

PROGRAMA CURSO POSGRADO

***Curso Avanzado
de Biofilms Microbianos***

PROF. DRA. MARÍA ALEJANDRA BOSCH

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

Parte Teórica (40 horas)

Unidad 1. Introducción a los biofilms microbianos

Definiciones de biofilms. ¿Dónde se encuentran? Acciones benéficas y perjudiciales asociadas a la formación de biofilms. Impacto del crecimiento adherido a superficies en salud, agricultura y medio ambiente. Requerimientos para la colonización y el desarrollo de biofilms. Biofilms uni- y multi-especie. Introducción a los modelos de estudio de biofilms. Análisis de los modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*. Grupos de trabajo en biofilms microbianos a nivel mundial.

Unidad 2. Crecimiento y desarrollo de los biofilms

Etapas del desarrollo de los biofilms desde la adhesión hasta la formación del biofilm maduro y dispersión. Variables que condicionan la adhesión y formación de biofilms. Cinética de formación de biofilms, comparación con cultivos planctónicos.

Unidad 3. Propiedades emergentes de la vida en biofilm – ventajas de vivir en un biofilm

Heterogeneidad espacial y temporal de los biofilms. Capacidad de vivir en condiciones oligotróficas. Capacidad de sobrevivir en diversos hábitats. Transferencia genética lateral en los biofilms. Resistencia a la fagocitosis. Tolerancia a la desecación. Bienes públicos “*Cheaters*”. Resistencia / tolerancia a los antimicrobianos. Señales de *quorum-sensing*. Virulencia. Estrategias reproductivas K y R. Multi-celularidad. Altruismo.

Unidad 4. Estrategias de control de los biofilms

Eradicación de los biofilms. Tolerancia / Resistencia/Persistencia. Mecanismos de tolerancia y resistencia. Inhibición de la formación de biofilms a diferentes niveles (adhesión, ruptura de la comunicación celular bacteriana –*quorum sensing*, erradicación de biofilms maduros). Nuevas estrategias para la prevención y/o erradicación de biofilms. Erradicación de biofilms en la industria (métodos físicos, limpieza y desinfección, control con reactivos químicos, control biológico y estrategias verdes). Terapias anti-virulencia. Empleo de plasma de gases para la erradicación de biofilms. Investigación de nuevos compuestos. Creación de materiales con superficies anti-infectivas.

Unidad 5. Técnicas de cultivo y estudio de biofilms microbianos

Sistemas de cultivo. Reactores estáticos, en columnas empacadas, tanques agitados con cupones, cámaras de flujo continuo (dispositivos de Robbins, celdas de flujo, reactores de flujo de goteo). Cultivos en macro y micro-escala. Micro-fluídica.

Técnicas microscópicas y analíticas aplicadas al estudio estructural y químico de los biofilms. Técnicas microbiológicas tradicionales. Técnicas microscópicas: Microscopía de barrido (SEM), Microscopía de transmisión (TEM), Microscopía de Fluorescencia (NF), Microscopía de barrido Laser Confocal (CSLM). Coloraciones con colorantes y sondas fluorescentes. Coloraciones de viabilidad y metabolismo. Microscopía de fuerza atómica. Técnicas moleculares y OMICAS aplicadas al estudio de los biofilms. Técnicas espectroscópicas.

Unidad 6. Biofilms naturales y en el entorno industrial

Consorcios naturales y del entorno industrial que actúan como beneficiosos o patógenos. Biofilms mixtos. Organización y cooperación entre distintos integrantes de biofilms. Biofilms electrogénicos. Capacidad de formación de biofilms en bacterias del suelo. Tratamiento de aguas, biorremediación, lixiviación, corrosión.

Unidad 7. Biofilms en salud y en enfermedad

Biofilms en la infección crónica. Características generales de las infecciones por biofilm: otitis, conjuntivitis, infecciones pulmonares crónicas, fibrosis quística, infecciones sobre quemaduras, caries dentales, infecciones urinarias. Biofilms sobre equipamiento hospitalario: equipos de hemodiálisis, respiradores artificiales, *stents*, etc.

Trabajos Prácticos (40 horas)

Trabajo Práctico 1: Desarrollo y estudio de biofilms microbianos.

Parte 1: Desarrollo de biofilms en diferentes sistemas de cultivo

Parte 2: Evaluación de biomasa

Parte 3 y 4: Monitoreo del desarrollo del biofilm por métodos microscópicos y espectroscópicos

Presentación de diferentes sistemas de cultivo para obtener biofilms uni y multi especie: desarrollo de cultivos estáticos y bajo flujo continuo y semi-continuo de nutrientes de organismos asociados al ambiente y salud. Empleo de placas multi-pocillo, cámaras de cultivo operadas en forma batch, con flujo continuo y semi-continuo de nutrientes bajo diferentes condiciones de *shear*. Empleo de cámaras diseñadas para el estudio de micro-flúidos. Análisis de los biofilms a nivel de la micro-escala.

