novomar

New uses of the sea

Biofilmes: conceito e problemática

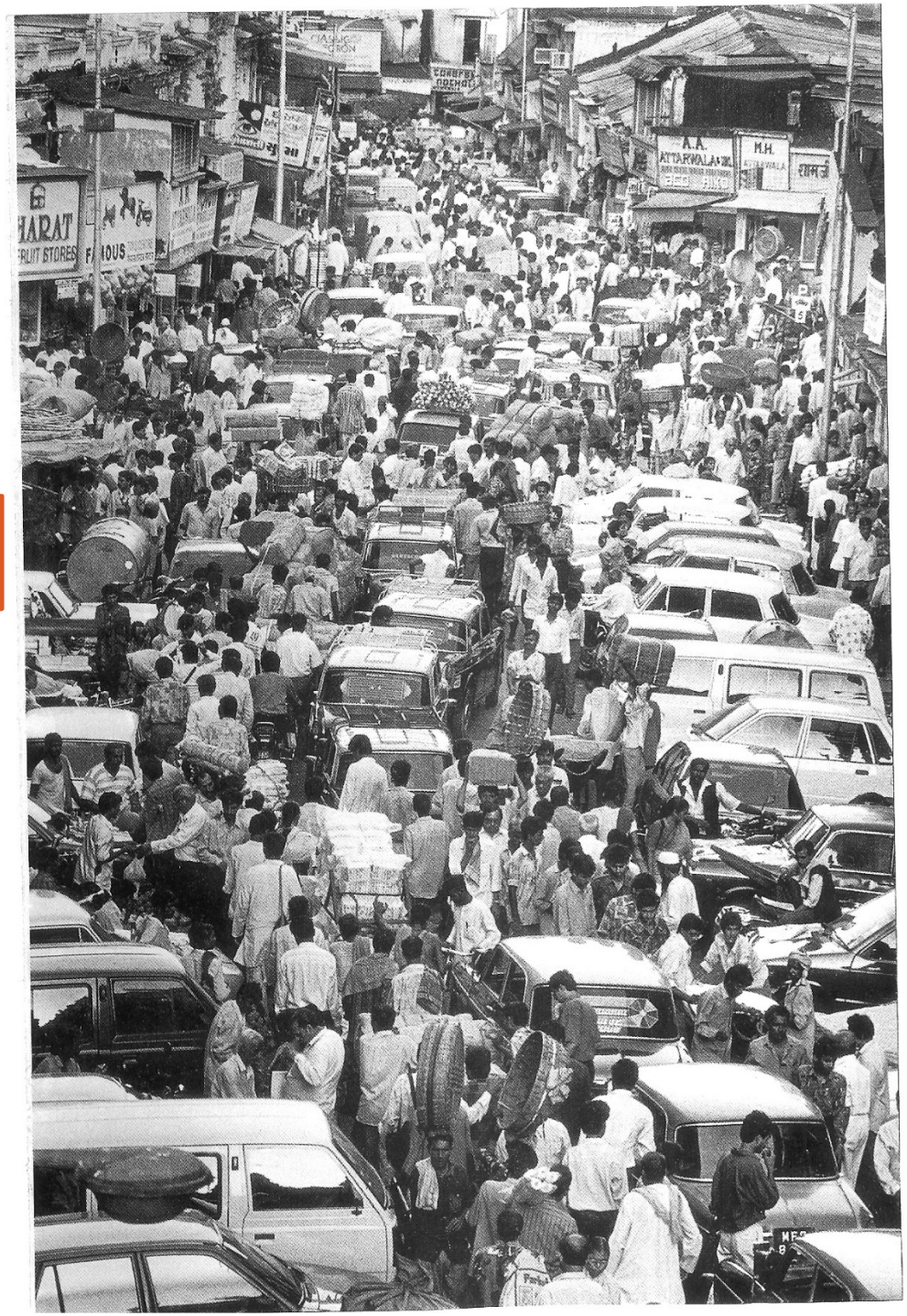
Luis Melo
University of Porto
Faculty of Engineering

PROGRAMA
COOPERACIÓN TRANSFRONTERIZA
ESPAÑA ~ PORTUGAL
COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRIÇA
2007 – 2013

Unión Europea
FEDER
Invertimos en su futuro

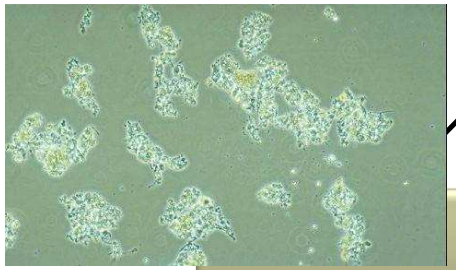
MICRÓBIOS E HUMANOS

Seres humanos:
Vida em comunidade



Mais de 90% dos micróbios vivem em COMUNIDADES

Agregados Microbianos



Flocos

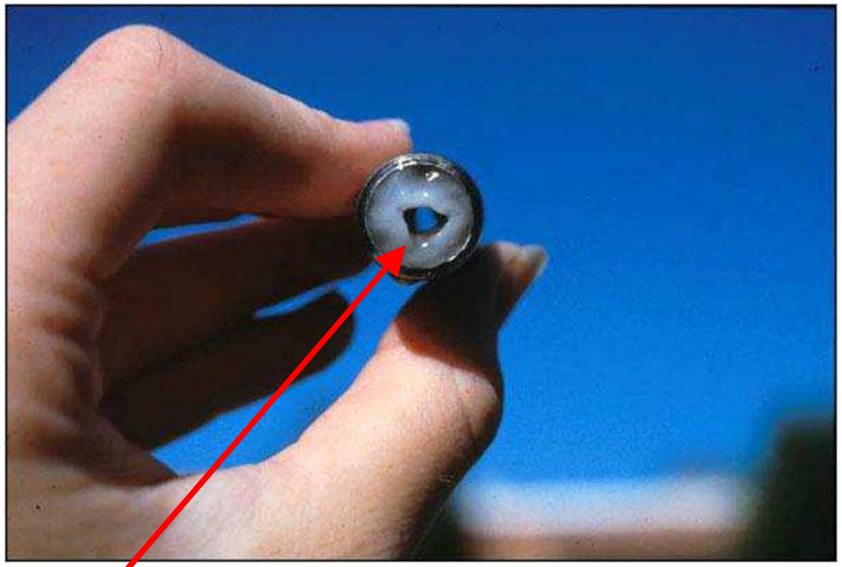
Grânulos

Biofilmes

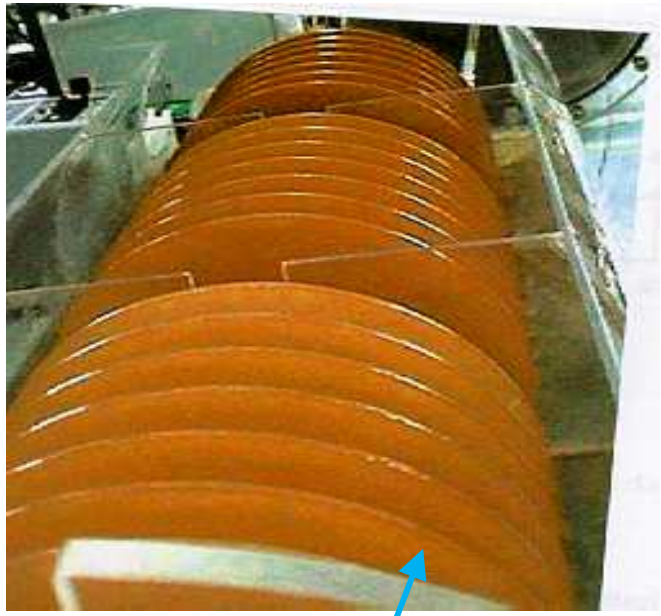
Agregados suspensos NÃO ADERIDOS a superfícies

Películas biológicas formadas por microrganismos ADERIDOS a superfícies

BIOFILMES : qual o seu aspecto externo ?



