

Appunti della lezione 9 - BIOFILM

Colonizzazione di superfici e biofilm

Le superfici sono habitat microbici molto importanti perché su di esse possono adsorbirsi nutrienti; nel microambiente costituito da una superficie, il livello di nutrienti può essere molto più alto di quanto non lo sia in una soluzione. Di conseguenza, l'attività e il numero di cellule microbiche su una superficie è di solito molto maggiore di quanto non lo sia in una soluzione acquosa.

Come superfici sperimentali sulle quali far aderire e crescere i microrganismi si possono utilizzare dei comuni vetrini per microscopia. L'importanza delle superfici per lo sviluppo dei microrganismi risulta evidente se si immerge un vetrino in un habitat microbico, lo si lascia per un certo periodo di tempo e lo si esamina al microscopio dopo averlo rimosso. Su superfici artificiali le microcolonie di cellule batteriche si sviluppano con la stessa rapidità con cui si sviluppano su superfici naturali. Per questo motivo l'esame microscopico periodico di vetrini immersi in un habitat microbico viene utilizzato per misurare la velocità di crescita dei microrganismi in natura. Una superficie può essere essa stessa un nutriente, come per esempio, una particella di materia organica sulla quale i microrganismi adesi catabolizzano direttamente i composti che costituiscono la particella stessa. Il materiale vegetale morto, per esempio, viene rapidamente colonizzato dai microrganismi del suolo e la popolazione microbica che si sviluppa sulla loro superficie può essere facilmente evidenziata mediante semplici tecniche di colorazione.

Formazione di biofilm

I microrganismi che crescono sulle superfici sono racchiusi all'interno di biofilm. I biofilm sono costituiti da microcolonie di cellule batteriche adese ad una superficie e incapsulate in una matrice polisaccaridica adesiva secreta dalle cellule stesse. I biofilm intrappolano i nutrienti necessari per la crescita della popolazione microbica e contribuiscono a prevenire il dilavamento delle cellule dalle superfici immerse in un fluido (diapos. 16). Di solito i biofilm sono costituiti da diversi strati, ciascuno dei quali può essere esaminato mediante l'uso di un microscopio confocale a scansione laser (Cap. 3.2). Questa metodologia consente di visualizzare sezioni a profondità diverse in un biofilm vivente e di sovrapporle, al fine di creare una rappresentazione tridimensionale dell'oggetto.

Si è visto che i batteri crescono in minuscoli aggregati, chiamati microcolonie.

Generalmente le cellule batteriche costituiscono meno di un terzo del materiale delle microcolonie. Il resto è una sostanza vischiosa secreta dalle cellule, che assorbe acqua e intrappola piccole particelle.

E' questa matrice extracellulare a tenere insieme le microcolonie. Un biofilm è costituito da numerosissimi raggruppamenti di questo tipo, separati da una rete di canali acquosi aperti. Il liquido che percorre questi minuscoli condotti raggiunge

ciascun raggruppamento microbico, fornendo sostanze nutritive disciolte e rimuovendo i prodotti di scarto. Le cellule situate all'esterno di una microcolonia sono adeguatamente servite in questo sistema idraulico, ma quelle all'interno sono in gran parte tagliate fuori, i densi aggregati cellulari che le circondano e la matrice organica che cementa il tutto fungono da barriera al flusso dell'acqua. Perciò le cellule all'interno della colonia devono accontentarsi delle sostanze nutritive che riescono a pervenire per diffusione fino ad esse. Non è una dieta troppo ferrea: dato che la matrice è in gran parte formata da acqua, le piccole molecole possono muoversi liberamente nel suo interno, sebbene vi siano importanti eccezioni. Una sostanza potrà difficilmente diffondere fino a raggiungere il centro di una microcolonia se reagisce con le cellule e il materiale della matrice che incontra sul proprio cammino.

