

Fisiología Microbiana

Tarea de Aula 4A

Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano
comunitario

Trabajos Prácticos

- **TP 1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - Manejo de material de laboratorio.
 - Práctica de Técnicas Asépticas.
 - Métodos de siembra y aislamiento.
- **TP2: Aislamiento y análisis de microorganismos.**
 - Aislamiento a partir de diferentes nichos
 - Enriquecimiento y repiques de colonias
 - Observaciones microscópicas. Coloraciones
 - Metabolismo.
 - Producción de exoenzimas y antibióticos.
- **TP3: Crecimiento**
 - Curva de crecimiento.
 - CIM y antibiograma
- **TP4: Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario**
 - Winogradsky
 - Cuerpos fructíferos, swarming, biofilms
 - Matriz extracelular en biofilms

Trabajo Práctico N° 4:

Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario

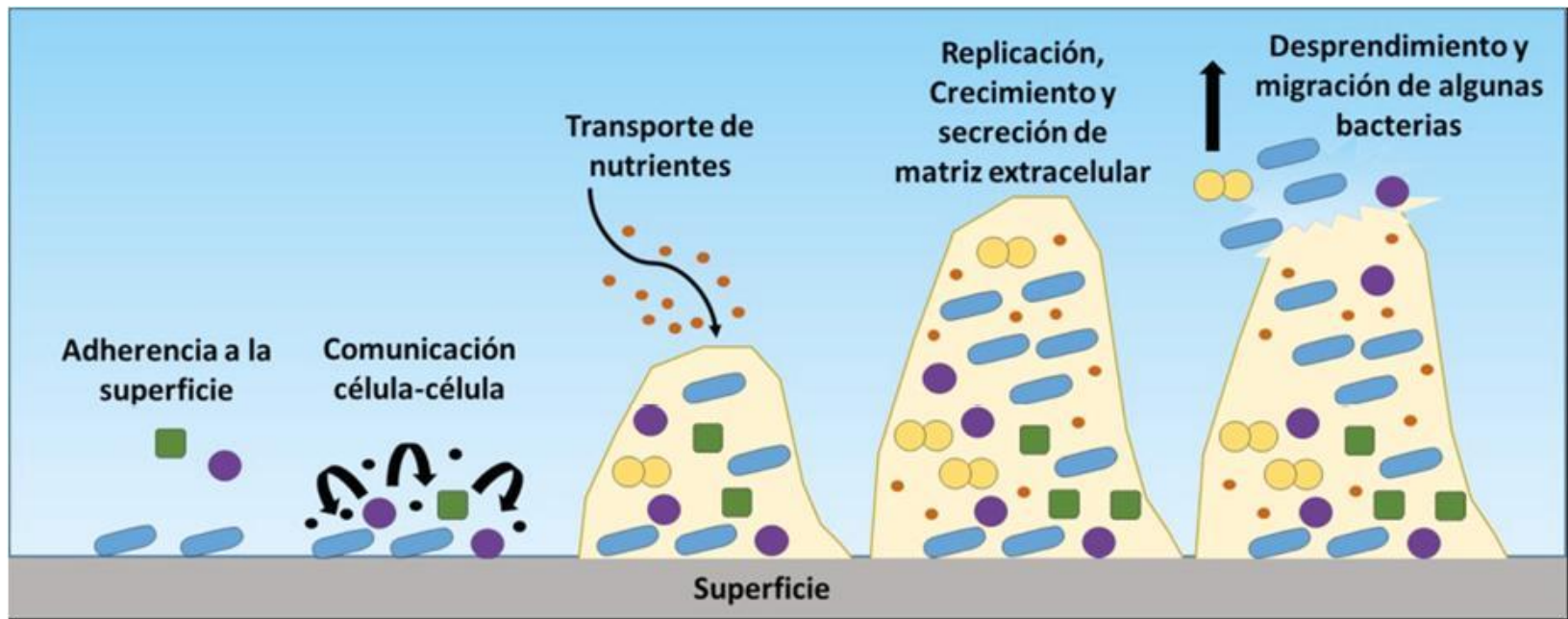
OBJETIVOS:

- Observar y comprender la diversidad bacteriana que coexiste en un mismo nicho en un dado ecosistema y las interrelaciones que ocurren entre ellas mediante el empleo de la “Columna de Winogradsky”.
- Introducir al alumno en el concepto de comportamiento bacteriano social mediante el estudio de formas de crecimiento en comunidad tales como cuerpos fructíferos, biofilms y swarming.
- Afianzar el concepto de matriz extracelular y su papel en el desarrollo estructural y funcional de los biofilms.