Biofilme, uma matriz gelatinosa



Biofilme num reator de discos biológicos

DEFINIÇÃO:

Biofilme (Filme microbiano)

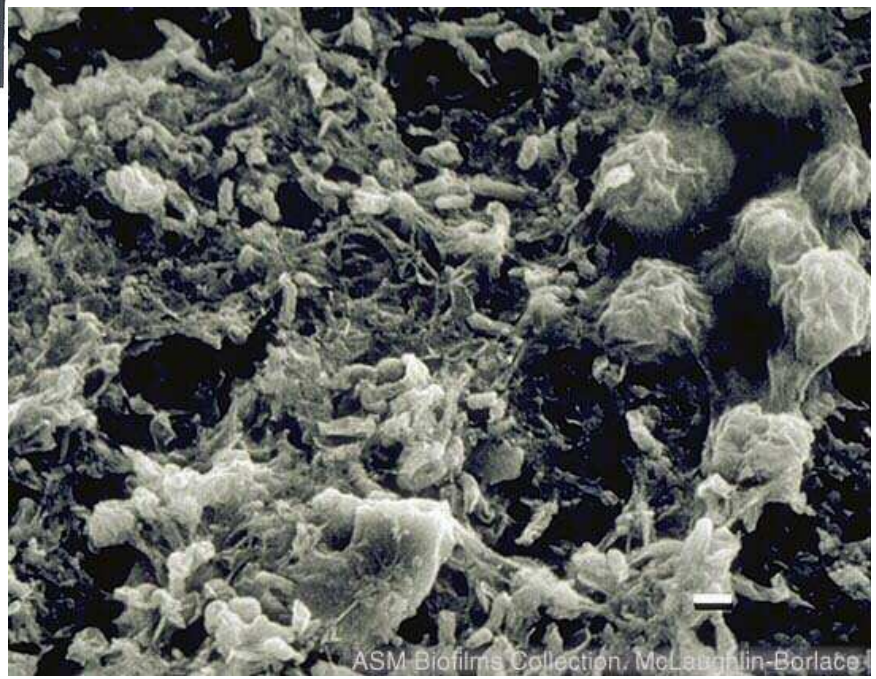
COMUNIDADE DE MICRORGANISMOS aderida a uma SUPERFÍCIE, em geral sob a forma de uma MATRIZ MUITO HIDRATADA de POLÍMEROS EXTRACELULARES (E.P.S.) produzida pelos microrganismos.

- **Consistência gelatinosa, vico-elástico**
- **Cor: branco/amarelo transparente, castanho, etc**
-
- **Espessura: de 5 micron a 5 mm**
- **Composição:**
  - ***Água: 90-99% (peso)***
  - ***Microrganismos: 1-10% (volume)***
  - ***Polímeros extracelulares: 70-95% do peso seco do biofilme***
  - ***Parttículas sólidas capturadas do líquido***

BIOFILMES : qual o seu aspecto interno ?

Biofilme de *Ps. fluorescens* sobre uma superfície metálica

Imagem microscópica de uma lente de contacto contaminada



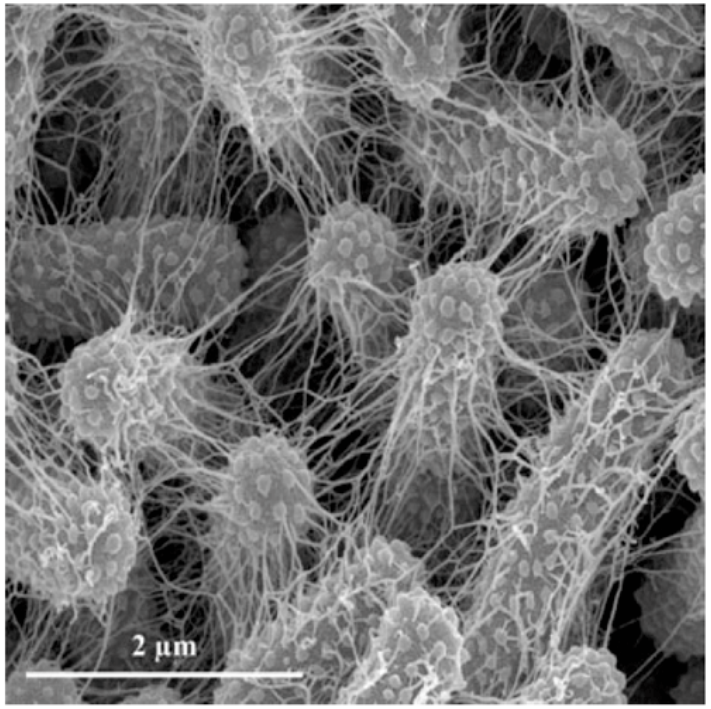
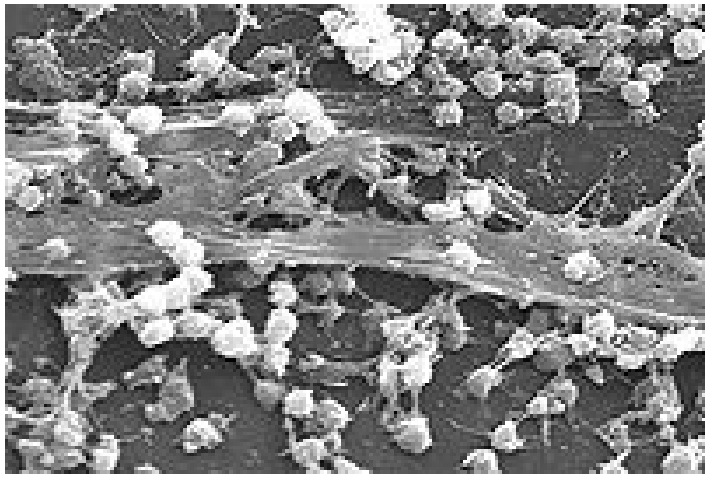


Fig. 6. Thin threads emerged from bacterial body surface. Scanning electron microscopy of sessile *K. pneumoniae* LM21 performed in mature biofilm formed on Thermanox® slides in microfermentor system after 48 h of development at X20,000 magnification.

Biofilme de *Klebsiella pneumoniae*



***Biofilme de Staphylococcus aureus* num catéter**

Director: Sergio Leone
Musica: Ennio Morricone

BIOFOULING

"The good, ...

... the bad ...

... and the ugly"

Biofilmes:

-Equilíbrio microbiano no corpo humano

- Biofilmes nos reactores de tratamento de águas residuais

Biofilmes:

- Central Térmica de Produção de Electricidade

-Membranas de Osmose Inversa

-Cascos de navios

Biofilmes:

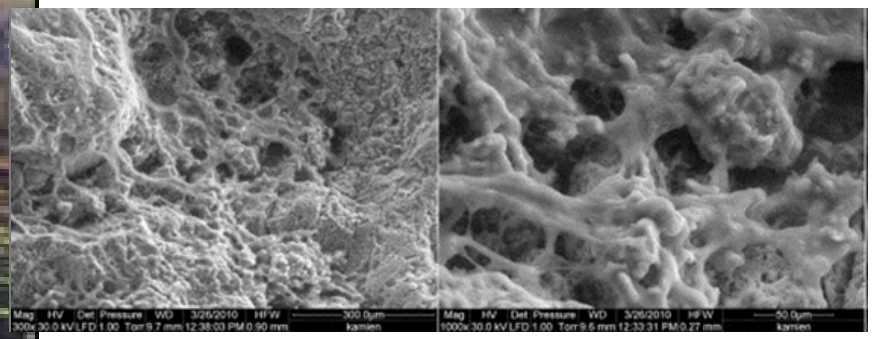
- Pulmões

- Catéteres

- Hospitais

Biofilmes :

A “CIDADE dos micróbios”



(Watnick and Kolter, J. Bacter., 2000)