Questa reattività chimica dà origine e cambiamenti ambientali su piccola scala nell'ambito del biofilm. Per esempio, la concentrazione di ossigeno può variare in modo drastico in punti distanti solo 5 centesimi di millietro

La comunicazione tra le cellule presenti nei biofilm è un fattore cruciale per lo sviluppo e il mantenimento del biofilm stesso. L'adesione di una cellula ad una superficie costituisce un segnale per l'espressione dei geni specifici per lo sviluppo del biofilm. Questi geni codificano proteine che dirigono la sintesi di molecole che fungono da segnali di comunicazione tra le cellule e costituiscono il segnale molecolare per dare inizio alla formazione dei polisaccaridi (diap. 16). In *Pseudomonas aeruginosa*, un microrganismo noto per la sua capacità di formare biofilm, le principali molecole segnale sono composti chiamati omoserina lattoni. Queste molecole svolgono il ruolo di agenti chemiotattici che richiamano le cellule di *Pseudomonas aeruginosa* circostanti, che aumentano in numero, iniziano a sviluppare il biofilm, tramite un fenomeno chiamato "individuazione del quorum" (quorum sensing, diap. 19). *Pseudomonas aeruginosa* è coinvolto nella fibrosi cistica, una malattia durante la quale si sviluppa nei polmoni un biofilm molto tenace che provoca sintomi simili alla polmonite

Diap. 20

All'interno di un organismo batteri planctonici possono essere eliminati da anticorpi, fagociti e antibiotici. Le cellule batteriche possono organizzarsi in biofilms, preferenzialmente su superfici inerti; queste comunità sessili sono resistenti ad anticorpi, fagociti ed antibiotici. I fagociti sono attratti dai biofilms, e, anche se la fagocitosi non avviene, gli enzimi della fagocitosi sono rilasciati. Gli enzimi della fagocitosi danneggiano il tessuto intorno al biofilm e batteri planctonici sono rilasciati dal biofilm. Il rilascio causa la disseminazione e l'infezione acuta nei tessuti circostanti.

Conseguenze e controllo della formazione di biofilm

La formazione di biofilm ha conseguenze importanti sia in ambito medico che industriale. Nel corpo umano le cellule batteriche racchiuse in biofilm sono protette dall'attacco del sistema immunitario e spesso gli antibiotici ed altri agenti antimicrobici sono incapaci di penetrare al suo interno. Oltre che nella fibrosi cistica, i

biofilm sono implicati in parecchie condizioni patologiche, come per esempio disturbi periodontali, calcoli renali, tubercolosi, la malattia dei legionarie infezioni da *Staphylococcus*. Sfortunatamente, impianti medici e protesi sia di breve termine, come per esempio cateteri urinari, sia permanenti, come per esempio articolazioni artificiali, sono superfici eccellenti per lo sviluppo di biofilm. Si stima che soltanto negli Stati Uniti ogni anno circa 10 milioni di persone siano soggette a infezioni provocate dallo sviluppo di biofilm su impianti medici o conseguenti a procedure mediche invasive. I biofilm sono la ragione per cui l'igiene orale di routine è così importante. La placca dentale è infatti un tipico biofilm e contiene batteri produttori di acidi e responsabili della carie.

Nelle industrie, i biofilm possono rallentare il flusso di acqua, petrolio, o altri fluidi nelle tubature e possono accelerarne la corrosione. I biofilm costituiscono anche la fase iniziale del deterioramento di oggetti sommersi, come le strutture che sostengono le piattaforme oceaniche, barche e installazioni costiere. Per questo motivo le industrie spendono ogni anno una considerevole quantità di denaro per trattare tubature ed altre superfici in modo da mantenerle libere da biofilm.

La qualità dell'acqua potabile può essere compromessa da biofilm che si sviluppano nelle tubature degli acquedotti. Normalmente, i biofilm che si sviluppano nelle tubature degli acquedotti contengono batteri innocui; tuttavia, se un batterio patogeno riuscisse a colonizzare una tubatura, la normale disinfezione con cloro potrebbe rivelarsi insufficiente alla sua eliminazione. Il dilavamento di cellule che si verifica periodicamente potrebbe quindi portare alla diffusione di epidemie. Esiste una qualche preoccupazione sul fatto che *Vibrio cholerae*, l'agente eziologico del colera, possa diffondersi in questo modo. Per questi motivi, il controllo dello sviluppo di un biofilm è considerato un problema importante, anche se gli strumenti per affrontarlo sono purtroppo, a tutt'oggi molto scarsi.

Perché i biofilm sono così resistenti?

