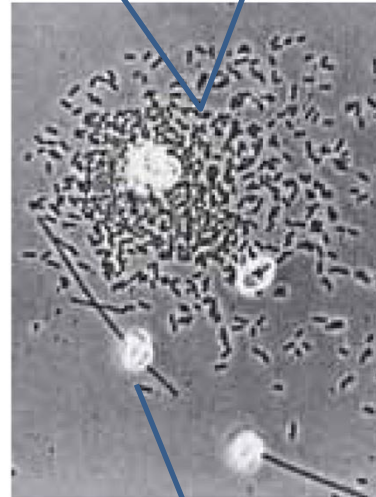
## Biofilm

Per i microrganismi le superfici costituiscono degli habitat molto importanti: in questi microambienti (biofilm) la quantità di nutrienti può essere molto più alta rispetto ad una fase liquida circostante.

Il **biofilm microbico** è costituito da **microrganismi**, concentrati ad una interfaccia (solitamente solido-liquido), immersi in una **matrice polimerica extracellulare (EPS)**.

Gli aggregati di cellule non attaccate alla superficie sono a volte chiamati "**flocs**" e presentano alcune delle caratteristiche del biofilm.

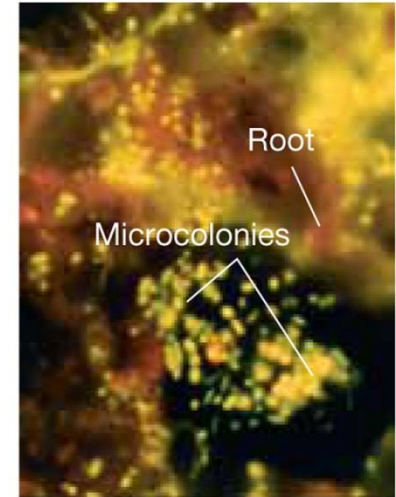
Microcolonie batteriche sviluppatesi un vetrino immerso in un corso d'acqua



T. D. Brock

(a)

minerali



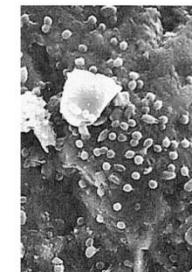
Frank Dazzo

(b)

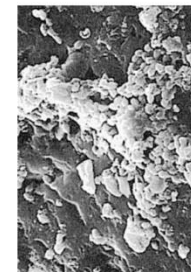
Fotomicrografia (arancio di acridina) di una comunità microbica che ha colonizzato le radici di una pianta.

La superficie colonizzata può essere viva o inerte.

Le superfici colonizzabili, soprattutto in ambienti umidi, possono essere rappresentate da una particella di sostanza organica (materiale vegetale, tessuto animale, etc.), da una particella di suolo, da una pietra, da una superficie metallica, etc.



(a)



(b)



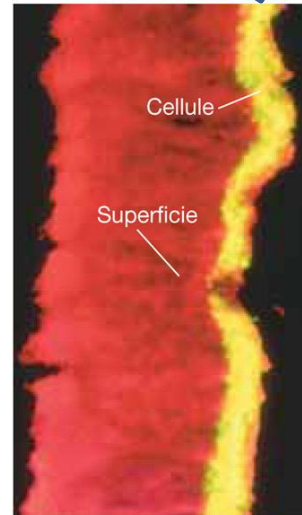
(c)

Microrganismi sulla superficie di particelle di suolo

I biofilm intrappolano i nutrienti utili per la crescita microbica e prevengono il dilavamento dalle superfici immerse in un fluido.

Il biofilm è costituito da diversi strati porosi, osservabili al CSLM (microscopio confocale a scansione laser).

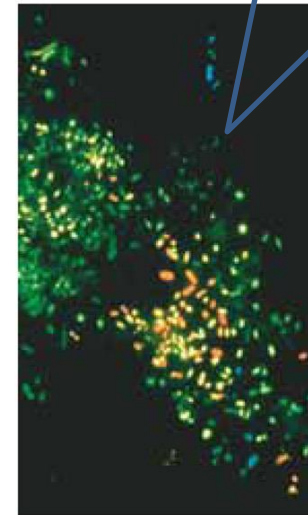
Sezione di un biofilm di *Ps. aeruginosa*



C.-T. Huang, Karen Xu, Gordon McFeters, and Philip S. Stewart

(a)

Biofilm naturale sulla superficie di una foglia. Osservazione al CSLM



Cindy E. Morris

(b)



J.M. Sánchez, J.J. deLope, and Ricardo Amils

(c)

M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, **Biologia dei Microrganismi**

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

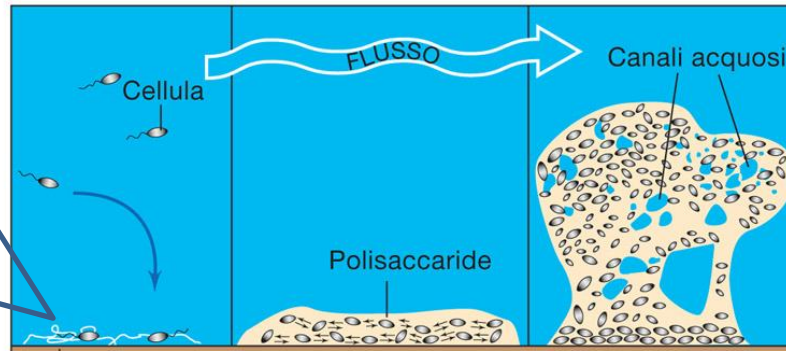
Biofilm di batteri ferro-ossidanti sulla superficie delle rocce di un fiume ricco di ferro. L'acqua passando attraverso il biofilm consente lo sviluppo di batteri che ossidano il  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$

La formazione di biofilm è un processo in cui le molecole segnale del **quorum sensing** servono ad indurre la secrezione di **EPS** che porta alla formazione di una caratteristica **architettura tridimensionale**.

**Adesione**  
(alcune cellule aderiscono a una superficie solida adatta)

**Colonizzazione**  
(comunicazione tra le cellule, crescita e formazione del polisaccaride)

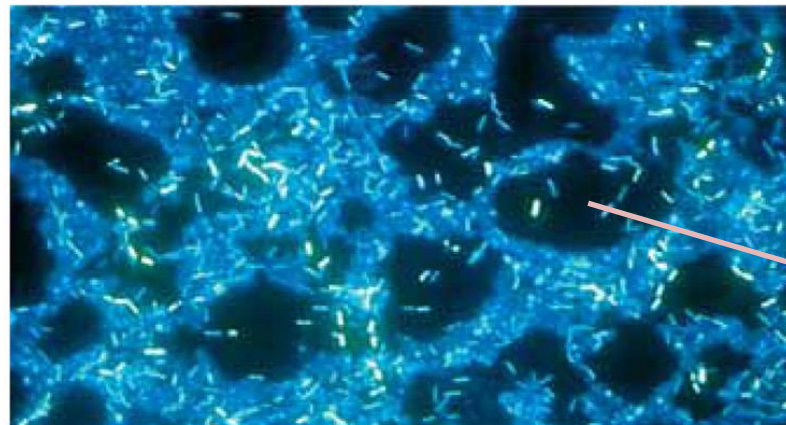
**Sviluppo**  
(crescita e produzione del polisaccaride più intensa)



Superficie  
(a)

L'**adesione** delle cellule microbiche sulla superficie costituisce il segnale per l'espressione di geni che codificano molecole coinvolte nella **comunicazione tra le cellule**.

Fotomicrografia di un biofilm, colorato con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato), sviluppatosi sulla superficie di un tubo in acciaio.



(b)

Rodney M. Donlan and Emerging Infectious Diseases

Canali  
acquosi



Alcuni batteri nell'ambito del biofilm possono andare incontro a **variazione di fase**

Una volta che la microcolonia si è sviluppata, le sue dimensioni continuano ad aumentare

Adesione batterica e formazione microcolonia

Forma planctonica

Comunità sessile

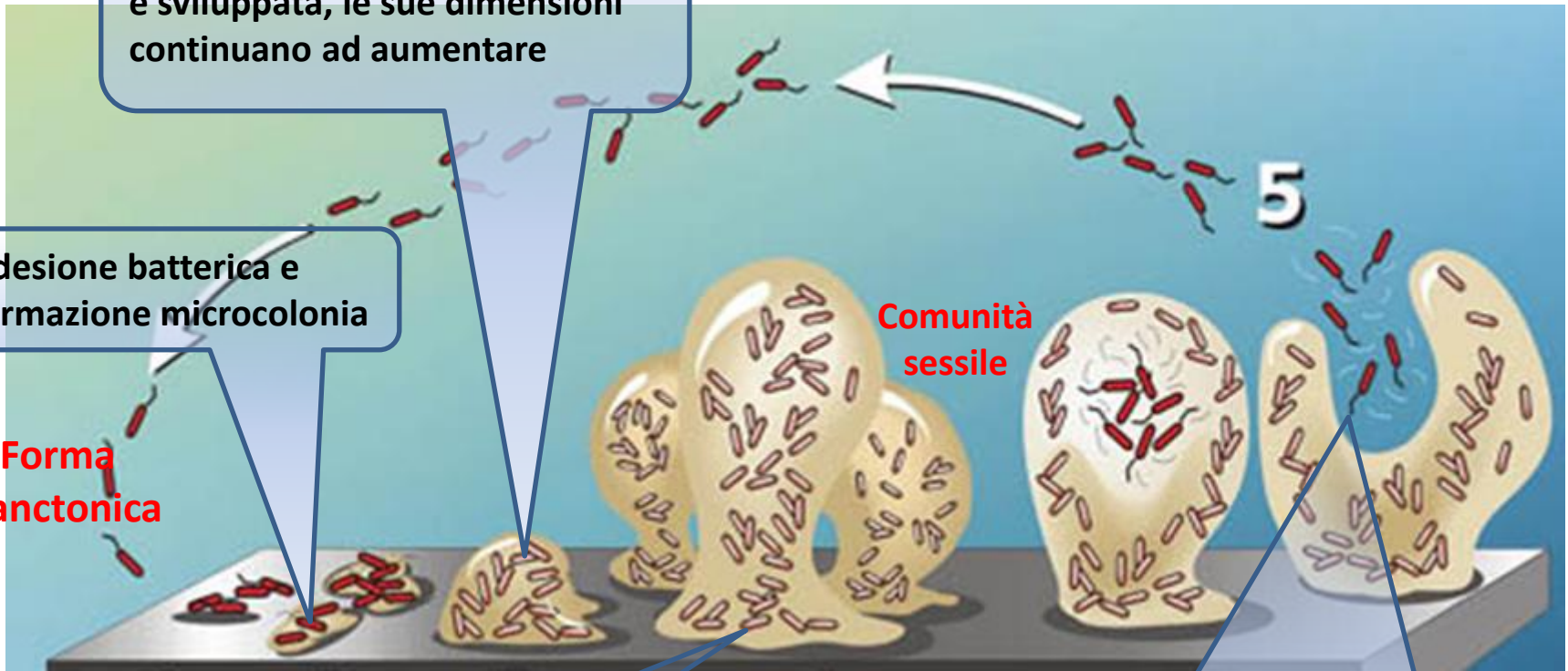
I batteri che si trovano più in prossimità della superficie colonizzata hanno difficile accesso ai nutrienti esterni.