DINÂMICA DOS BIOFILMES

Crescimento dos Biofilmes (*Mycobacterium fortuitum)*

Dia 1 | Dia 3 | Dia 6

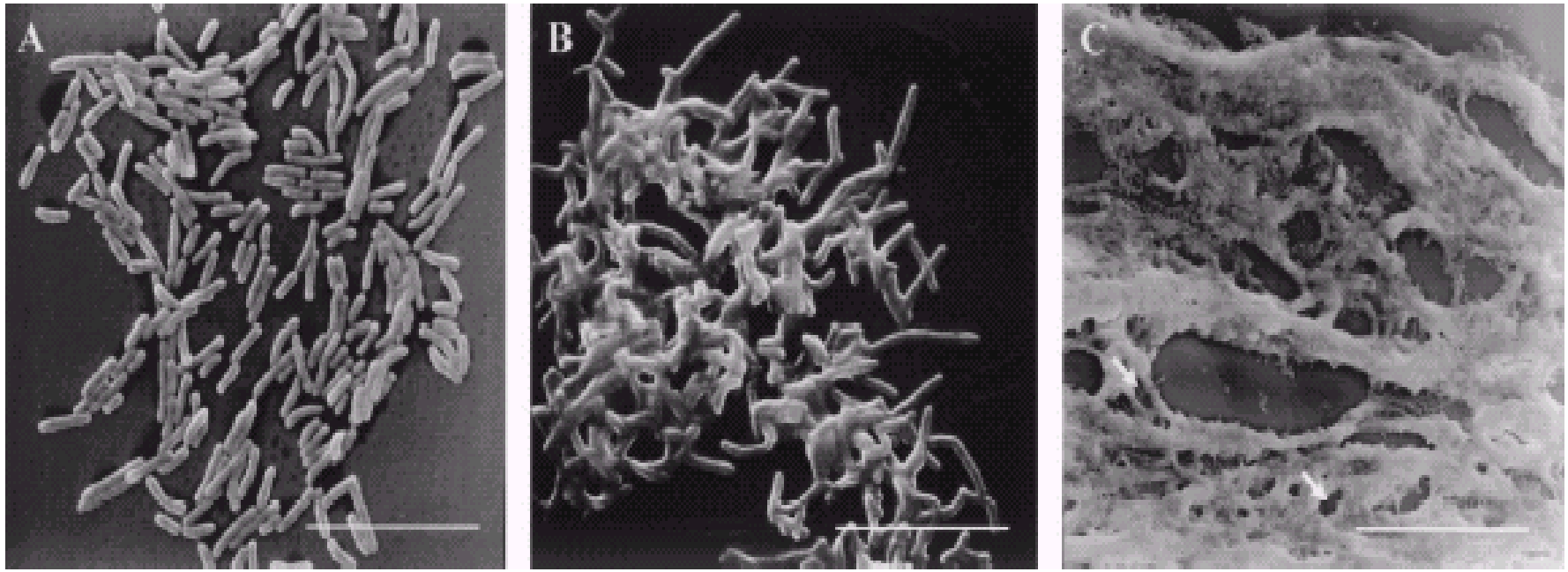
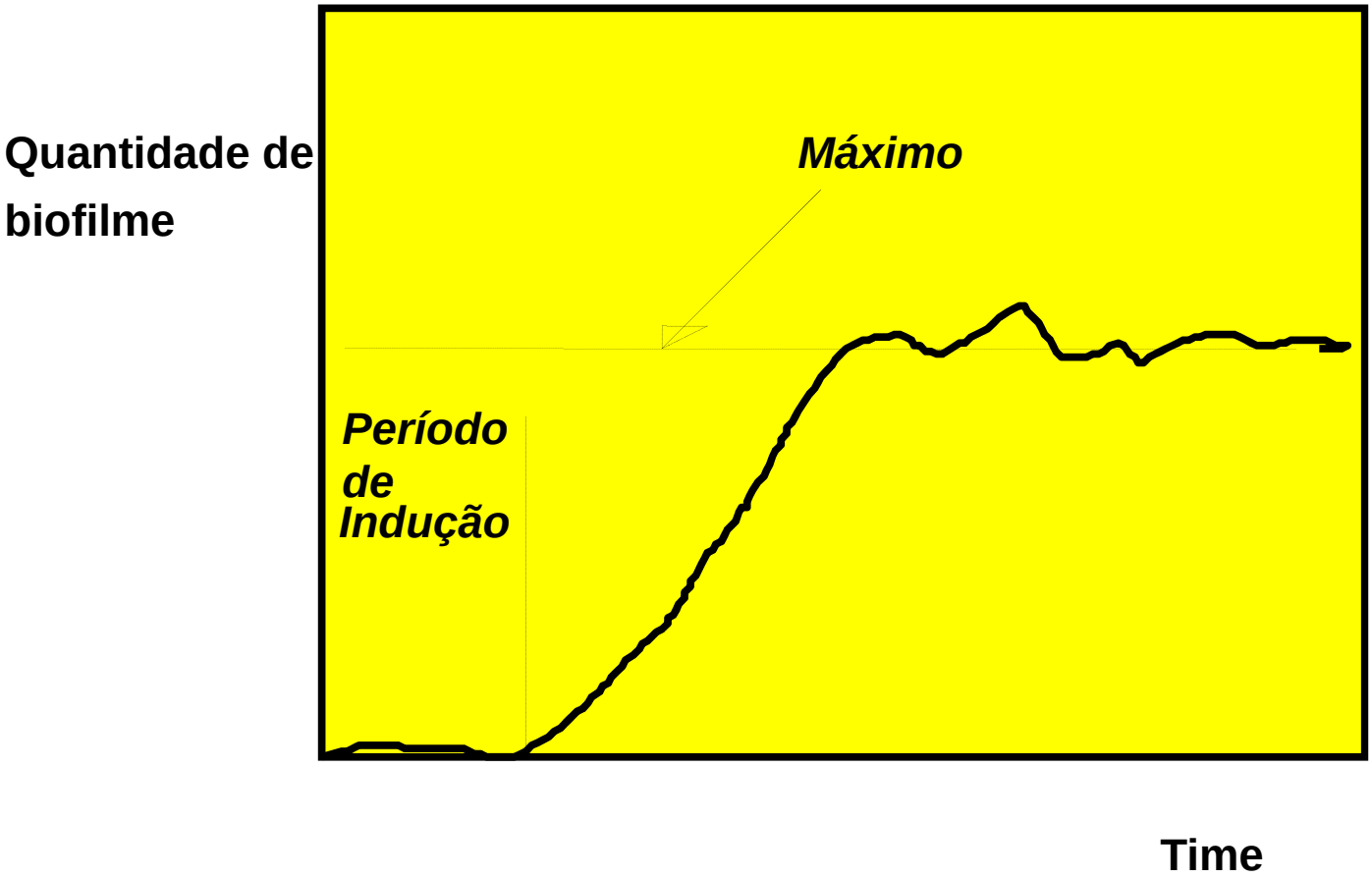


Fig. 2. SEM of *M. fortuitum* 6854 growing on a peg in MB supplemented with ADC enrichment after day 1 (A), day 3 (B), and day 6 (C). Initial adhesion can be seen in A, and different filamentous strands with visible EPS are shown in B. Shown in C is extensive biofilm with channels (arrows). (Scale bars = 5 µm for A and B, and 50 µm for C.)

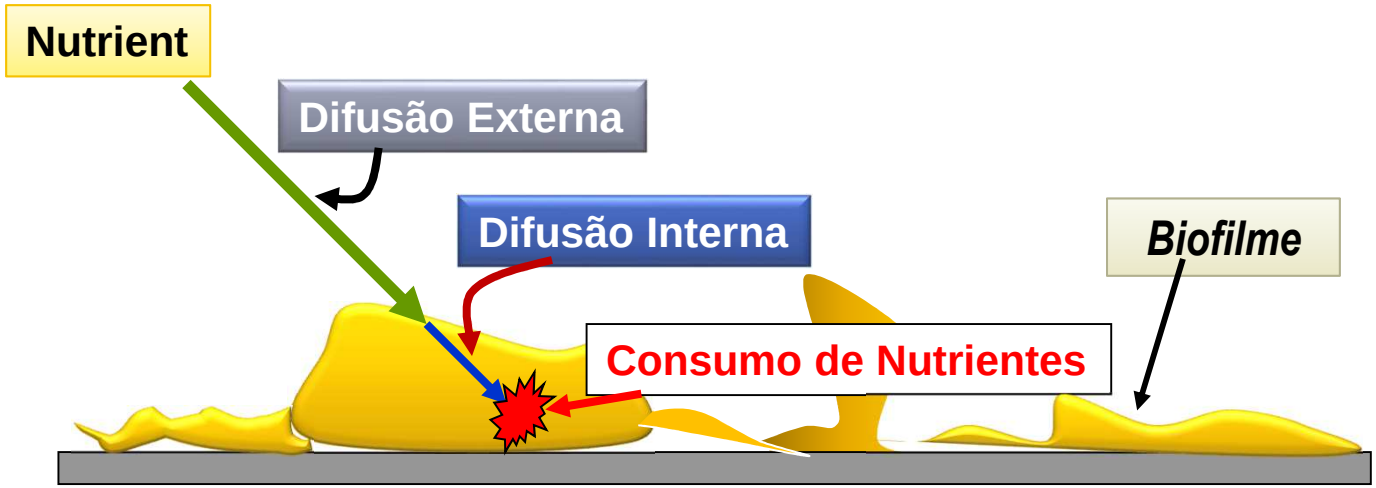
(Bardouniotis,E. *et al.*, 2003)