Formación de Biofilms

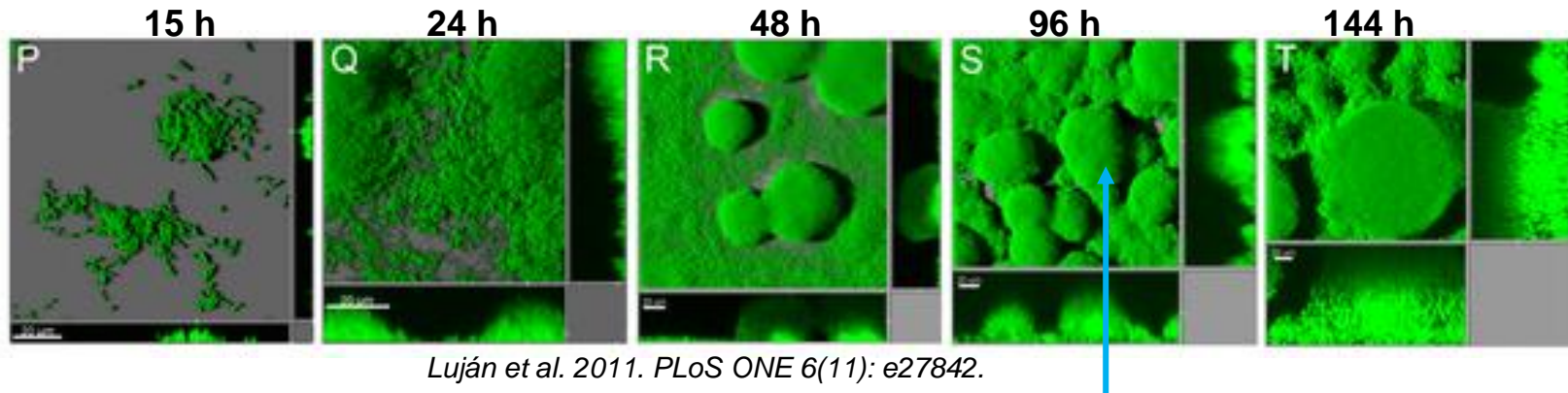
¿Qué es un Biofilm?

Es una población microbiana compuesta por una o más especies, que se encuentra adherida a una superficie por medio de una **matriz extracelular**, y en la que se establece una compleja red de interacciones intercelulares en donde las células se comportan en forma comunitaria.



Tipos de biofilms

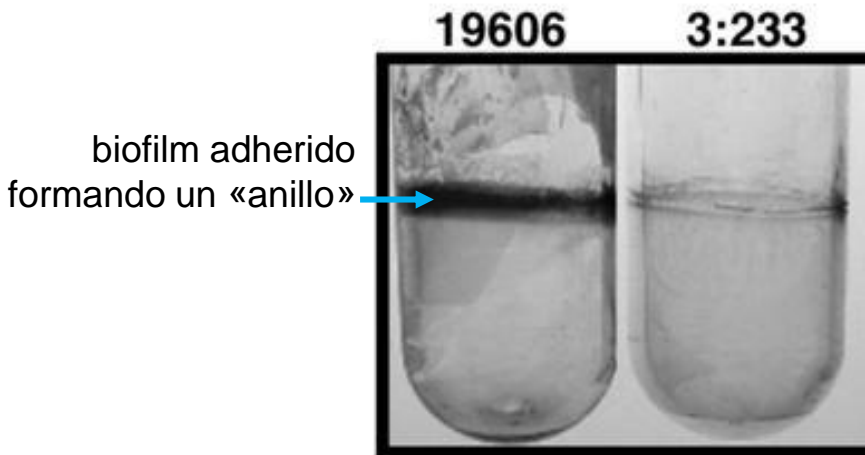
Biofilms sumergidos sobre superficies abióticas