A volte, per ragioni puramente meccaniche, alcuni batteri o pezzi di biofilm si staccano e si liberano nell'ambiente circostante.

Più spesso, alcuni batteri cessano di produrre esopolisaccaridi per "**liberarsi**" nell'ambiente.

Il fenomeno, per il quale alcuni batteri cessano di esprimere determinati geni è denominato

**variazione di fase**.



# il **biofilm** aumenta la possibilità di sopravvivenza e migliora la crescita dei microrganismi

## Conferisce resistenza

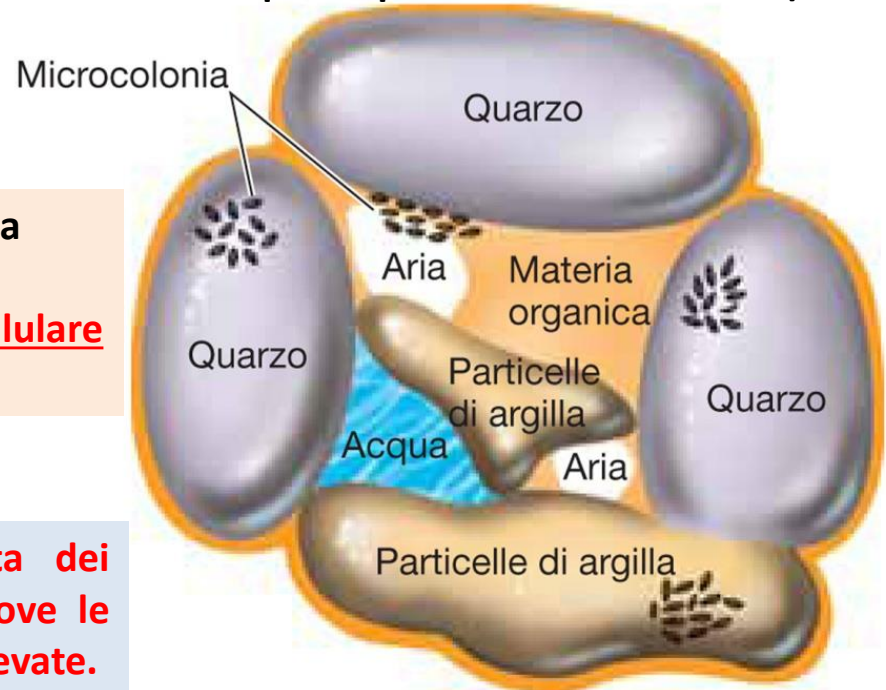
- al flusso dei fluidi (resistenza al dilavamento),
- alla fagocitosi (cellule del sistema immunitario),
- alla penetrazione di sostanze tossiche
- ...

Crea una nicchia favorevole alla sopravvivenza dei microrganismi, permettendo alle cellule di permanere in un ambiente in cui i nutrienti sono più abbondanti (tessuti animali) o vengono riforniti continuamente (roccia di un corso d'acqua, superficie di un tubo, etc.).

Il biofilm permette alle cellule di vivere in stretta associazione favorendo

- comunicazione intercellulare
- scambi genetici

**Rappresenta la tipica modalità di crescita dei microrganismi nei vari ambienti naturali, dove le concentrazioni di nutrienti non sono molto elevate.**



Perché i procarioti producono biofilm?

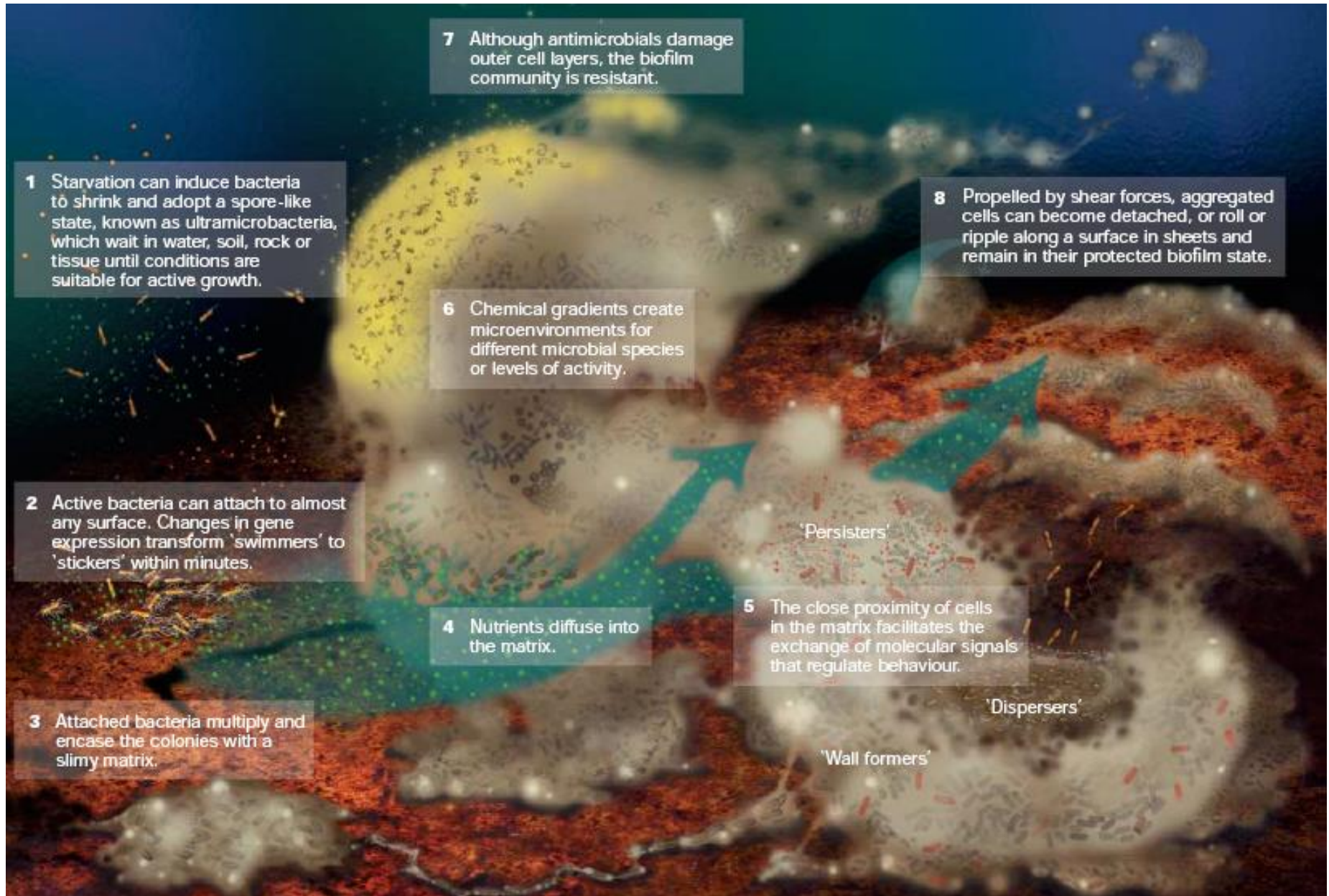
Le superfici sono spazi che possono essere colonizzati e che offrono una certa stabilità nella crescita ambientale e possono avere **funzioni catalitiche** per la presenza di cellule (esoenzimi).

Il biofilm offre **protezione verso numerosi fattori ambientali** (raggi UV, metalli tossici, acidi, disidratazione, salinità, fagocitosi, agenti antimicrobici, etc.).

Come il biofilm protegge i batteri da agenti biocidi?

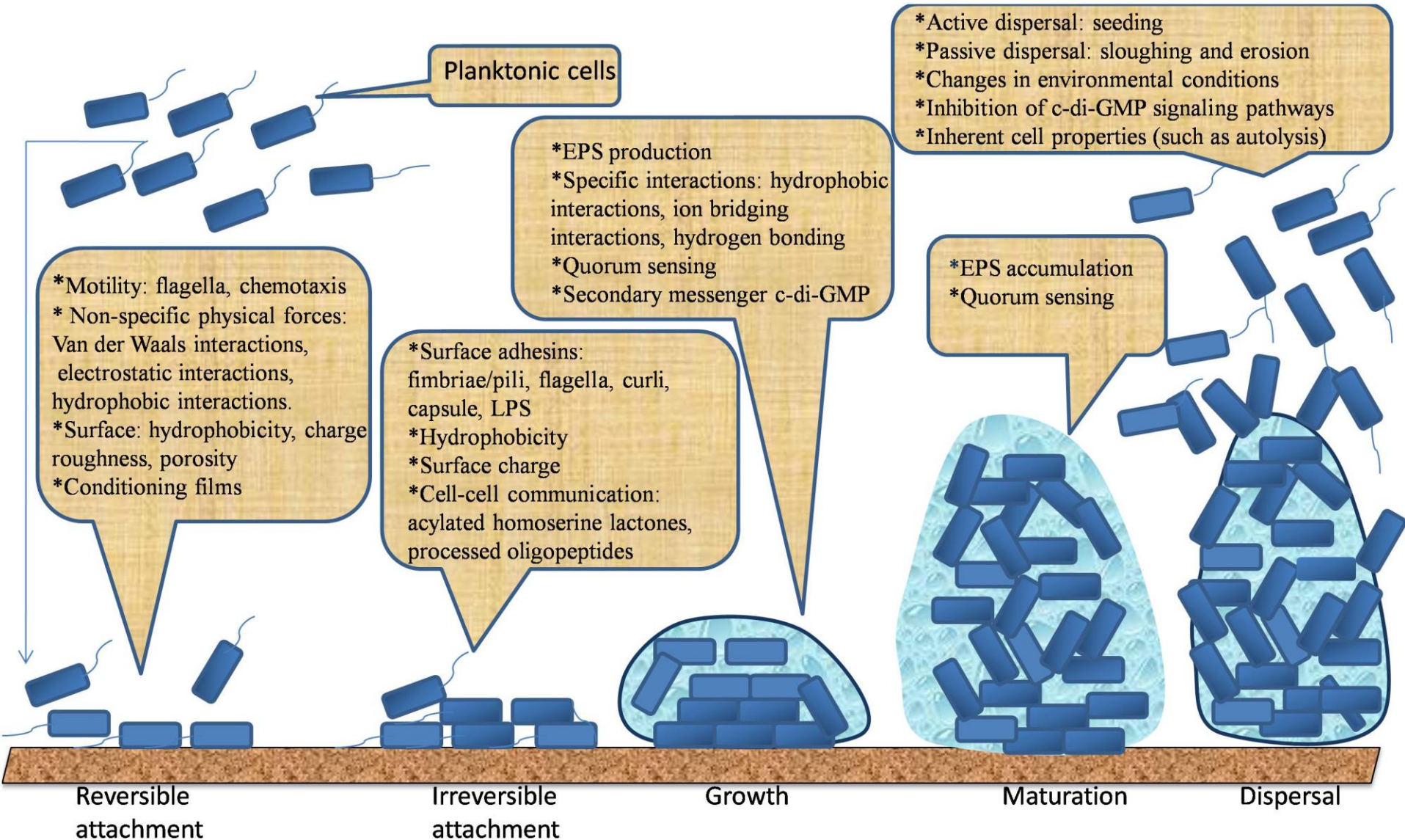
- La matrice dello *slime* esercita un effetto barriera verso agenti antimicrobici (candeggina, superossidi, metalli, immunoglobuline) che vengono neutralizzati o legati dagli EPS, fino a raggiungere una concentrazione subletale prima che essi possano raggiungere le cellule all'interno del biofilm.
- Le proprietà barriera dell'EPS (aspetto idrogel) forniscono protezione anche nei confronti dei raggi UV e della disidratazione.
- All'interno del biofilm possono essere presenti **attività enzimatiche** ( $\beta$ -lattamasi extracellulare, etc.).