Evaluación de biomasa empleando cristal violeta, indicadores metabólicos y colorantes fluorescentes (DAPI y naranja de acridina).

Estudios estructurales y químicos de los biofilms producidos en los diferentes sistemas por métodos destructivos y no destructivos. Aplicación de técnicas microscópicas para determinar arquitectura de biofilms, microscopía láser confocal, fluorescencia. Empleo de software COMSTAT, IMARIS para análisis de imágenes.

Esta actividad se lleva a cabo en no menos de 5 clases de trabajos prácticos. Se utilizará el Aula de Macromoléculas del Fomec de nuestra Facultad, el microscopio confocal perteneciente al consorcio de la Facultad de Ciencias Exactas y la sala de Informática del Edificio Abuelas.

Trabajo Práctico 2: Evaluación de resistencia, tolerancia y persistencia. Erradicación de biofilms.

Ensayo de resistencia de diferentes cepas a distintos antimicrobianos mediante concentración inhibitoria mínima de células planctónicas y biofilms (CIM y CIMB). Comparación del poder bactericida de los antimicrobianos de uso en la clínica con nuevas drogas o productos naturales. Medida de tolerancia a antimicrobianos Evaluación de persistores en biofilms de 24h empleando concentración 4 y 128 veces la CIM. Evaluación de la erradicación de un biofilm de *P. aeruginosa* de 48 horas empleando plasma de gases.

Taller: Trabajo final integrador

Los alumnos elaboran durante el período de la cursada, de manera grupal o individual con el apoyo del cuerpo docente (se designa un tutor por grupo), una propuesta de investigación sobre un tema a elección de los alumnos, que deberá contener antecedentes, objetivos, metodología a emplear, resultados esperados. Este trabajo es evaluado por sus pares y luego presentado en forma oral y escrita por los alumnos en el mes de julio.

Evaluación

Los alumnos son evaluados a través del desempeño general mostrado durante las distintas actividades que propone el curso, el desempeño en particular en el taller grupal y a través de una evaluación teórico-práctica final.

Formas de dictado de la Asignatura

El programa detallado corresponde a la cursada teórico-práctica 100 % presencial. El material correspondiente (clases teóricas, trabajos prácticos, videos, actividades se encuentra Aulas Web de Universidad Nacional de La Plata).

Bibliografía

- Azeredo, Joana, Nuno F. Azevedo, Romain Briandet, Nuno Cerca, Tom Coenye, Ana Rita Costa, Mickaël Desvaux, Giovanni Di Bonaventura, Michel Hébraud, Zoran Jaglic, Miroslava Kačaniová, Susanne Knøchel, Anália Lourenço, Filipe Mergulhão, Rikke Louise Meyer, George Nychas, Manuel Simões, Odile Tresse & Claus Sternberg. 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. 43: 3, 313–351.
- Bjarnsholt, Thomas. 2020. Biofilm and infection recognition and management in the context of antimicrobial stewardship. World Union of Wound Healing Societies. London: Wounds International. www.woundsinternational.com
- Bjarnsholt Thomas. 2013. The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *APMIS Acta Pathologica, Microbiologica and Immunologica Scandinavica*. APMIS 121: 136 pp 1–51.
- Bjarnsholt, Thomas, Maria Alhede, Morten Alhede Steffen R. Eickhardt-Sørensen, Claus Moser, Michael Ku" Peter Østrup Jensen, and Niels Højby. 2013. Trends in Microbiology, Vol. 21, No. 9 pp 466-474.
- Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann D. and Yantorno, O. 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 736-747.
- Cattelan, Natalia, Osvaldo Miguel Yantorno, and Rajendar Deora. 2018. Structural Analysis of *Bordetella pertussis* Biofilms by Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioProtoc*. 05; 8, 15.
- Chuan Hao Tan, et al 2017 All together now: experimental multispecies biofilms model systems *Environmental Microbiology* 19(1), 42–53.
- Ciofu, Oana Eestrella Rojo-Molinero, Macia, and Antonio Oliver. 2017. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS* 125: 304–319.
- Ciofu, Oana and Tim Tolker-Nielsen. 2019. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.* 10: 913.
- Coenye, Tom; Hans J. Nelis. 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 83: pp. 89–105.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 21;284 (5418):1318-22.
- Dang H., and C. R. Lovell, "Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 80, no. 1, p. 91, 2016.
- Davey, M. E. and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 847-867.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Figoli, C, M. Stämmler, B. León, C. Schaudinn; A. Bosch, M. Laue, P. Lasch. Vibrational Micro- and Nanospectroscopy of *Burkholderia contaminans* Biofilms. Trabajo presentado en el XXII International Conference on Organic Synthesis (22-ICOS) junio 2018.
- Flemming Hans-Curt, and Jost Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology* 8: pp 623-634.
- Flemming, Hans-Curt, Jost Wingender, Ulrich Szewzyk, Peter Steinberg, Scott A. Rice and Staffan Kjelleberg. 2016 Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14: pp. 563-75.