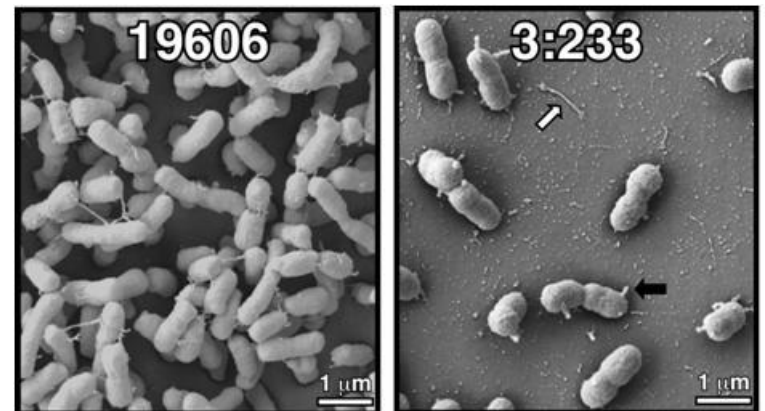
estructura de tipo «seta de hongos»

Acinetobacter baumannii 19606
wild type

Acinetobacter baumannii 3:233
mutante deficiente en la formación de biofilm



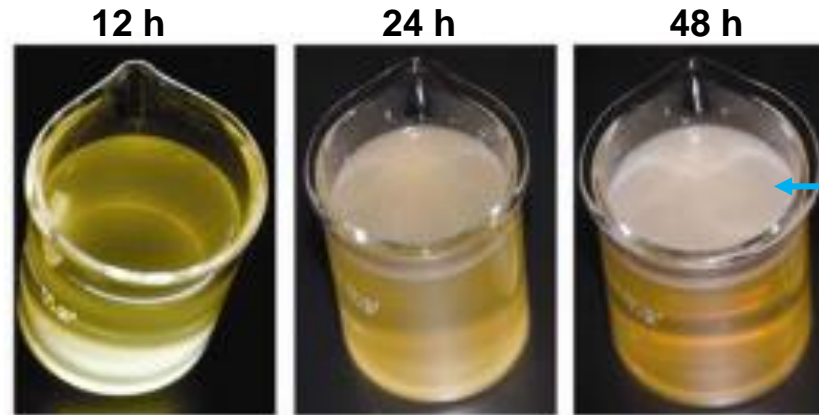
Imágenes SEM



Tipos de biofilms

Biofilms de tipo película y macrocolonia

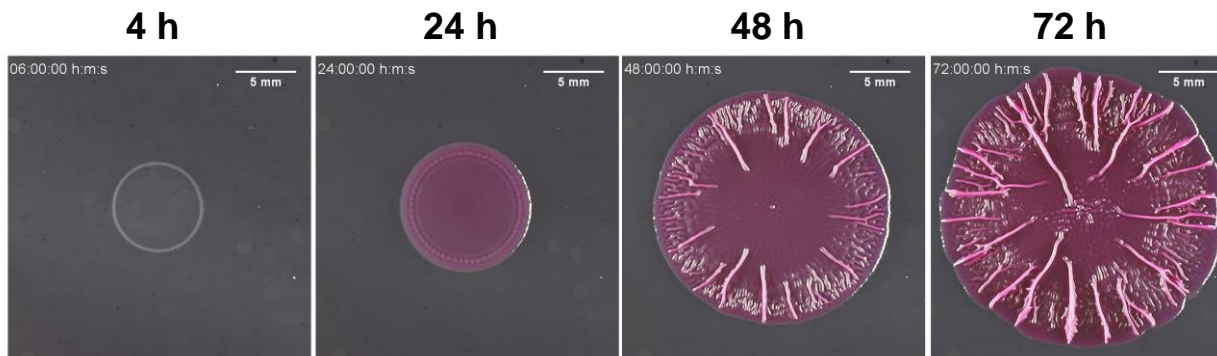
Biofilm de tipo película de *Shewanella oneidensis*



película en la interfase aire/líquido

Liang et al. BMC Microbiology 2010, 10:291

Biofilms de tipo macrocolonia de *Escherichia coli*



■ Matriz Extracelular (curli y cellulose) teñida *in situ* con Congo Red

LB (sin NaCl) + Congo Red

Serra et al. (unpublished)