Hall-Stoodley et al. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.  
Nature Reviews | Microbiology, Vol. 2.

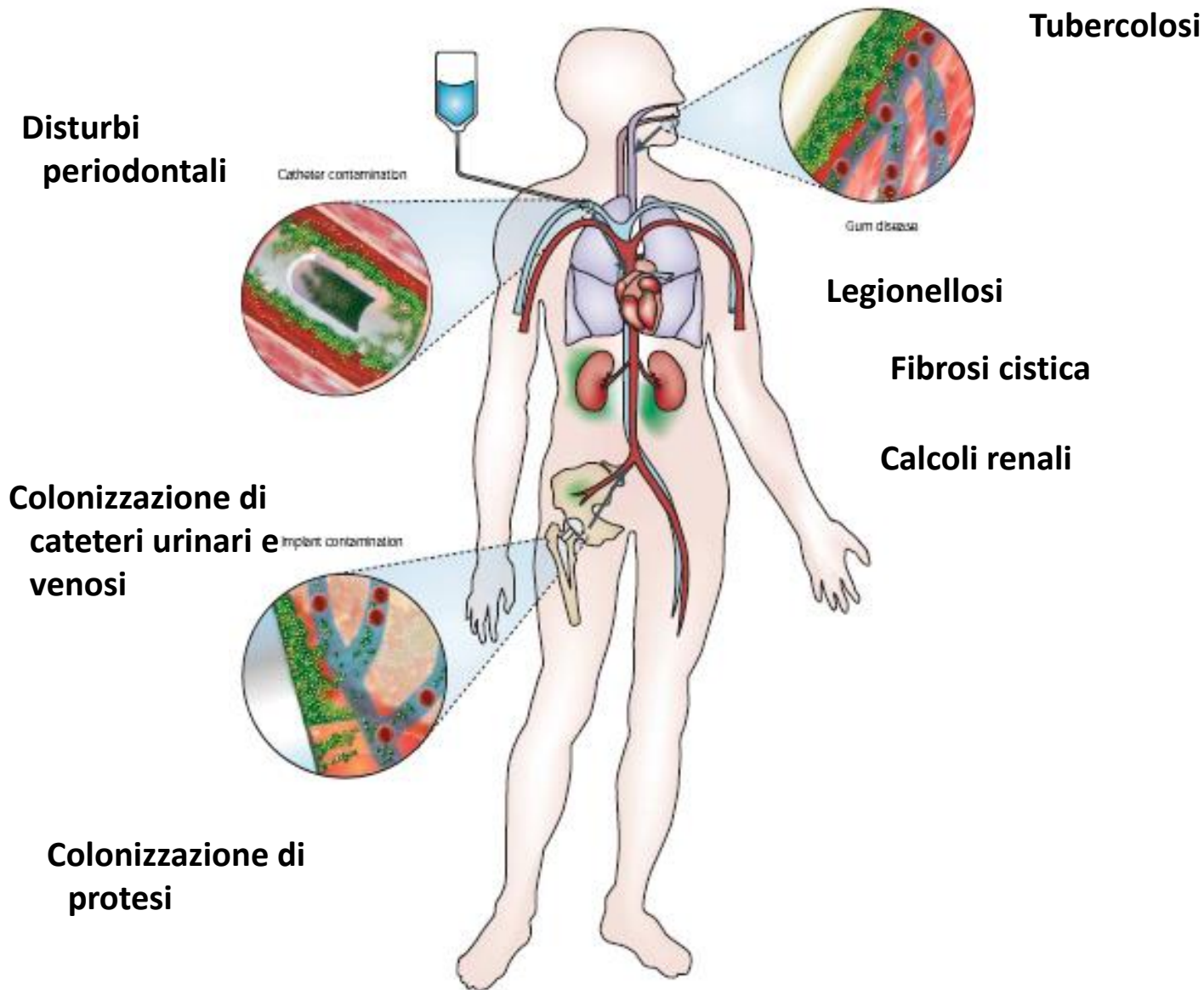


# The **five main phases** leading to the development and dispersal of biofilm.

Muhammad et al. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. Front. Microbiol. 11:928.

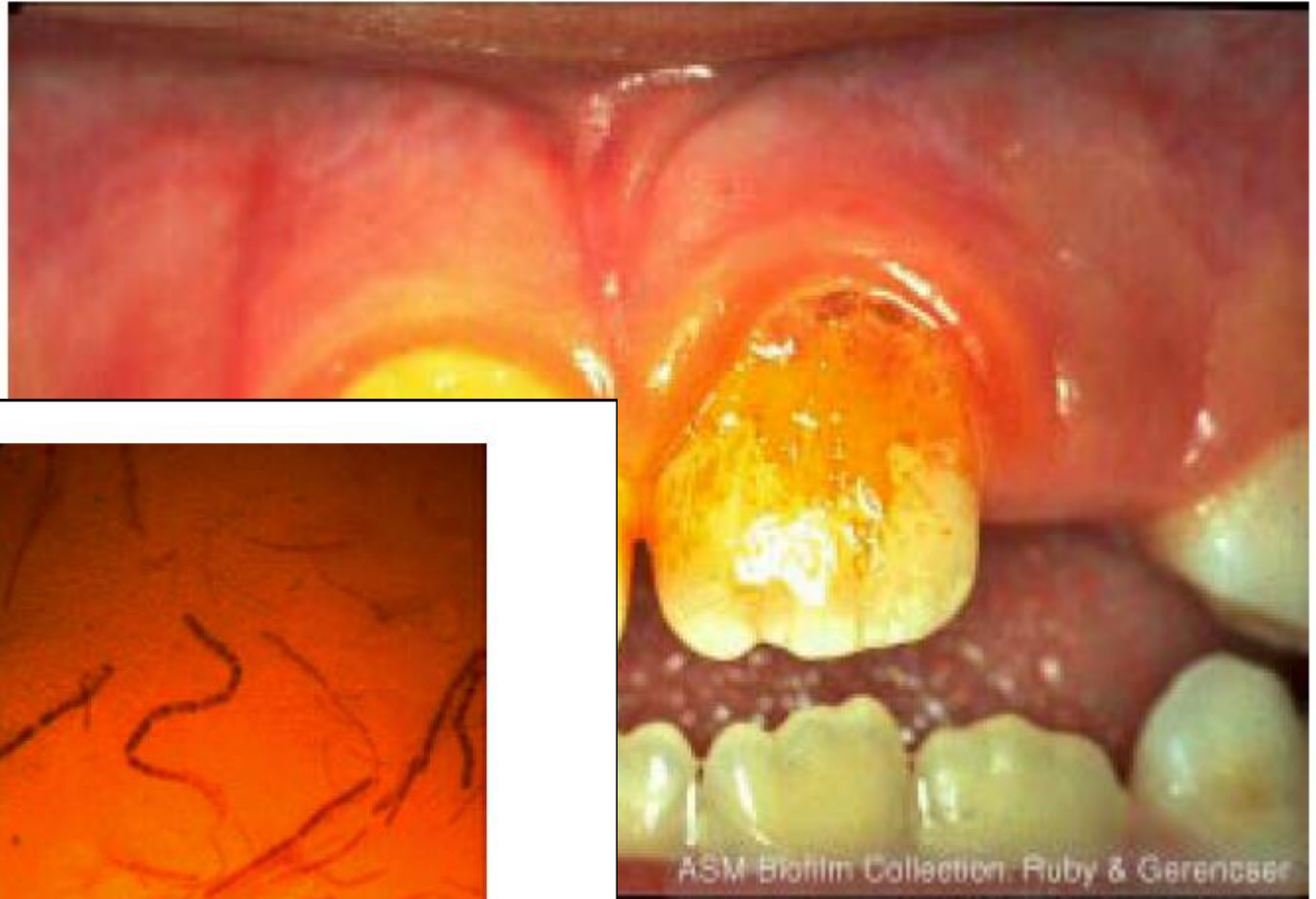


# Esempi di biofilm in alcune patologie umane



Hall-Stoodley et al. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews | Microbiology*, Vol. 2.

## Capsules: Dental plaque



### Slime layers and biofilms: dental plaque

Bacterial plaque biofilm with associated chains of encapsulated bacteria. In the presence of sucrose, *Streptococcus mutans* produces an acidic slime layer. Result is dental plaque; other bacteria may attach tooth surfaces and cause decay.





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Current Opinion in  
**Biotechnology**

## **Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission**

Anwar Huq<sup>1</sup>, Chris A Whitehouse<sup>2,\*</sup>, Christopher J Grim<sup>1,4</sup>, Munirul Alam<sup>3</sup>  
and Rita R Colwell<sup>1,4</sup>

**Current Opinion in Biotechnology** 2008, **19**:244–247



Flemming, Wingender (2010). The biofilm matrix.  
Nature Reviews | Microbiology, 8:623-633.

The microorganisms in biofilms live in a **self-produced matrix** of hydrated extracellular polymeric substances (EPS) that form their immediate environment.