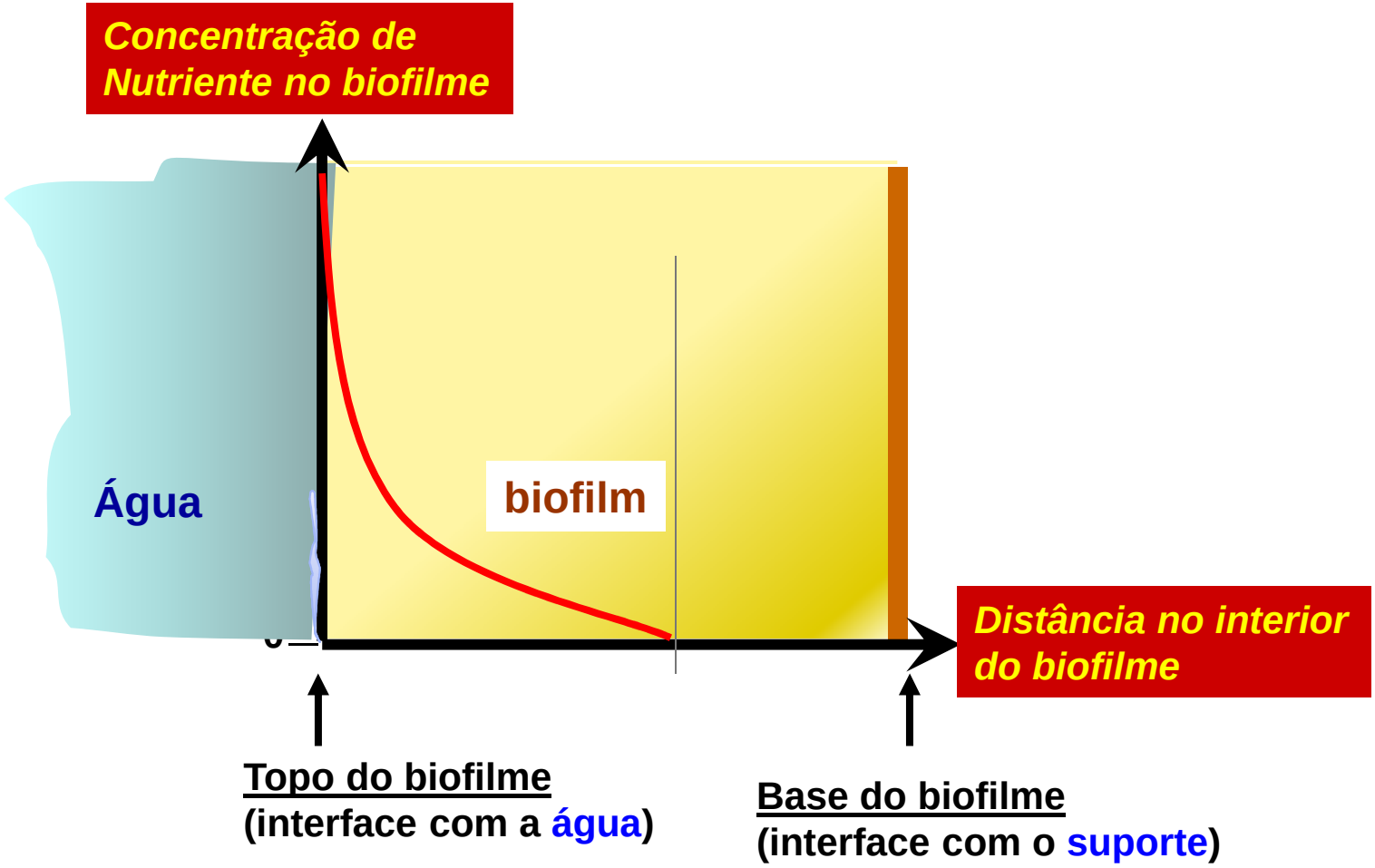
Crescimento dos Biofilmes ao longo do tempo



Transferência de Massa e Reação Bioquímica

Mecanismos de utilização de nutrientes pelos biofilmes

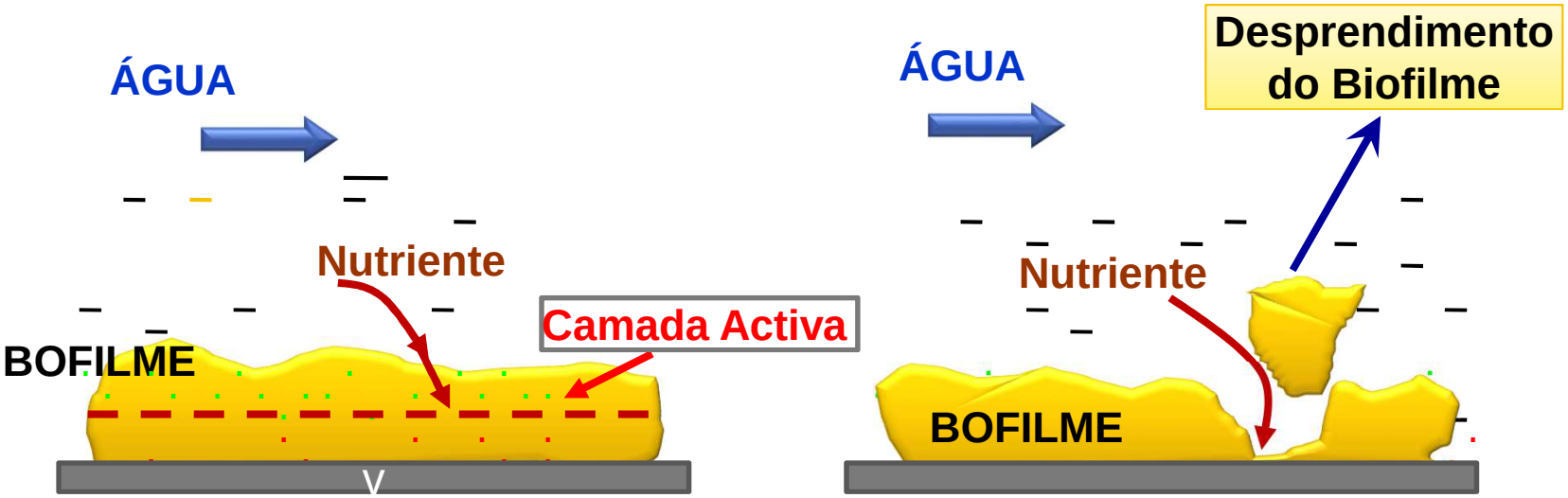




A penetração parcial pode ocorrer com:

- ❑ **nutrientes;**
- ❑ **antibióticos**
- ❑ **biocidas, etc**

EXEMPLO DE DESPRENDIMENTO DO BIOFILME



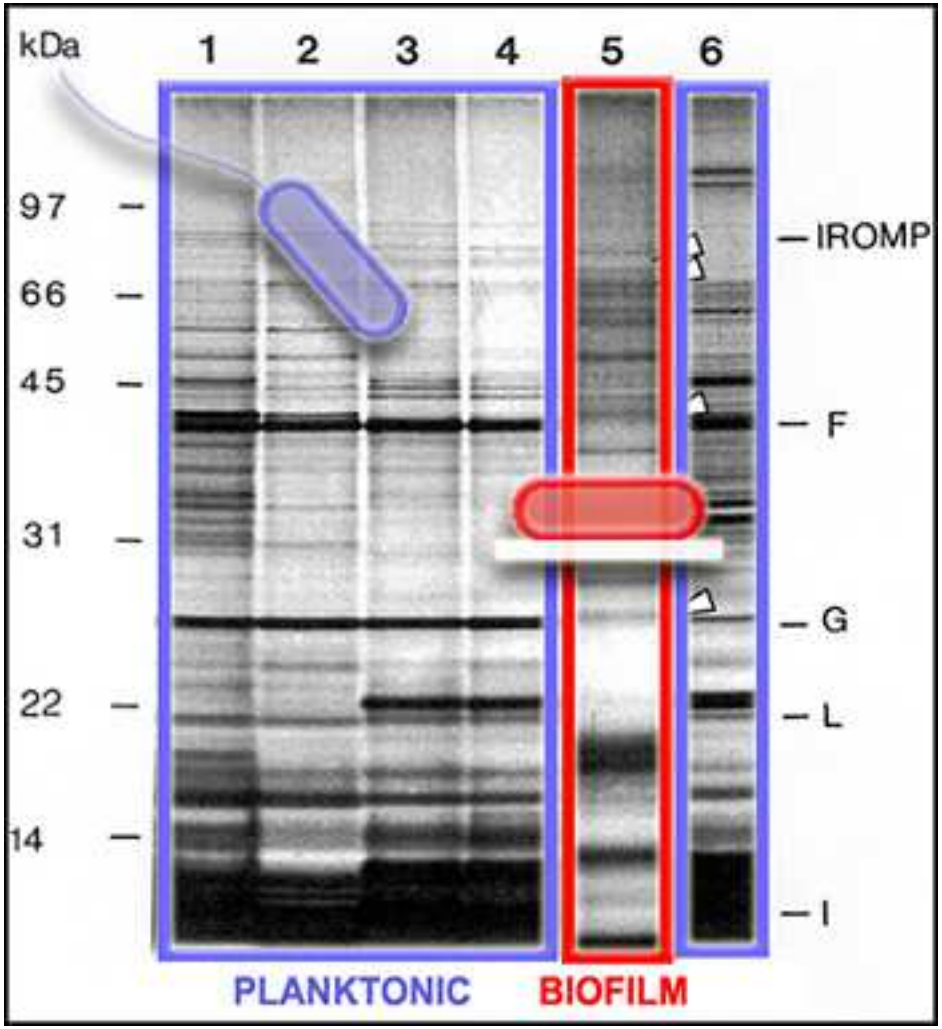
AS VANTAGENS DA ADESÃO
E
DA VIDA EM COMUNIDADE

Efeitos da Adesão

EXEMPLO: **USO DE ÁCIDO HIPOCLOROSO NA DESACTIVAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae***

	Bactérias em Suspensão	***Bactérias Aderidas a Vidro***
Dose ***(concentr. x tempo)*** **Necessária para desactivar 99 % das bactérias**	**0.065**	**9.5** ***(150 vezes superior !)***

Efeitos da Adesão



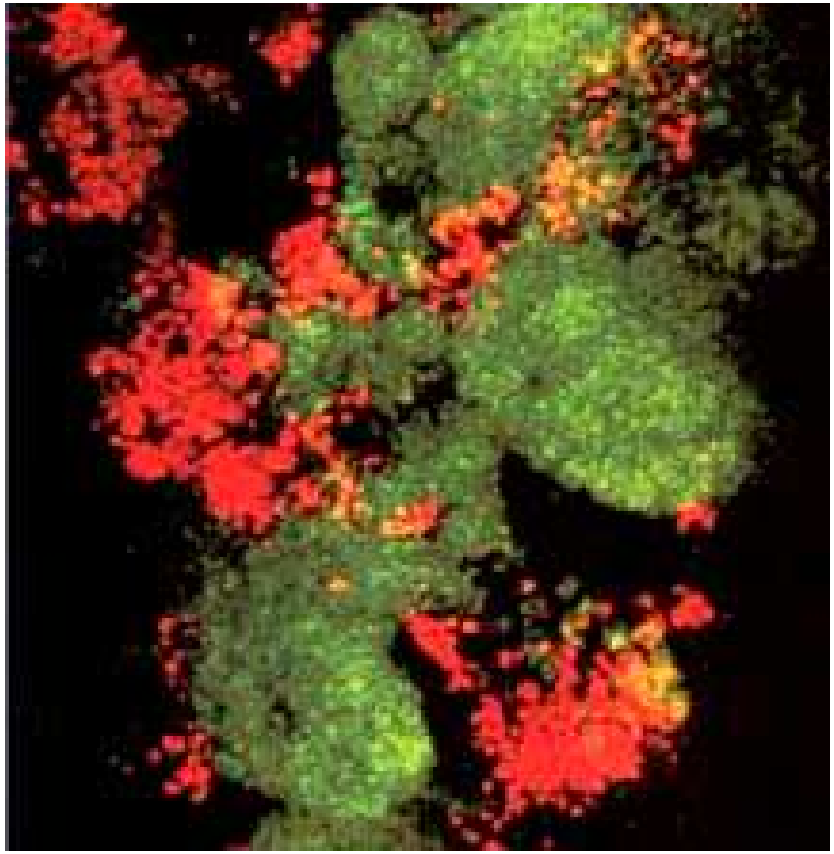
Expressão genética de proteínas in bactérias suspensas e em bactérias aderidas(*Pseud. aeruginosa*)

Center for Biofilm Engineering, Montana, USA

Vida em comunidade

Efeitos da Vida em Comunidade

Distâncias mais curtas: comunicação mais fácil



Oxidantes de amónia – verdes:

$NH_4^+ \dashrightarrow NO_2^-$

Oxidantes de nitrito – vermelho:

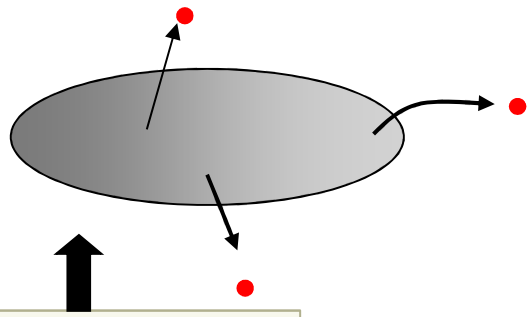
$NO_2^- \dashrightarrow NO_3^-$

Imagem CSLM, por:
Schramm et al (1996), *Applied Environmental Microbiology*, 62:4641.

Center for Biofilm Engineering, Montana, USA

Efeitos da Vida em Comunidade

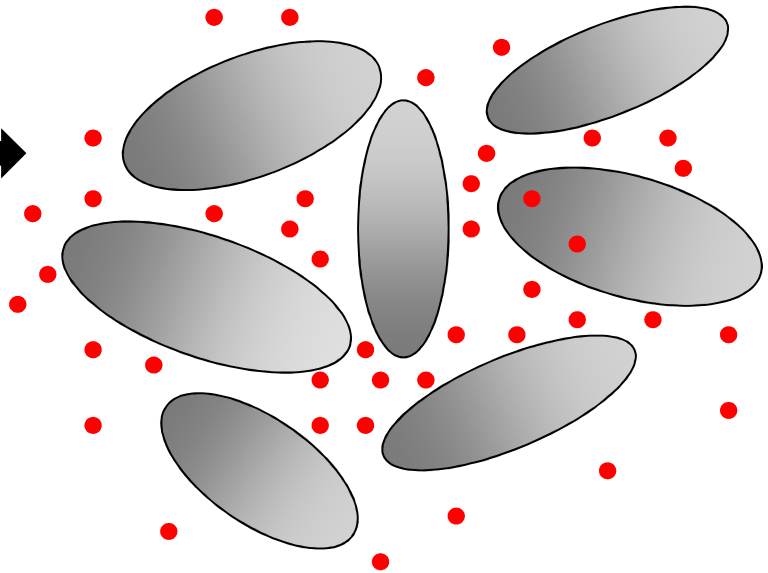
Comunicação Intercelular
(“*quorum sensing*”)



Bactéria isolada

Moléculas sinalizadoras
acyl-homoserine lactonas
(bactérias Gram-negativas)
ou péptidos modificados
(bactérias Gram-positivas)

Bactérias num biofilme



As bactérias produzem pequenas quantidades de moléculas sinalizadoras que são detectadas por outras bactérias pertencentes ao agregado microbiano.