A volte gli antibiotici e i disinfettanti antisettici possono non essere in grado di perforare la pellicola. Gli antibiotici a base di penicillina, per esempio incontrano difficoltà a penetrare nei biofilm contenenti cellule che producono enzimi della famiglia delle beta-lattamasi. Questi enzimi degradano l'antibiotico più velocemente di quanto esso riesca a diffondere verso l'interno, sicché il farmaco non arriva mai negli strati più profondi del biofilm. Anche i detergenti al cloro, diffusissimi in ambito domestico e industriale, distruggono i biofilm con difficoltà. Il cloro, ossidante reattivo, finisce per avere la meglio, ma prima deve esaurire, strato per strato, la capacità neutralizzante del film. Per far questo occorre più tempo e più detergente di quanto si possa pensare.

Vi sono ulteriori fattori che incrementano la resistenza. Anche quando un agente antimicrobico penetra facilmente nei biofilm, i microrganismi spesso sopravvivono ad un trattamento aggressivo che distruggerebbe tutte le cellule libere. Questa capacità ha a lungo messo in imbarazzo i biologi, ma ultimamente si è visto che la varietà di condizioni e di tipi batterici presenti in un biofilm conferisce protezione dagli agenti antibatterici.

Si consideri ancora l'azione della penicillina, che attacca le cellule proliferanti di molte specie batteriche. Se un biofilm contiene, per esempio, regioni carenti di una sostanza nutritiva essenziale, le cellule in queste regioni, che sono vive ma non si riproducono, sopravvivranno all'azione della penicillina. Dato che in un biofilm

batteri attivi e inattivi si trovano fianco a fianco, e dato che i batteri superstiti possono sfruttare quelli morti come fonte di sostanze nutritive, le poche cellule rimanenti alla conclusione di una terapia antibiotica possono riportare il biofilm alla condizione originaria nel giro di poche ore.

Queste proprietà spiegano perché gli agenti antimicrobici che funzionano perfettamente sulle cellule in coltura non siano altrettanto utili per fronteggiare i biofilm.

Le ricerche fin qui condotte hanno rivelato, fra l'altro, che quando i batteri aderiscono ad una superficie e formano un biofilm, sintetizzano centinaia di proteine che non si trovano nelle cellule libere. Alcune di queste proteine sono coinvolte in una strana serie di scambi e che le cellule eseguono subito dopo che si depositano su una superficie, ma prima che le loro posizioni di fissino (determinato tramite isolamento di mutanti).

Utilizzando *Staphylococcus epidermidis*, responsabile delle comuni infezioni da stafilococchi, alcuni ricercatori hanno identificato geni che regolano la fase successiva dello sviluppo di un biofilm: la sintesi della matrice extracellulare. Una volta inattivati questi geni, il batterio perde la capacità di formare un biofilm in provetta e, a quanto pare, anche nei tessuti di animali di laboratorio. Altri esperimenti hanno rivelato analoghi centri di controllo genetici in altre specie. Per esempio *Pseudomonas aeruginosa* contiene diversi geni che vengono attivati entro 15 minuti dal fissaggio ad una superficie. Uno di questi geni, *algC*, è indispensabile per la sintesi dell'alginato, il polimero gelatinoso che compone gran parte della matrice extracellulare.

Come possono le cellule che si riuniscono per formare un biofilm sapere che dovranno attivare certi geni? La risposta è che questi microrganismi apparentemente semplici e autonomi comunicano regolarmente l'uno con l'altro. In *Pseudomonas aeruginosa* e in un'ampia classe di batteri simili, le relative molecole di segnalazione sono lattoni acilati dell'omoserina, che ciascuna cellula produce a basso livello. Quando sono riunite abbastanza cellule, la concentrazione di questi composti aumenta, e ciò a sua volta induce cambiamenti nell'attività di decine di geni. Dei ricercatori hanno dimostrato che questo meccanismo, chiamato "quorum sensing" (diap. 19), è fondamentale per lo sviluppo dei biofilm. In effetti, ceppi di laboratorio di *Pseudomonas aeruginosa* che sono privi del gene per un particolare lattone acilato dell'omoserina, non riescono a formare biofilm normali, e invece si accumulano in un mucchio disorganizzato.