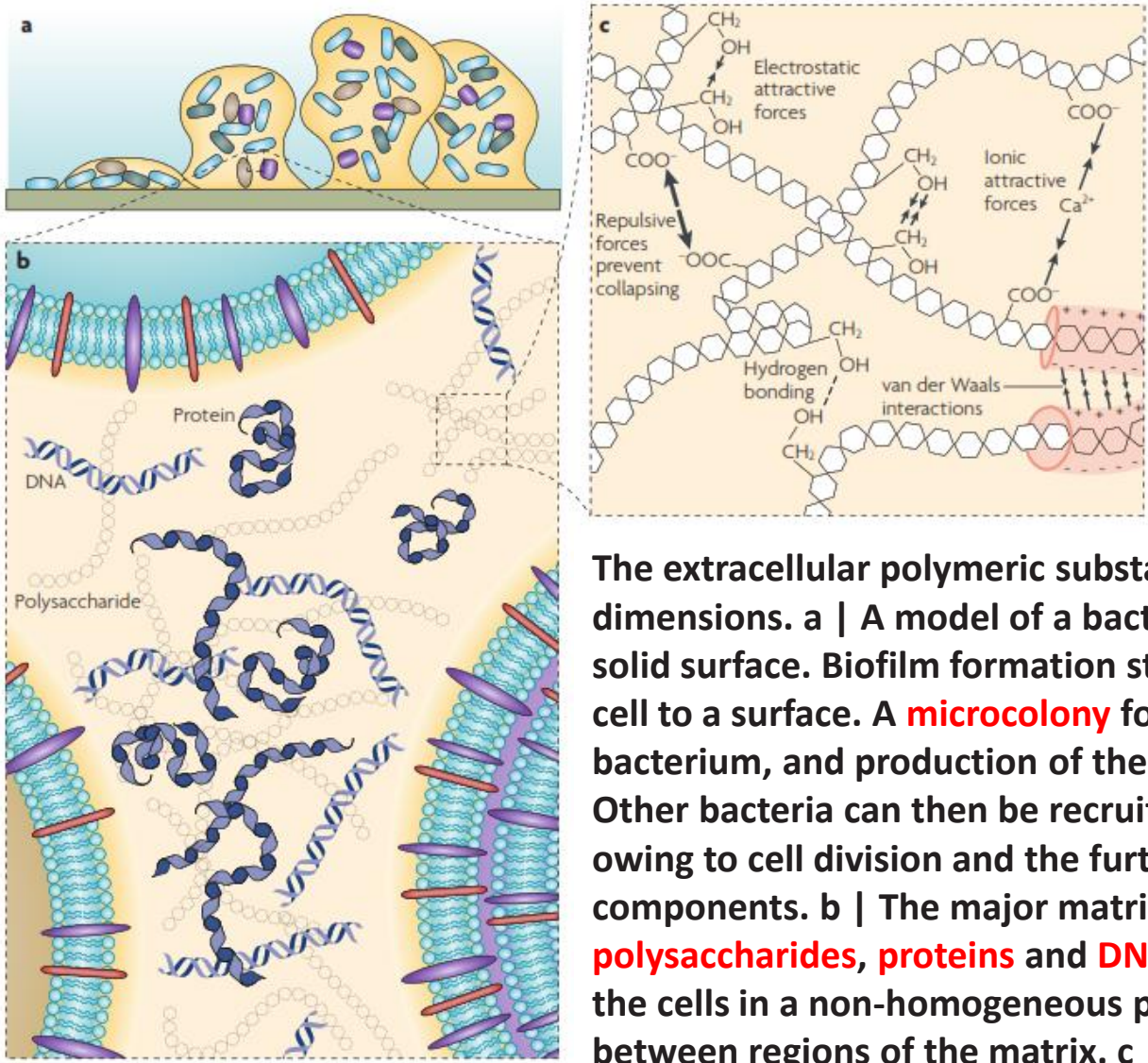
EPS are mainly polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids; they provide the mechanical stability of biofilms, mediate their adhesion to surfaces and form a cohesive, **three-dimensional polymer network** that interconnects and transiently immobilizes biofilm cells.

In addition, the biofilm matrix acts as an external digestive system by keeping **extracellular enzymes** close to the cells, enabling them to metabolize dissolved, colloidal and solid biopolymers.

Here we describe the functions, properties and constituents of the EPS matrix that make **BIOFILMS THE MOST SUCCESSFUL FORMS OF LIFE ON EARTH.**

**Table 1 | Functions of extracellular polymeric substances in bacterial biofilms**

Function	Relevance for biofilms	EPS components involved
Adhesion	Allows the initial steps in the colonization of abiotic and biotic surfaces by planktonic cells, and the long-term attachment of whole biofilms to surfaces	Polysaccharides, proteins, DNA and amphiphilic molecules
Aggregation of bacterial cells	Enables bridging between cells, the temporary immobilization of bacterial populations, the development of high cell densities and cell-cell recognition	Polysaccharides, proteins and DNA
Cohesion of biofilms	Forms a hydrated polymer network (the biofilm matrix), mediating the mechanical stability of biofilms (often in conjunction with multivalent cations) and, through the EPS structure (capsule, slime or sheath), determining biofilm architecture, as well as allowing cell-cell communication	Neutral and charged polysaccharides, proteins (such as amyloids and lectins), and DNA
Retention of water	Maintains a highly hydrated microenvironment around biofilm organisms, leading to their tolerance of desiccation in water-deficient environments	Hydrophilic polysaccharides and, possibly, proteins
Protective barrier	Confers resistance to nonspecific and specific host defences during infection, and confers tolerance to various antimicrobial agents (for example, disinfectants and antibiotics), as well as protecting cyanobacterial nitrogenase from the harmful effects of oxygen and protecting against some grazing protozoa	Polysaccharides and proteins
Sorption of organic compounds	Allows the accumulation of nutrients from the environment and the sorption of xenobiotics (thus contributing to environmental detoxification)	Charged or hydrophobic polysaccharides and proteins
Sorption of inorganic ions	Promotes polysaccharide gel formation, ion exchange, mineral formation and the accumulation of toxic metal ions (thus contributing to environmental detoxification)	Charged polysaccharides and proteins, including inorganic substituents such as phosphate and sulphate
Enzymatic activity	Enables the digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition and the degradation of structural EPS, allowing the release of cells from biofilms	Proteins
Nutrient source	Provides a source of carbon-, nitrogen- and phosphorus-containing compounds for utilization by the biofilm community	Potentially all EPS components
Exchange of genetic information	Facilitates horizontal gene transfer between biofilm cells	DNA
Electron donor or acceptor	Permits redox activity in the biofilm matrix	Proteins (for example, those forming pili and nanowires) and, possibly, humic substances
Export of cell components	Releases cellular material as a result of metabolic turnover	Membrane vesicles containing nucleic acids, enzymes, lipopolysaccharides and phospholipids
Sink for excess energy	Stores excess carbon under unbalanced carbon to nitrogen ratios	Polysaccharides
Binding of enzymes	Results in the accumulation, retention and stabilization of enzymes through their interaction with polysaccharides	Polysaccharides and enzymes



weak physicochemical interactions and entanglement of biopolymers

The extracellular polymeric substances matrix at different dimensions. a | A model of a bacterial biofilm attached to a solid surface. Biofilm formation starts with the attachment of a cell to a surface. A **microcolony** forms through division of the bacterium, and production of the biofilm matrix is initiated. Other bacteria can then be recruited as the biofilm expands owing to cell division and the further production of matrix components. b | The major matrix components — **polysaccharides, proteins and DNA** — are distributed between the cells in a non-homogeneous pattern, setting up differences between regions of the matrix. c | The classes of **weak physicochemical interactions** and the entanglement of biopolymers that dominate the **stability of the EPS matrix**.

I biofilm dei circuiti idrici di ogni tipo comportano dei rischi e rappresentano una sfida ad ingegneri ed igienisti.

Un biofilm è una raccolta di microrganismi in un substrato gelatinoso composto da sostanze polimeriche extracellulari. Si forma sempre dove s'installano e si riproducono dei microrganismi.

Il biofilm si forma come segue: la sostanza polimerica extracellulare (SPE) si compone principalmente di polisaccaridi, proteine, glicoproteine ed altri polimeri e viene secreta dai batteri dopo la loro concentrazione sul substrato.

Le SPE compongono il 60-90% della massa dei biofilm.

Il 90% del biofilm è composto da acqua e viene per questo motivo anche designato col nome di „Hydrogel“.

All'interno del biofilm la concentrazione dei microrganismi può diventare molto alta ed esso protegge i suoi "abitanti" da agenti esterni.

Quest'ultima particolarità può portare anche ad uno sviluppo della resistenza dei microrganismi verso i tradizionali prodotti disinfettanti.

Il biofilm protegge anche da valori estremi di pH, cariche idrauliche ed arricchisce la matrice di sostanze nutritive.

Bisogna partire dal presupposto che in ogni circuito idrico che non sia sterile il biofilm è presente.



Ogni materiale può essere aggredito da microrganismi e di conseguenza modificato o anche distrutto. Per esempio vetro, ceramica, polimeri e metalli vengono modificati nella loro superficie dalla presenza di un biofilm.

Queste modifiche, che possono arrivare fino alla distruzione totale sono causate da diversi microrganismi come alghe monocellulari, batteri, e funghi. Questo processo viene chiamato "corrosione microbicamente indotta". Secondo alcune stime nel 20% di tutte le corrosioni sono implicati dei microbi. Anche le superfici metalliche sono soggette a biofilm e in Germania i danni economici causati da questo fenomeno ammontano a svariati miliardi di Euro.

L'apparire di un biofilm riduce la durata di svariate parti di installazioni e causa gravi danni economici. Per esempio nei macchinari usati nell'industria alimentare la conseguenza della presenza di un biofilm può essere una carica batterica che va ad influire negativamente sulla qualità dei prodotti finali e la minor durata delle apparecchiature, con pesanti conseguenze economiche.

Questa corrosione microbicamente indotta è causata dall'accelerazione delle reazioni chimiche e biochimiche. I processi vitali dei microrganismi modificano il valore pH ed il potenziale di ossiriduzione dell'ambiente.

**In ambito alimentare, la presenza di microrganismi patogeni nel biofilm costituisce un pericolo per la salute: i microrganismi possono contaminare gli alimenti durante le varie fasi della produzione.**

**Microrganismi non patogeni possono, inoltre, rappresentare una potenziale fonte di microrganismi deterioranti.**

**Se un batterio patogeno (*V. cholerae*) riuscisse a colonizzare una tubatura di acqua potabile, la formazione di biofilm potrebbe rendere **inefficace la clorazione** con rischio di epidemie!**

**Sono allo studio antibiotici in grado di penetrare all'interno del biofilm e sostanze in grado di inibirne la formazione (furanoni).**

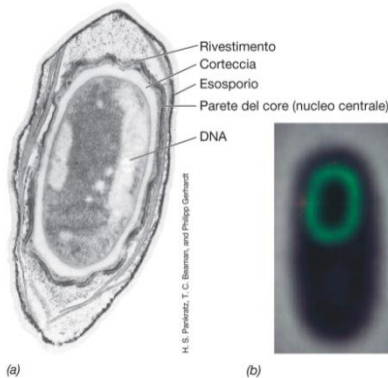
All'interno di biofilm associati a pareti, pavimenti e superfici di impianti per produzioni alimentari sono stati isolati ceppi di *L. monocytogenes*, spore di *C. botulinum*, etc.