Pseudomonas aeruginosa na fibrose quística dos pulmões

Efeitos do "*quorum sensing*"

***Ps. aeruginosa* começa a produzir grandes quantidades de polímeros (alginato) quando "sente" que existe um número de significativo de bactérias "irmãs" nos pulmões.**

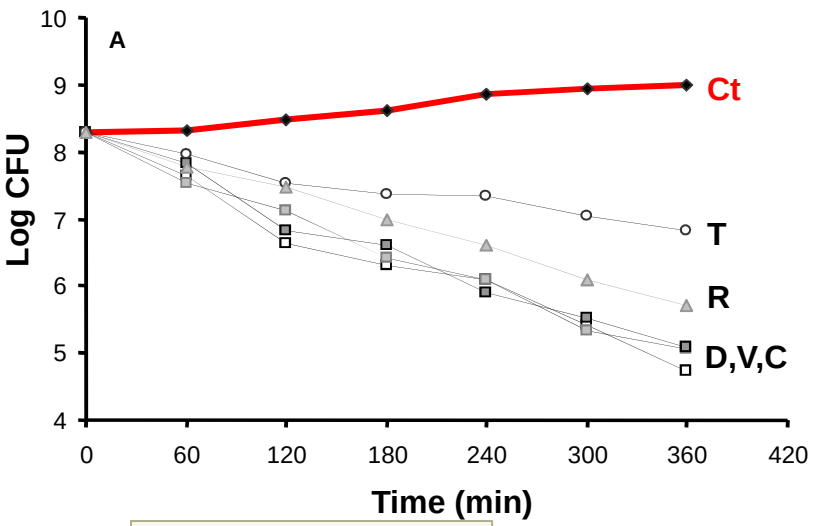
Observ: .: Os doentes com fibrose quística não produzem enzimas em quantidade suficiente para degrader os polímeros microbianos nos pulmões.

Biofilmes e Antibióticos

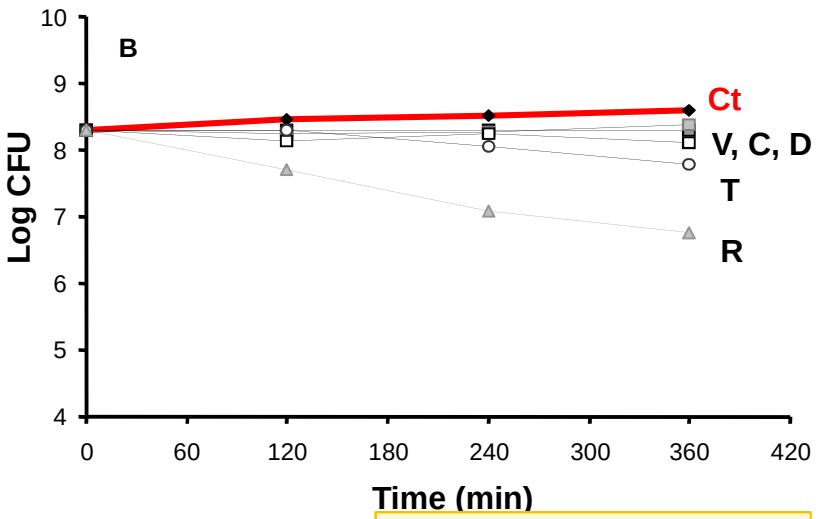
- O acesso de antibióticos às bactérias nos biofilmes pode ser limitado por limitações difusionais.
- As bactérias que produzem a enzima beta-lactamase aumentam esta produção como resposta ao tratamento por antibióticos.
- A enzima acumula-se na matriz do biofilme e, deste modo, destrói a ação do antibiótico.

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

– CÉLULAS SUSPENSAS *versus* EM BIOFILME



Células em Suspensão



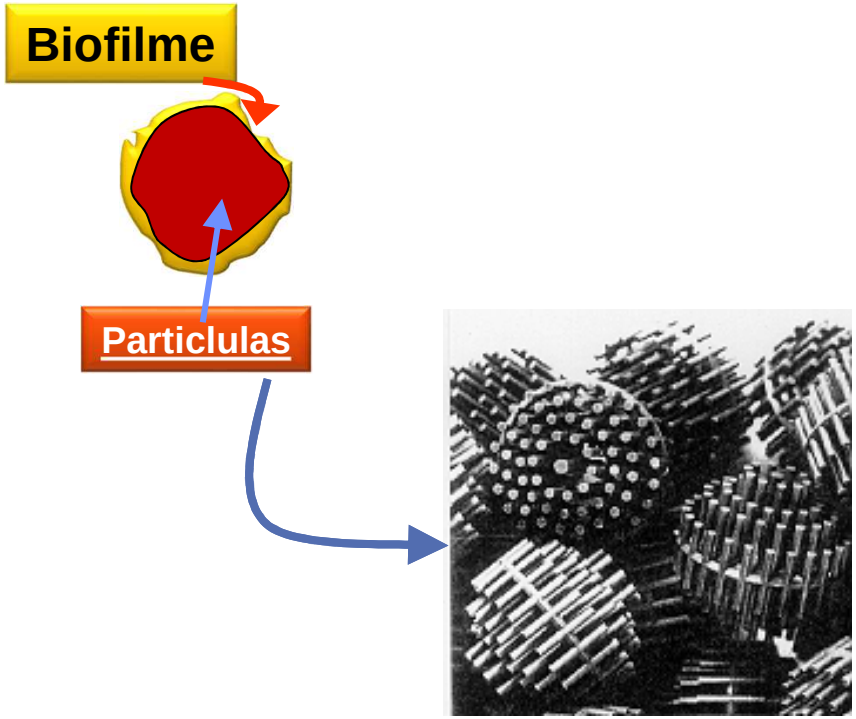
Células em Biofilmes

- **Ct** ***control, SEM antibiotics***
- **C** **cefazolina**
- **V** **vancomicina**
- **D** **dicloxacillina**
- **T** **tetraciclina**
- **R** **rifampicina**

(J. Azeredo, M. Henriques, Univ. Minho)

BIOFILMES SIMPÁTICOS...

Nos Reactores de Tratamento de Efluentes, os biofilmes estão em geral fixados em suportes sólidos:

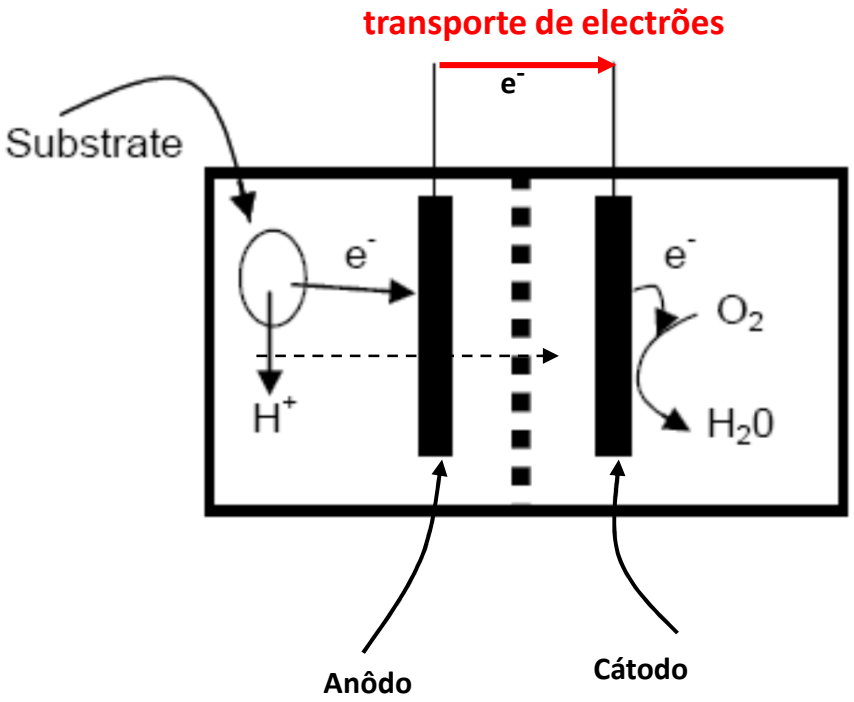


Ncollela et al., Trends in Biotechnology, 2000

Biofilmes e Energia – Células de Combustível Microbiano

Consumo de açúcar por microrganismos em condições anaeróbias:

$C_{12}H_{22}O_{11} + 13H_2O \text{ ---> } 12CO_2 + 48H^+ + 48e^-$



Célula de Combustível Microbiano com duas câmaras

BIOFILMES INDESEJÁVEIS ...