Flemming, Hans-Curt and S. Wuertz, "Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 4, pp. 247–260, **2019**.

Goeres, Darla M, Martin A Hamilton, Nicholas A Beck, Kelli Buckingham-Meyer, Jackie D Hilyard, Linda R Loetterle, Lindsey A Lorenz, Diane K Walker & Philip S Stewart. 2009. Method for growing a biofilm under low shear at the air–liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols* 4: 5, pp 783-789.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:95–108.

Heijne A. ter, M.A. Pereira, J. Pereira, and T. Sleutels. 2020. Electron Storage in Electroactive Biofilms. *Trends in Biotechnology*, 55: pp 1-9.

Henriette L. Røder,1 Søren J. Sørensen,1 and Mette Burmølle. 2016. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology*, Vol. 24, No. 6 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, et al. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146(Pt 10): 2395–2407.

Højby, Niels, Oana Ciofu, Helle Krogh Johansen, Zhi-jun Song, Claus Moser, Peter Østrup Jensen, Søren Molin, Michael Givskov, Tim Tolker-Nielsen, Thomas Bjarnsholt. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3: 55-65.

Højby, N, T. Bjarnsholt, C. Moser, G. L. Bassi, T. Coenye, G. Donelli, L. Hall-Stoodley, V. Holá, C. Imbert, K. Kirketerp-Møller, D. Lebeaux, A. Oliver, A. J. Ullmann and C. Williams. **ESCMID Study Group for Biofilms**. 2014. Guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. *ESCMID European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31.e1–1.e25.

Ibberson, Carolyn B. and Marvin Whiteley. 2020. The social life of microbes in chronic infection. *Current Opinion in Microbiology* 2020, 53:44–50.

Jonkman, James, Claire M. Brown, Graham D. Wright, Kurt I. Anderson and Alison J. North. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. 2020. *Nature Protocols*. s41596-020-0313-9.pp.1-27.

Junghyun Kim 1, Hee-Deung Park, and Seok Chung. 2012. Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation *Molecules*, 17, 9818-9834; oi:10.3390/molecules17089818.

Karygianni, L., Z. Ren, H. Koo, and T. Thurnheer 2020. "Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities," *Trends in Microbiology*,.

Luyan Ma, Matthew Conover, Haiping Lu, Matthew R. Parsek, Kenneth Bayles, Daniel J. Wozniak. 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathogens* 5: 3 e1000354.

Macia M. D., E. Rojo-Molinero and A. Oliver. 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 981–990.

Muhammad MH et al., 2020 "Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, p. 928.

Naumann D. 2001. FT-infrared and FT-Raman Spectroscopy in biomedical research., p. 323–377. In I.H.-U.G. and B. Yang (ed.), New York, NY.

Nunes Laura, Silva, Karine Rigon Zimmer, Alexandre José Macedo, and Danielle Silva Trenti. 2016. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem. Rev.*, 116, 9162–9236.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.

Palmer, R. J. Jr., Janus A. J. Haagensen, Thomas R. Neu, and Claus Sternberg. 2006. Confocal Microscopy of Biofilms — Spatiotemporal Approaches. *Handbook of Biological Confocal*

Microscopy, second edition, edited by James B. Pawley, Springer Science Business Media, New York. pp.882-902.

Schultz Gregory, Thomas Bjarnsholt, Garth A. James; David J. Leaper, Andrew J. McBain, Matthew Malone, Paul Stoodley, Theresa Wanson. 2017. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Rep Reg* 25: 744–757.

Secora, Patrick R., Lia A. Michaela, Anina Ratjena, Laura K. Jenningsa, and Pradeep K. Singha. 2018. Entropically driven aggregation of bacteria by host polymers promotes antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* pnas.1806005115. pp 1-6.

Serra, Alejandra Bosch, Daniela Russo, María E. Rodríguez, Ángeles Zorreguieta, Juergen Schmitt, Dieter Naumann and Osvaldo Yantorno. 2007. Continuous non-destructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by spectroscopy and other corroborative techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1759-1767.

Serra D., Luecking G., Weiland F., Schulz S., Görg A., Yantorno O. M., Ehling-Schulz M. 2008. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*. 8, 23-24: 4995-5010.

Simoës, Manuel, Simoës Lucía, Maria J. Vieira. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43: 573–583.

Tatsaporn T. and K. Kornkanokm. 2020. "Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens," *Biotechnology Reports*, vol. 26, p. e00477,

Wille, Jasper and Tom Coenye. 2020. Biofilm dispersion: the key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilms*. [/doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027](https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027).

Watnick Paula and Roberto Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*. 182: 10, pp 2675–2679.

Yuan Lei, Mads Frederik Hansen, Henriette Lyng Røder, Ni Wang, Mette Burmølle & Guoqing. 2019. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790 pp1-18.