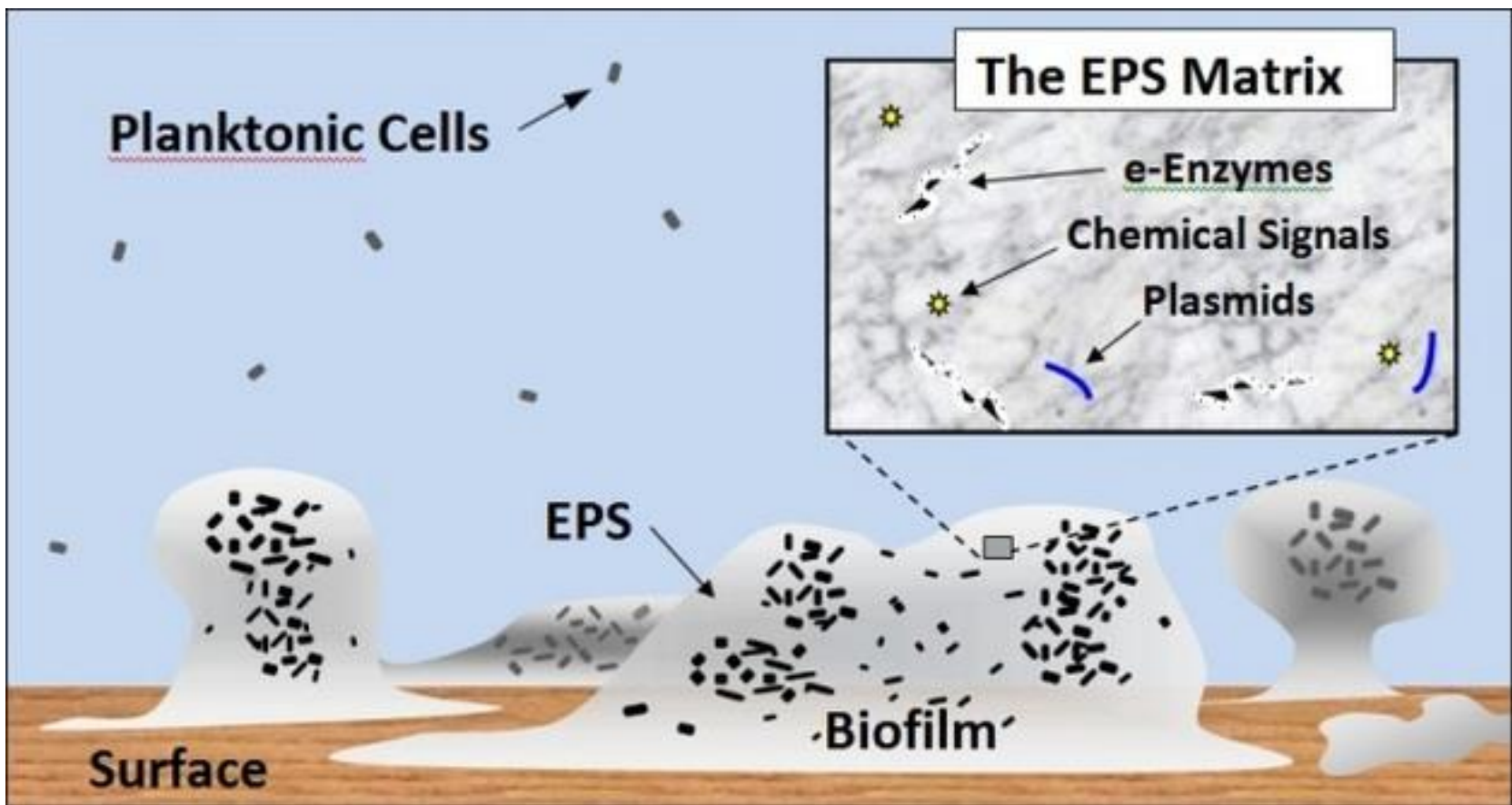


Le spore di *C. botulinum* resistono ad alte temperature e a trattamenti con molte sostanze biocide



*L. Monocytogenes* si sviluppa anche a temperature di refrigerazione (~4°C)





A biofilm is composed of attached microbial cells encased within a matrix of extracellular polymeric secretions (EPS), which surround and protect cells.

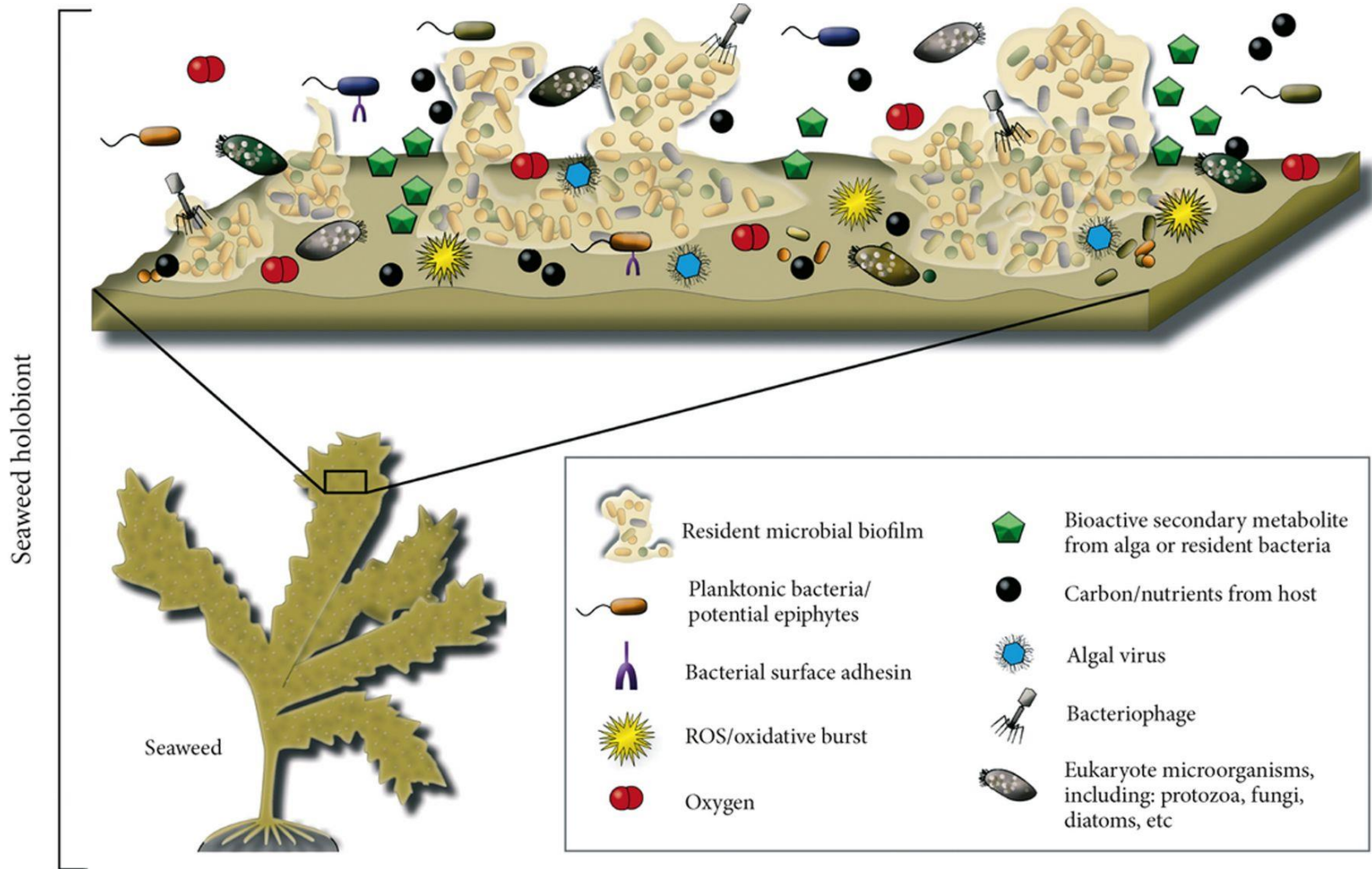
The EPS matrix is typically composed of **polysaccharides**, **proteins**, **lipids**, and **extracellular DNA (eDNA)**. Localized within the EPS matrix (see figure inset) are **extracellular enzymes (e-Enzymes)**. Also present are small pieces of DNA carrying specific genes, called **plasmids**.

Both e-Enzymes and plasmids are protected against degradation with the biofilm. Finally, bacteria release **signal molecules** for a process of chemical communication called **quorum sensing**.

**A biofilm may extend from just a few to hundreds of micrometers above a surface**, but is equipped with many inherent adaptations that are not present in planktonic cells.

© 2013 [Nature Education](#) All rights reserved.

# The seaweed holobiont and the factors predicted to influence bacterial colonization on macroalgal hosts.

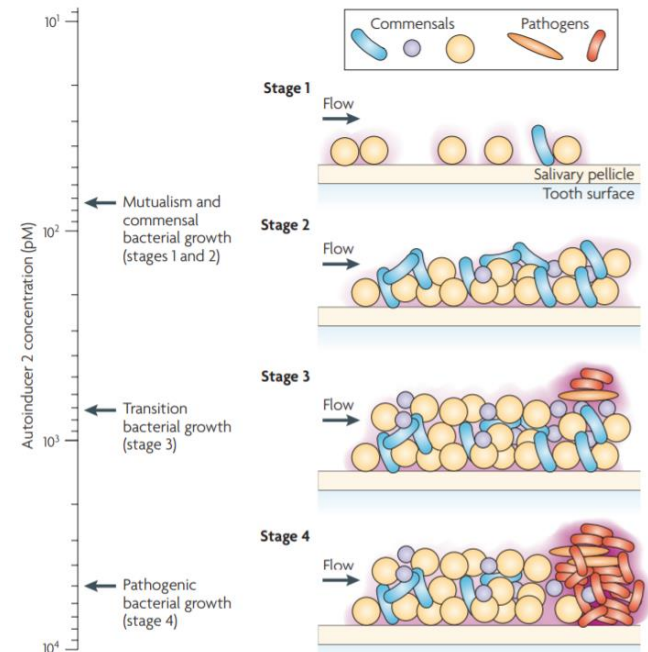
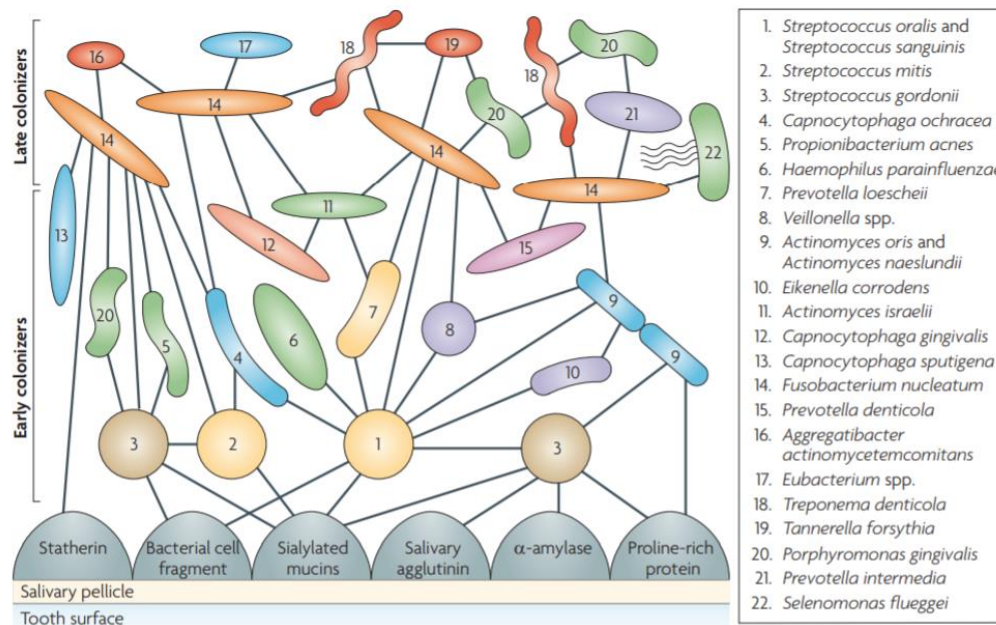


Suhelen Egan et al. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:462-476



**La costituzione dei biofilm può essere di tipo “multispecie”, in seguito alla colonizzazione di una superficie da parte di specie microbiche diverse.**

Kolenbrander, P., Palmer, R., Periasamy, S. *et al.* **Oral multispecies biofilm** development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Microbiol* 8, 471–480



**I biofilm possono, quindi, essere costituiti da microrganismi fisiologicamente compatibili ed inibire l'adesione di altri. I biofilm caratterizzati da specie microbiche diverse sono, in genere, più resistenti rispetto a quelli monospecie, in quanto i diversi esopolimeri prodotti conferiscono maggiore stabilità.**

**Fimbrie** e **glicocalice** (**strati mucosi** e **capsule**) contribuiscono all'adesione batterica.

La presenza di **adesine** sulla superficie dei batteri favorisce l'adesione alle superfici e la formazione di biofilm.