Equipamento afectado por Biofilmes Indesejáveis

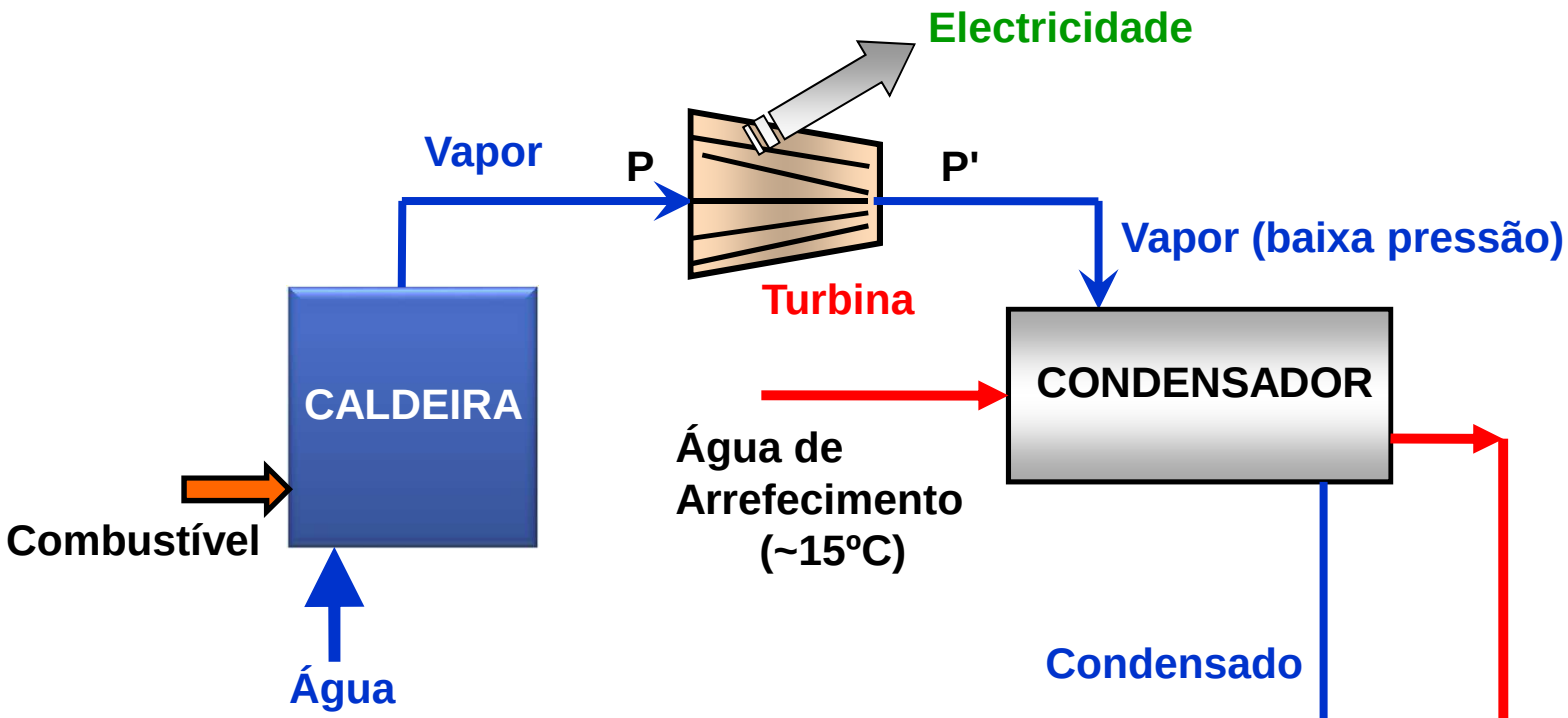
- Permutadores de Calor
- Torres de Arrefecimento de Água
- Sistema de Transporte de Liquidos (Tubos, Válvulas, etc.)
- Membranas de Osmose Inversa
- Bioreactores, Agitadores, sondas de pH probes, sensors deTemperatura, etc.

Em alguns casos:

- Corrosão provocada por Microrganismos

BIOFOULING

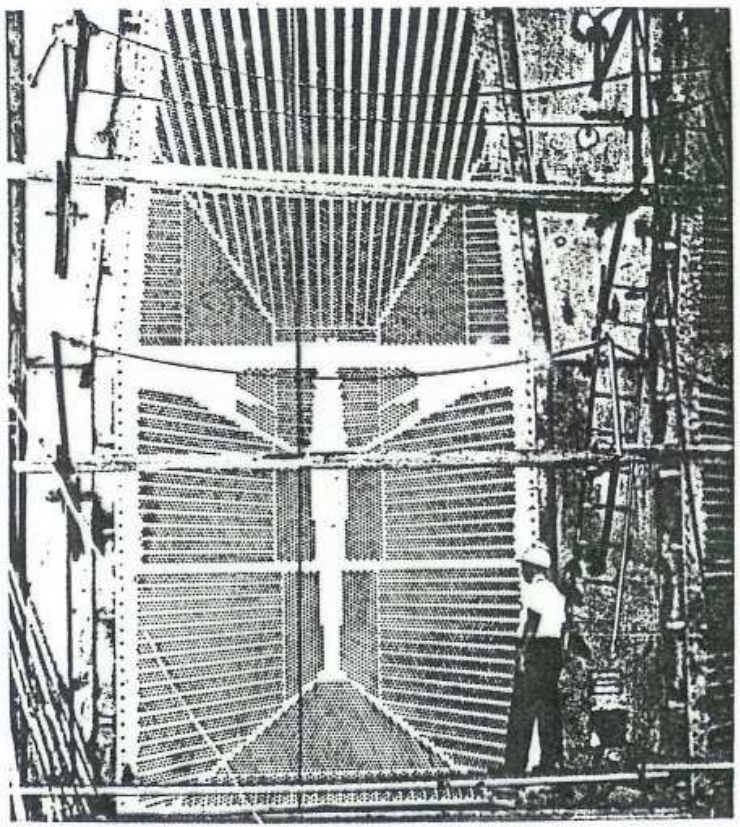
CENTRAL DE PRODUÇÃO DE ENERGIA



<u>O Biofouling no condensador</u> causa:
a) redução da taxa de condensação
b) aumento da pressão P'
c) redução da eficiência da turbina
e:
d) Biocorrosão