Ora che si conosce come si formano i biofilm batterici, dovrebbe essere possibile controllarli con farmaci in grado di prendere di mira le loro proprietà specifiche.

Per esempio, si potrebbero neutralizzare le appendici appiccicose sulla superficie delle cellule con una molecola che si unisca facilmente ad esse, riducendo la loro capacità di legarsi alle superfici e di formare quindi un biofilm.

Un'altra opzione è quella di interferire con la sintesi della matrice extracellulare, per esempio rivestendo le protesi con sostanze chimiche capaci di disattivare i geni batterici responsabili della formazione della matrice.

Si potrebbero anche prendere a bersaglio le molecole che i batteri dei biofilm usano per comunicare, bloccando così la formazione della pellicola, o sopprimendo la produzione di tossine, o inibendo altre attività nocive. In altri termini, invece di cercare di sopraffare i microrganismi patogeni con veleni uccidendo nel frattempo molti altri batteri innocui o utili, si potranno presto manipolare le cellule in modi più sofisticati per inibirne le attività dannose.

Guerra tattica

Lo sviluppo commerciale di un agente di questo tipo è già iniziato. Alcuni ricercatori notarono (nel 1995) che le fronde di un'alga rossa (*Delisea pulchra*) che cresce a Botany Bay, raramente sono coperte da biofilm. A dispetto delle migliaia di specie batteriche che prosperano in queste acque, le alghe ne restano libere. Altri ricercatori si resero conto che *D. pulchra* riesce a restare indenne dai biofilm producendo certe sostanze chimiche, i furanoni sostituiti. In seguito a questa scoperta, questi ricercatori e la loro Università hanno fondato un'azienda (Biosignal) che produce rivestimenti protettivi contenenti furanoni sostituiti, per applicarli su scafi di imbarcazioni e componenti per acquicoltura.

Negli ultimi anni si sono ottenute informazioni sul meccanismo d'azione dei furanoni sostituiti, che sono simili a due classi di molecole batteriche: ai lattoni acilati dell'omoserina, che molti batteri utilizzano per l'individuazione del quorum, e ad una nuova famiglia di molecole che pressoché tutti i batteri emettono per trasmettere segnali tra specie differenti. Evidentemente i furanoni sostituiti si legano alle cellule batteriche nei siti normalmente usati dalle molecole di segnalazione, e così facendo impediscono loro di emettere messaggi che promuovano la formazione di biofilm. I furanoni sostituiti sono in grado sia di prevenire la formazione di biofilm, sia di contribuire alla distruzione di quelli esistenti. Sembrano anche ideali per l'uso medico, perché non sono tossici e sono stabili nell'organismo.

Per di più, esistono da milioni di anni negli oceani senza che i batteri siano diventati resistenti ai loro effetti, il che lascia sperare che essi non inducano resistenza nei batteri che colonizzano gli strumenti clinici ed i tessuti umani.

(Questa affermazione è tratta dall'articolo "Combattere i BIOFILM", Le Scienze 396/agosto2001. Secondo voi è proprio vera?)

Queste ricerche stanno fornendo anche altri risultati che potrebbero dimostrarsi importanti, perché rivoluzionano le concezioni acquisite sui batteri. I biologi cominciano a parlare della formazione di biofilm batterici come di un processo di sviluppo, usando termini di solito applicati alla descrizione della crescita embrionale. Come un uovo fecondato dà origine a vari tipi cellulari durante lo sviluppo fetale, anche i batteri si differenziano quando si posano su una superficie. E sintetizzano molecole di comunicazione che ricordano i feromoni e gli ormoni degli insetti e dei vertebrati, per coordinare la costituzione di microcolonie in un'architettura sofisticata che consente l'ingresso delle sostanze nutritive e l'uscita di quelle di rifiuto, in modo simile al sistema circolatorio degli organismi superiori. In alcuni biofilm, batteri di molte specie cooperano nel digerire sostanze nutritive che un singolo tipo non potrebbe sfruttare. Queste osservazioni indicano che i batteri, a lungo considerati come rappresentanti fra i più umili dei viventi, potrebbero occupare nello schema della vita un rango più importante di quanto si sia mai immaginato.