### **Capsule e strati mucosi**

Molti procarioti secernono alla loro superficie **sostanze mucose o vischiose** di natura **polisaccaridica** o, in alcuni casi, **proteica**.

La composizione varia a seconda dei microrganismi  
Possono essere sottili o spessi  
Possono essere in forma rigida o flessibile

La **capsula** forma uno strato fitto e rigido che non consente il passaggio di particelle di grandi dimensioni (particelle di inchiostro di china).

Lo **strato mucoso** è flessibile (deformabile) e non ostacola il passaggio di particelle (difficile da visualizzare al microscopio ottico).

Le sostanze mucose svolgono un ruolo essenziale nei processi di **adesione** e **colonizzazione** delle superfici solide e dei tessuti dell'ospite.

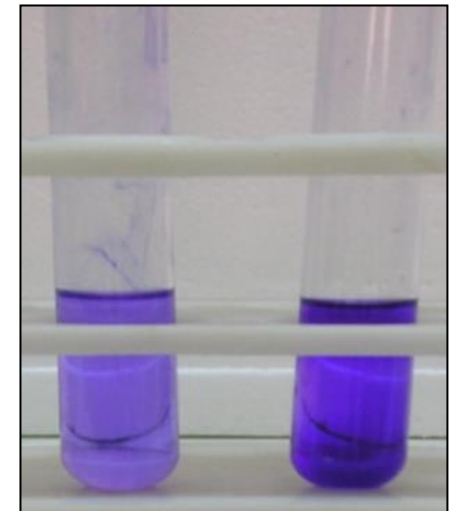
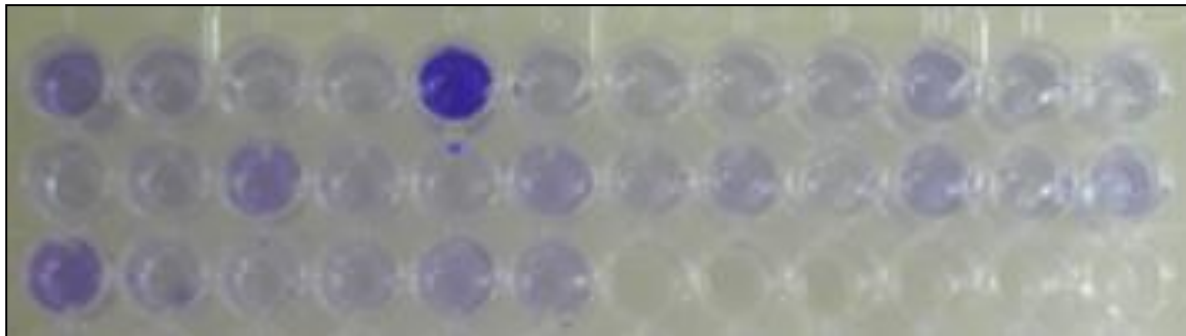
La secrezione di **polisaccaridi** consente a molti batteri di formare uno spesso strato di cellule (**biofilm**) su superfici di varia natura.

## TEST VALUTAZIONE PRODUZIONE DI BIOFILM

- La produzione di biofilm può essere valutata allestendo brodocolture in piastre microtiter (96 pozzetti) o in provette di vetro.



- Dopo incubazione, in condizioni idonee alla **crescita del microrganismo**, i micropozzetti o le provette **vengono lavate** con soluzione fisiologica o tampone fosfato, per allontanare le cellule non adese alle superfici.
- Dopo lavaggio viene aggiunta una **soluzione di cristal violetto (0,2%)** e si lascia agire per qualche minuto.
- Viene, quindi, effettuato un **lavaggio** per eliminare il cristal violetto che non è stato fissato dal biofilm.
- Infine si procede alla solubilizzazione del cristal violetto fissato con aggiunta di **etanolo (95%)**.
- Vengono eseguite letture allo **spettrofotometro (600 nm)** per valutare la concentrazione del cristal violetto solubilizzato.



## IDROFOBICITÀ CELLULARE

Polisaccaridi extracellulari, proteine e DNA sono molecole idrofiliche altamente idratate, ma altri EPS possiedono proprietà idrofobiche che consentono l'adesione a superfici idrofobiche.

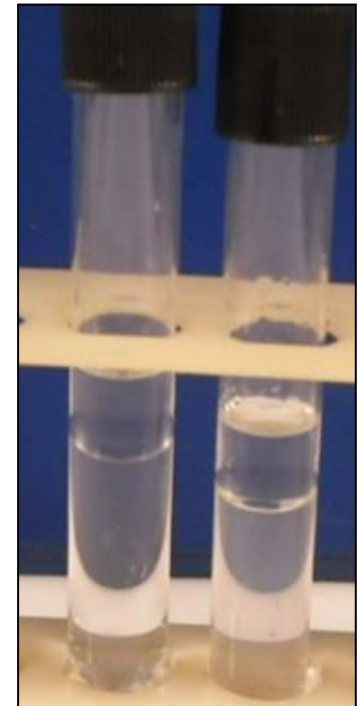
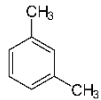
L'idrofobicità degli EPS è conferita da gruppi metile ed acetile legati ai polisaccaridi.

L'idrofobicità della superficie cellulare svolge un ruolo cruciale nell'adesione o nel distacco dalle superfici (Krasowska e Sigler. How microorganisms use hydrophobicity and what does this ...; 2014).

Le spore, grazie alla loro elevata idrofobicità ed alla presenza di strutture lanuginose, in genere, aderiscono rapidamente alle superfici per avviare la formazione di biofilm.

### Test valutazione idrofobicità cellulare

- Le cellule in **brodocoltura**, dopo incubazione, vengono prima **lavate** e poi **risospese** in soluzione fisiologica o tampone fosfato.
- Su un'aliquota della sospensione viene effettuata la lettura spettrofotometrica a 660 (550) nm.
- Ad un'aliquota di 3 mL della sospensione batterica vengono aggiunti 0,75 mL di **o-xilene** (solvente apolare: fase idrofoba) e si agita al vortex per 2'.
- Dopo la separazione delle fasi (40'), viene prelevata la fase acquosa e si effettua la lettura spettrofotometrica.
- Infine i risultati vengono espressi come percentuale di riduzione dell'assorbanza della sospensione test (con o-xilene) rispetto alla sospensione controllo (senza o-xilene).



$$A = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

$A_0$ : assorbanza della sospensione batterica prima del test.  
 $A_1$ : assorbanza della sospensione acquosa batterica dopo la separazione dalla fase idrofobica.

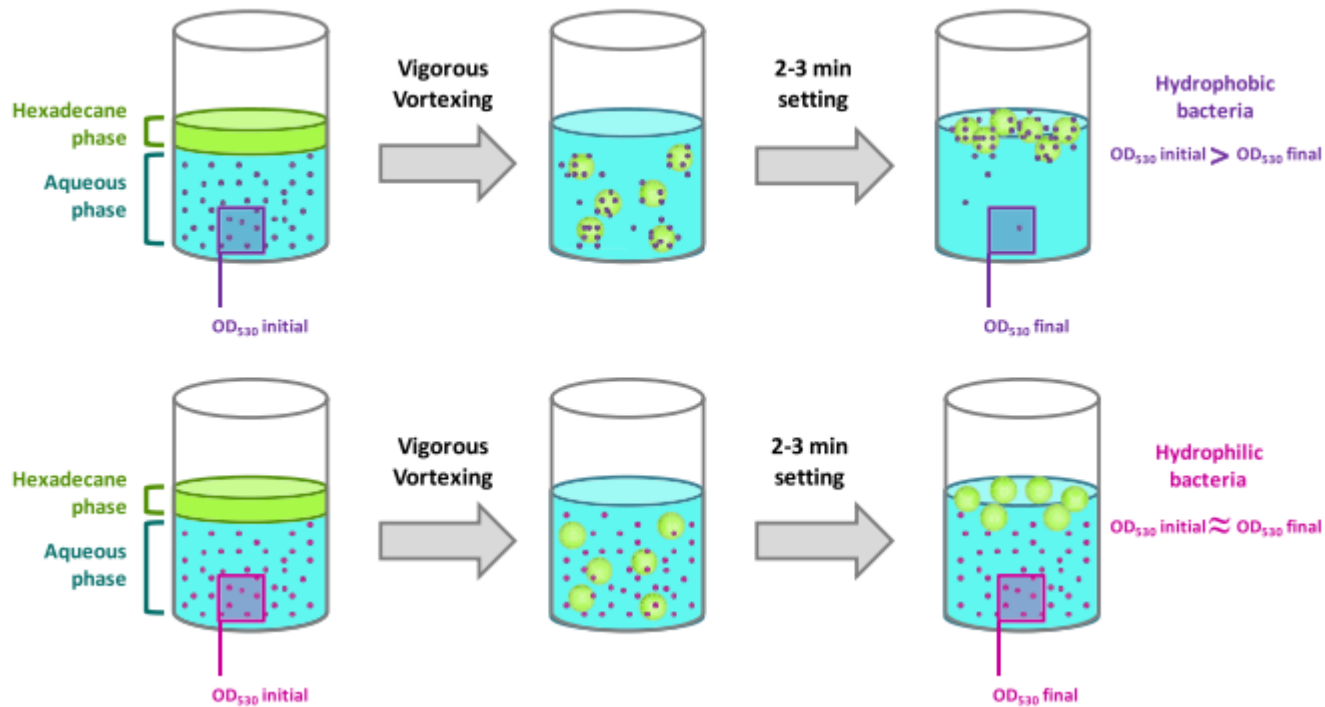
Bassa idrofobicità → percentuale di riduzione dell'assorbanza <19%

Moderata idrofobicità → percentuale di riduzione dell'assorbanza <43%

elevata idrofobicità → percentuale di riduzione dell'assorbanza >43%

**MICROBIAL ADHESION TO HYDROCARBONS TEST (MATH)** is widely employed for partitioning of bacteria between hydrocarbon and aqueous phase. Hydrophobicity of bacterial cells can be defined as the tendency of a microorganism to adhere to a nonpolar material compared to water.

Burgain et al. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213:21-35.



MATS technique derives from MATH.

MATS technique using three solvents:

- **Hexadecane** (nonpolar solvent),
- **Chloroform** (polar solvent, acid, electron acceptor)
- **Ethyl acetate** (basic solvent, electron donor).



## The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens

Laam Li<sup>1</sup>, Nilmini Mendis<sup>1</sup>, Hana Trigui<sup>1</sup>, James D. Oliver<sup>2</sup> and Sebastien P. Faucher<sup>1\*</sup>

Cultivation is one of the most fundamental steps in microbiology, and the plate count technique is one of the standard cultivation methods for the enumeration of viable bacteria (Buck, 1979; Talaro et al., 2002).