Central de Produção de Energia

CONDENSADOR



BIOFILME DE 100 micron (0.1 mm) de ESPESSURA

33% REDUÇÃO NA CAPACIDADE DE CONDENSAÇÃO

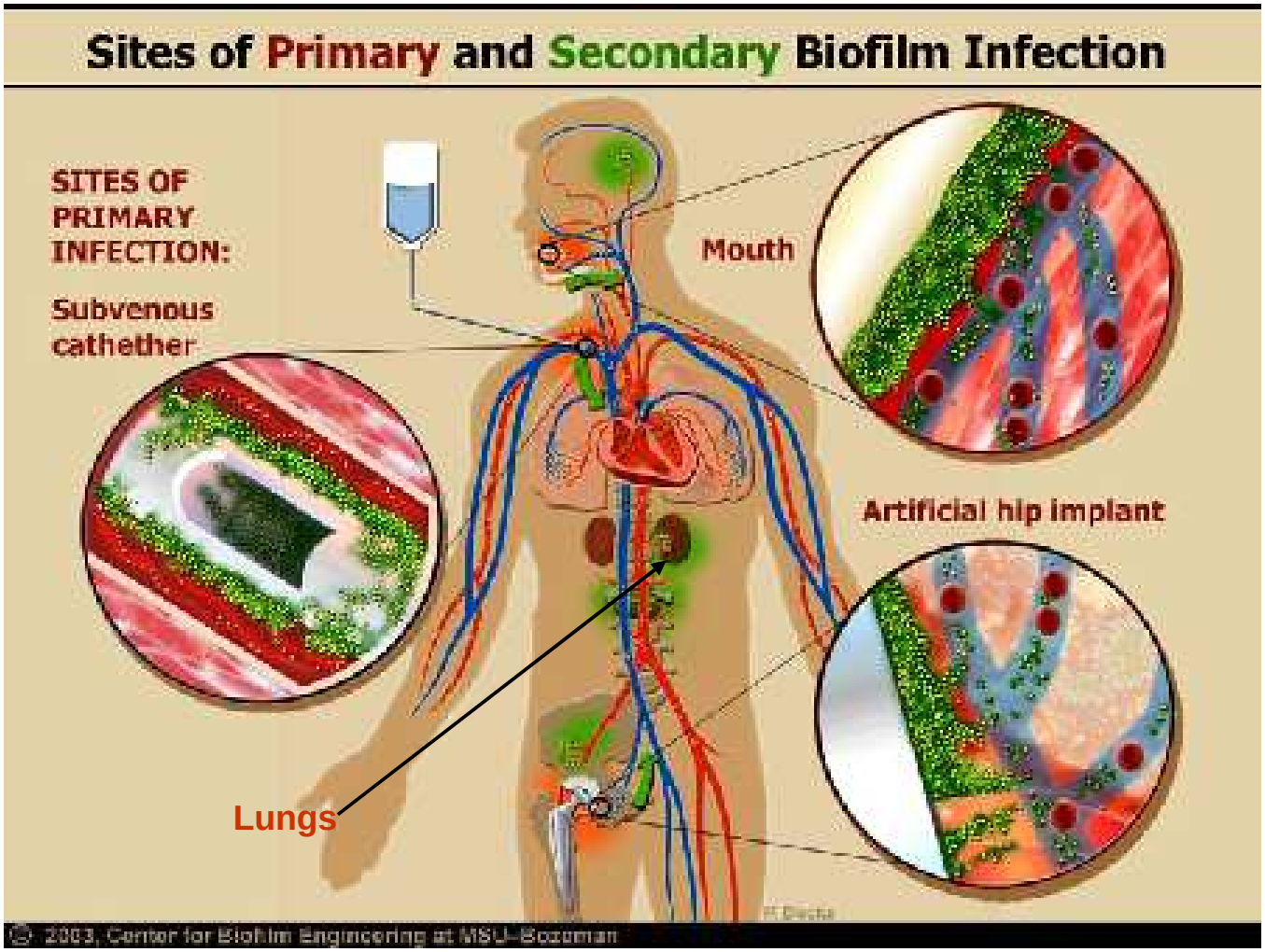
Biofouling em submarinos

Aumento do consumo de combustível

Biofouling causado pela macro-alga *Enteromorpha* *(Imagem: John Lewis, DSTO Australia)*

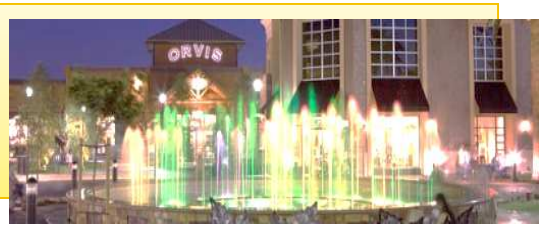
BIOFILMES PERIGOSOS ...

Infecções no Corpo Humano causadas por Biofilmes

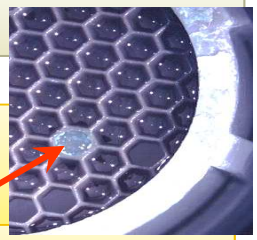


Center for Biofilm Engineering, Montana, USA

1995, Belgica
5 pessoas morrem numa exposição comercial
(Biofilmes de Legionella pneumofilae)



Abril 1999, Suécia
Jacuzzi num hotel provoca febre de Pontiac em 24 pessoas
(Biofilmes de Legionella micdadei)



Agosto 2006, Inglaterra
Chuveiro em hospital mata um homem
Royal United Hospital, Bath, UK ***(Biofilme de Legionella pneumofilae)***

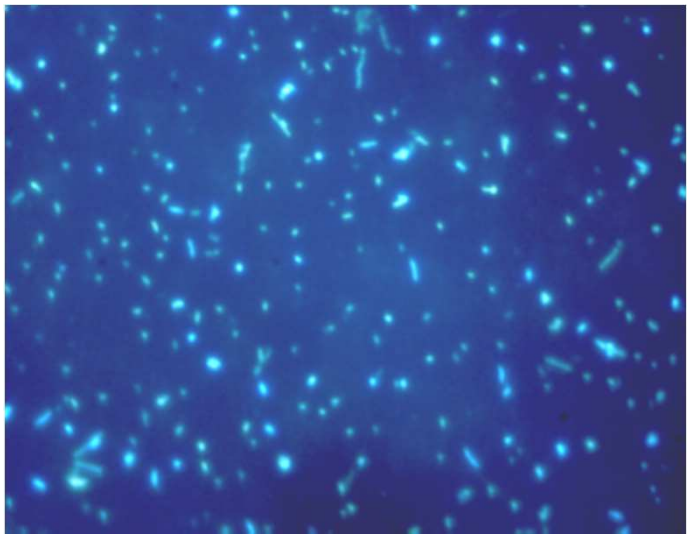
Julho 2001, Espanha
6 pessoas morrem em Murcia
(causa: Biofilme de *Legionella pneumofilae* *na* Torre de arrefecimento de um hospital)

Novembro 2014, Portugal
13 pessoas morrem em Vila Franca de Xira (Lisboa)
(causa provável: Biofilme de *Legionella pneumofilae* *na* Torre de arrefecimento de uma empresa)

BIOFILMES EM SISTEMAS DE ÁGUA POTÁVEL

EFFEITO DA FREQUÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DA ÁGUA

Água potável recolhida de uma torneira usada frequentemente



Água potável recolhida de uma torneira fechada durante 1 mês

C. Manuel,
***Tese de doutoramento*, FEUP, 2008**

BIOFILMES NA INDÚSTRIA AIMENTAR

- **Biofilmes contendo microrganismos patogénicos:**

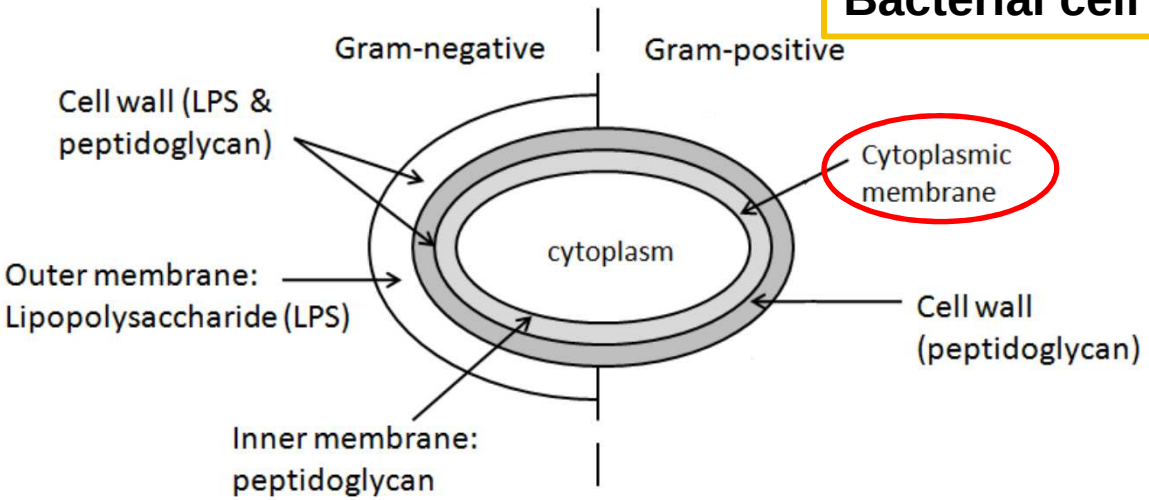
  Listeria monocytogenes, Salmonella spp, Bacillus spp, etc

- **Colaboração entre biofilme de microrganismos comuns e microrganismos patogénicos.**

- **Equipamento: Tanques, Tubos, Correias transportadoras, estantes de madeira para maturação do queijo, Pasteurizadores, etc etc**

Os Biocidas no combate aos Biofilmes

Bacterial cell wall composition



Ataque dos biocidas às bactérias

- **A membrane citoplásmica (camadas de fosfolípidos e proteínas nelas embebidas) é o principal alvo dos biocidas.**

- **A interacção do biocida com a membrane citoplásmica causa:**
  - **ruptura da membrane –perda da integridade da membrane com libertação dos components intracelulares;**
  - **inibição dos mecanismos respiratórios;**
  - **inibição da atividade das enzimas associadas à membrana;**
  - **dissipação do gradiente de protões**

Os Biocidas no combate aos Biofilmes

- **Os métodos quimicos existentes para o controlo do biofoiuling são caros e não são suficientemente eficazes na desinfeção de superfícies**

Existe risco de disseminação da resistência…

Os <u>biocidas</u> (por exemplo, cloro) …

… <u>não são totalmente consumidos na interação com os microroganimos</u>

e reagem com os EPS dos biofilmes originando produtos nocivos à saúde

ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES

- Superfícies modificadas com propriedades anti-fouling ou tóxicas para os microrganismos

- Novos produtos anti-bacterianos: biocidas, antibióticos, nano e micro-partículas, etc

- Controlo on-line da formação e eliminação de biofilmes

GRACIAS ! OBRIGADO !