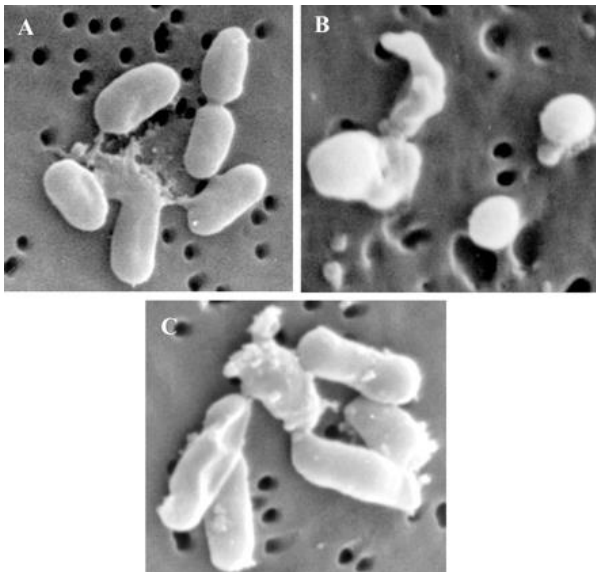


However, it was first discovered in **1982** that *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* cells could enter a distinct state called the **viable but non-culturable (VBNC) state** (Xu et al., 1982).

← Morphological characteristics of *E. tarda* CW7 analyzed with a scanning electron microscope (magnification, ×20,000).

- A. Normal cells.
- B. VBNC cells.
- C. Resuscitative cells.

Due et al., 2007: Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate<sup>†</sup>





## The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens

Laam Li<sup>1</sup>, Nilmini Mendis<sup>1</sup>, Hana Trigui<sup>1</sup>, James D. Oliver<sup>2</sup> and Sebastien P. Faucher<sup>1\*</sup>

It was shown that cells enter the VBNC state as a response to an extensive list of both chemically and environmentally unfavorable conditions (Oliver, 2010), including

- **nutrient starvation** (Cook and Bolster, 2007),
- **extreme temperatures** (Besnard et al., 2002),
- **incubation outside the pH or salinity ranges** that are permissive to cell growth (Cunningham et al., 2009),
- **elevated or lowered osmotic concentrations** (Asakura et al., 2008; Wong and Liu, 2008),
- **fluctuating oxygen concentrations** (Kana et al., 2008; ascher et al., 2000),
- **exposure to heavy metals** (Ghezzi and Steck, 1999; del Campo et al., 2009),
- **exposure to food preservatives** (Quirós et al., 2009) and
- **Exposure to white light and UV irradiation** (Gourmelon et al., 1994).

In addition,

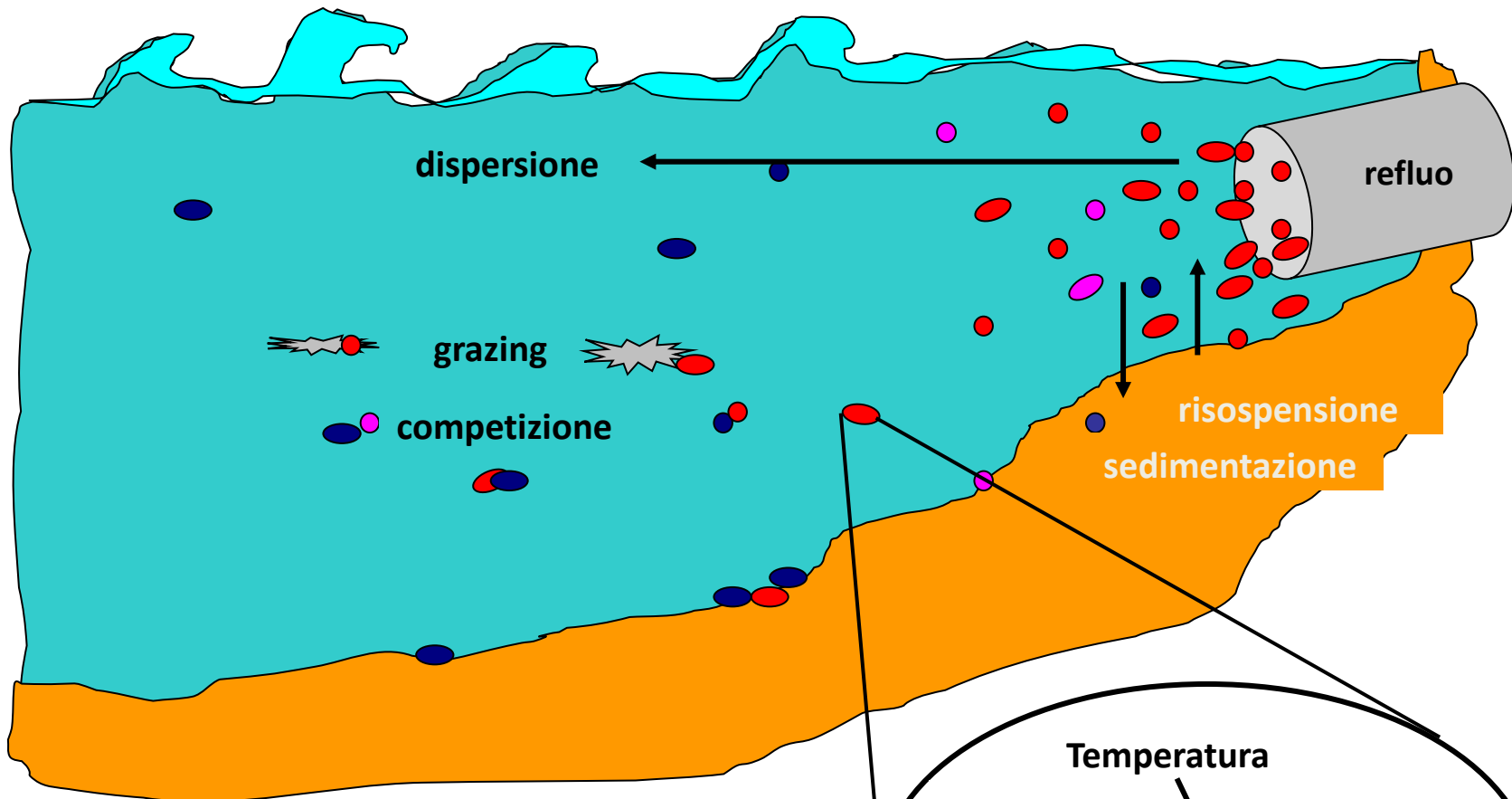
**treatments normally assumed to be bactericidal** may instead result in the **induction of the VBNC state** in a subpopulation, including

- **pasteurization** of milk (Gunasekera et al., 2002) and
- **chlorination** of wastewater (Oliver, 2005).

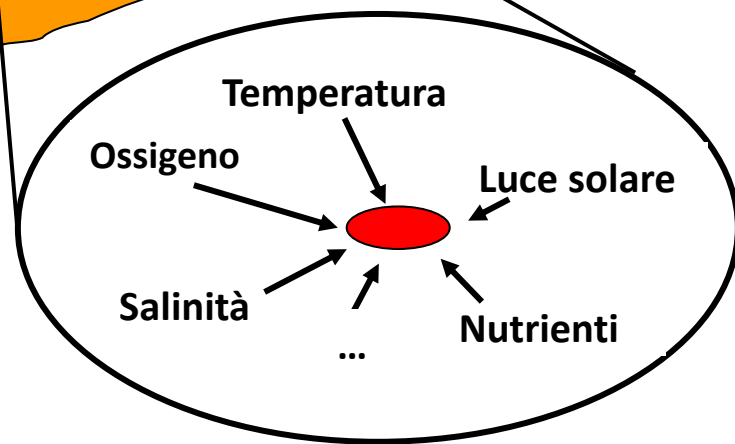
An **increase in temperature** is a common physical stimulus to resuscitate most VBNC cells induced by low temperature, such as *E. coli* O157:H7, *A. hydrophila*, *S. typhimurium*, *S. dysenteriae*, *Vibrio* spp., *E. faecalis*, and *S. aureus*.

Resuscitation can also be mediated by **different kinds of chemical stimuli**, including **sodium pyruvate** (Lleo et al., 2001; Pinto et al., 2011; Morishige et al., 2013; Pasquaroli et al., 2013), **amino acids** (Pinto et al., 2011), and **Tween 80** (Trinh et al., 2015).

**Resuscitation**  
(rianimazione)



**Principali fattori ambientali che influiscono sulla sopravvivenza dei batteri enterici nell'ambiente.**





## Stato VBNC (Viable But NonCulturable)

I batteri che si trovano nello stato “VBNC” non si moltiplicano sui comuni terreni di coltura, sui quali normalmente formano colonie.

Essi sono, tuttavia, vitali ed in grado, in opportune condizioni, di ripristinare in pieno le loro attività metaboliche.

Le cellule VBNC presentano una bassissima attività metabolica, ma, dopo la “resuscitation” risultano di nuovo coltivabili ed in grado di ripristinare il loro eventuale potere patogeno.

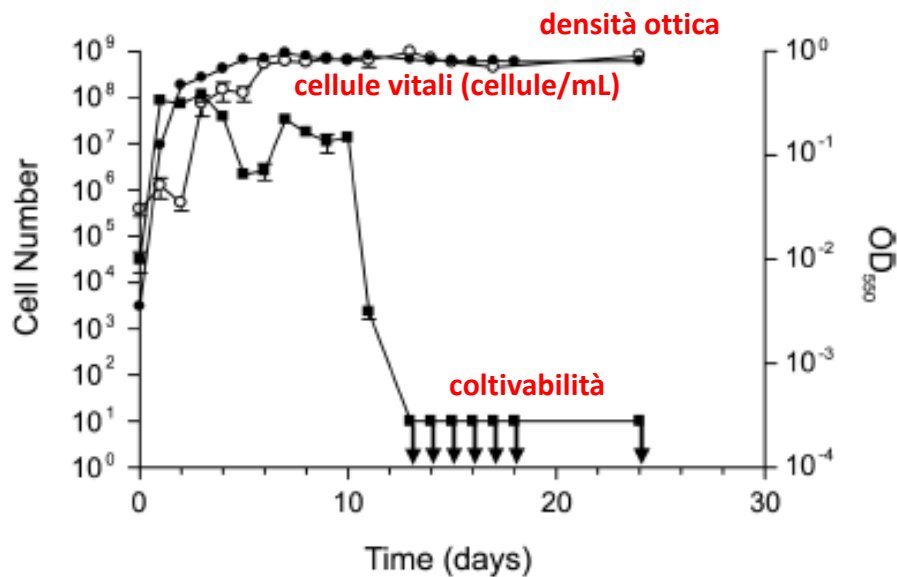


Fig. 3. The viability (cells/mL) (●), optical density (○) and culturability (cfu/mL) (■) of *H. pylori* cells aged in laboratory culture. Error bars represent the SEM of duplicate samples and ↓ indicate culturability below the limit of detection. Taken from Adams *et al.*, 2003.

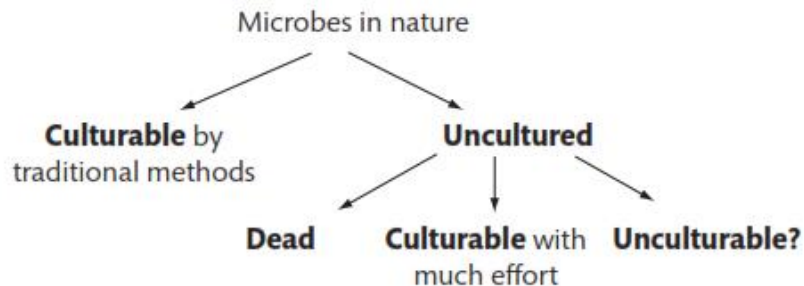
Le cellule entrano nello stato VBNC in risposta ad alcune forme di stress ambientali:

- starvation,
- esposizione a T esterne al range di crescita,
- elevate concentrazioni osmotiche (salinità),
- concentrazioni di ossigeno non idonee,
- trattamento con agenti disinfettanti (clorazione),
- esposizione alla luce solare,
- ...

Questi stress potrebbero essere letali se la cellula non entrasse in questo stato di dormienza.

Molti batteri (G+ e G-) patogeni e non, possono entrare nello stato VBNC.

L'importanza di questo evento è meglio compreso se si considera che in medicina, in studi di bioramediation, nell'uso degli indici di contaminazione fecale ed in altri studi di microbiologia la coltivabilità dei batteri viene spesso impiegata come unico indicatore di vitalità.



*Kirchman D.L. - Processes in Microbial Ecology – Oxford University Press (2012)*  
Distinctions between microbes that are culturable, uncultured, or unculturable. Among the microbes called **uncultured**, some are unculturable by traditional methods, but **can be grown as pure cultures with extraordinary efforts and innovative approaches.** The microbes resisting even these efforts may be really **unculturable**, but the possibility always remains that apparently unculturable bacteria will prove to be culturable in the future by a method not known today.

Lo stato VBNC nei batteri patogeni pone seri problemi in termini di sicurezza in sanità pubblica

Questa condizione, probabilmente, allunga i tempi di sopravvivenza quando i microrganismi pervengono in ambienti sfavorevoli.

Studi di laboratorio confermano che *V. cholerae* può persistere nello stato VBNC per lunghi periodi.

Le cellule VBNC di batteri patogeni, perdendo la capacità di crescere sui comuni terreni di coltura, sfuggono alle tecniche di isolamento convenzionali.

Lo stato VBNC è una condizione reversibile: i batteri, quando pervengono in un ambiente di nuovo favorevole, potrebbero riacquistare pienamente la loro capacità infettante e la loro patogenicità.

## Caratteristiche delle cellule VBNC

- Ridotte dimensioni della cellula
- Variazione delle morfologia cellulare
- Ridotto trasporto di nutrienti
- Ridotto tasso di respirazione
- Ridotta sintesi di macromole
- Cambiamenti nella composizione degli acidi grassi della membrana citoplasmatica
- Cambiamenti nella struttura del peptidoglicano.
- Perdita dei flagelli
- ...

Durante questa fase vengono tuttavia sintetizzate **proteine tipiche della "starvation" e dello shock da freddo.**

Le concentrazioni di ATP restano comunque alte.

Perché nei terreni di coltura le cellule diventano non-coltivabili?

- Whitesides and Oliver (1997) osservarono che " ... elevated nutrient might be toxic in some manner to cells in this [the VBNC] state".
- Bloomfield et al. (1998) suggerirono che le cellule possono produrre **radicali liberi**, in seguito all'esposizione ad alte concentrazioni di nutrienti, che possono inibire la formazione di colonie sui terreni di coltura.
- ...

Per alcuni batteri (*Vibrio vulnificus*), è stato osservato che lo stato VBNC è dovuto alla produzione di perossido ( $H_2O_2$ ), quando coltivati su terreni solidi, o alla presenza di perossidi di origine naturale, associata all'**incapacità delle cellule ad eliminare il metabolita tossico.**



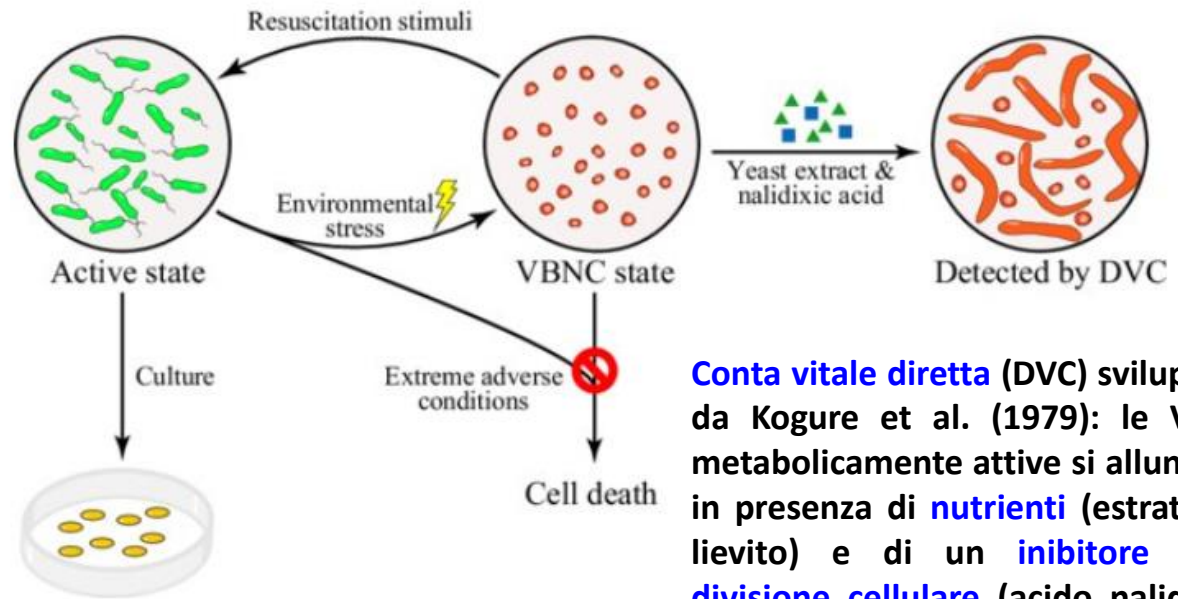
**Table 1.** Bacteria Described to Enter the VBNC State

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

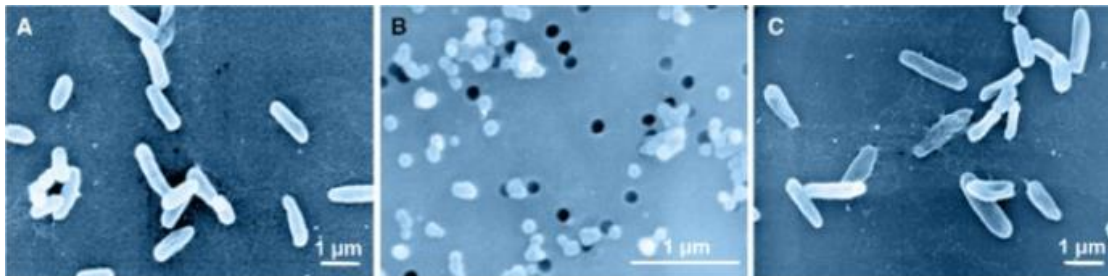
Zhang et al. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Mar Life Sci Technol* 3, 189–203.1

### Il ciclo di vita delle celle VBNC.

VBNC si riferisce a uno stato fisiologico in cui i batteri sono metabolicamente attivi, ma non sono più coltivabili su terreni di crescita convenzionali. È una strategia di sopravvivenza adottata da molti batteri in risposta a condizioni ambientali difficili e le cellule VBNC possono tornare allo stato coltivabile in condizioni favorevoli.



**Conta vitale diretta (DVC)** sviluppata da Kogure et al. (1979): le VBNC metabolicamente attive si allungano in presenza di **nutrienti** (estratto di lievito) e di un **inibitore della divisione cellulare** (acido nalidixico o cefalexina), ma non possono svilupparsi in colonie visibili su terreni solidi convenzionali.



Morphological characteristics of *Vibrio harveyi* SF1 analyzed with a scanning electron microscope.

- A. Normal cells;
- B. VBNC cells;
- C. Resuscitated cells.


https://ilsalvagente.it/2018/04/24/e-se-il-cloro-fosse-inefficace-per-disinfettare-acqua-e-alimenti/

Posta :: Posta in Arrivo: M x E se il cloro fosse ineffica x

Sicuro | https://ilsalvagente.it/2018/04/24/e-se-il-cloro-fosse-inefficace-per-disinfettare-acqua-e-alimenti/

App Horde :: Utente Google wR Dizionario Italiano- Il Fatto Quotidiano - Il Fatto Alimentare Università degli Studi Dipartimento di Scienze Rai Rai Radio Live - Asc (89) Libero Mail. Hor Sci-Hub: removing b

ABBONAMENTI LEGGI LA RIVISTA LE GUIDE NEWS CHIEDILO AL SALVAGENTE VIDEO



Utilizzato da molti anni per decontaminare acqua e prodotti freschi, il cloro potrebbe essere inefficace e spiegare i casi di Salmonella e Listeria che sempre più si manifestano in varie parti del mondo.

È l'ipotesi, per nulla rassicurante, di una ricerca effettuata dal Centre for Biological Sciences, dell'università britannica di Southampton, Highfield Campus, realizzata con i fondi dell'azienda britannica Vitacress Salads che commercializza prodotti freschi lavati in acqua di sorgente senza cloro.

Lo studio, in sostanza, spiega che i trattamenti fanno entrare i batteri in uno stato chiamato VBNC in cui non possono essere rilevati mediante tecniche standard di coltura di laboratorio utilizzate dall'industria. In questo stato i batteri possono "risvegliarsi", in determinate condizioni, sebbene vi siano dati contrastanti sulla patogenicità delle cellule VBNC. Potenzialmente, dunque, gli agenti patogeni sarebbero in grado di causare malattie a chi le ingerisce.

Lo studio ha simulato la presenza di spinaci contaminati da *L. monocytogenes* e *S. enterica* serovar Thompson.

Bill Keevil, capo del gruppo di microbiologia dell'Università di Southampton, nel Regno Unito, ha affermato che dopo anni di fiducia nel cloro come ideale disinfettante per gli alimenti e l'acqua potabile, il lavoro potrebbe spiegare epidemie non riconosciute o non rintracciabili che si basano sul recupero della cultura.

SOTTO MENTITE SFOGLIE

ALTRE STORIE

Scopri tutto quello che con un anno di Sal

SCOPRI

Da novembre senza fatture Eni. E ora arriva la stangata

redazione il Salvagente - 23 maggio 2018

Ancora una storia di mancate fatturazioni di Eni: un lettore che chiede per mesi l'invio della bolletta e dall'azienda rispondono solamente "Non si preoccupi, potrà rateizzare", Un caso di "customer care" quantomeno discutibile

2014 - Robertson -....pdf

Mostra tutto

08:58 23/05/2018