Papel de la matriz extracelular en la formación de biofilms

Matriz extracelular de los biofilms

- proporciona estabilidad estructural (rigidez, elasticidad) y modula la arquitectura 3D de los biofilms
- proporciona protección a las células contra el estrés externo (por ejemplo, previene la deshidratación, actúa como barrera de filtro que adsorbe componentes orgánicos e inorgánicos tóxicos para las células)

Biofilm de tipo macrocolonia de *E. coli* crecido en agar LB (sin NaCl) suplementado con Tioflavina S, que tiñe la matriz extracelular

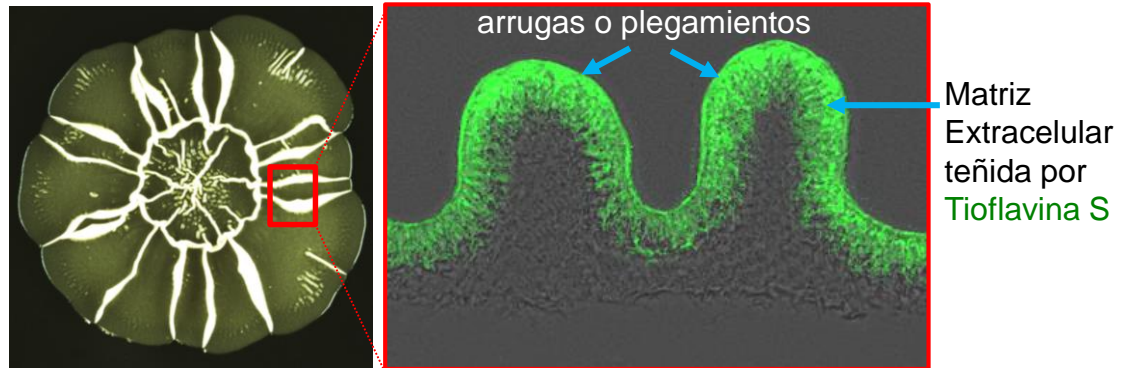
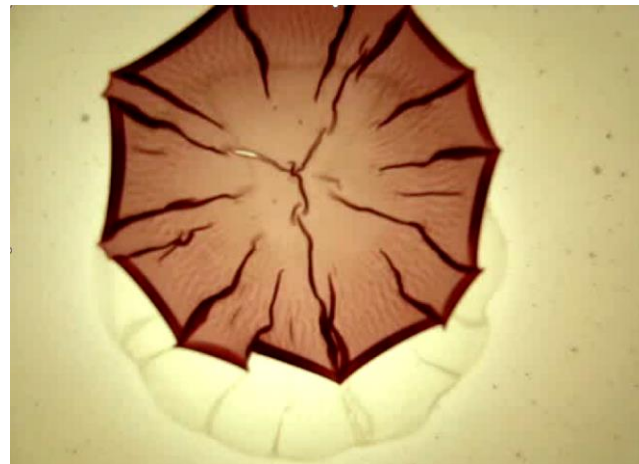


Imagen de fluorescencia de un corte transversal

La matriz extracelular de curli y cellulose a es esencial para la formación de plegamientos y arrugas



Cuando la macrocolonia de *E. coli* es sumergida en líquido y sometida a estrés, la misma se desprende del agar, pero es capaz de flotar y mantener su estructura intacta gracias a la matriz extracelular (que en la imagen se visualiza roja por la tinción con Rojo Congo)

Ventajas de vivir en biofilms

¿Qué ventajas otorga un Biofilm?

Colonización

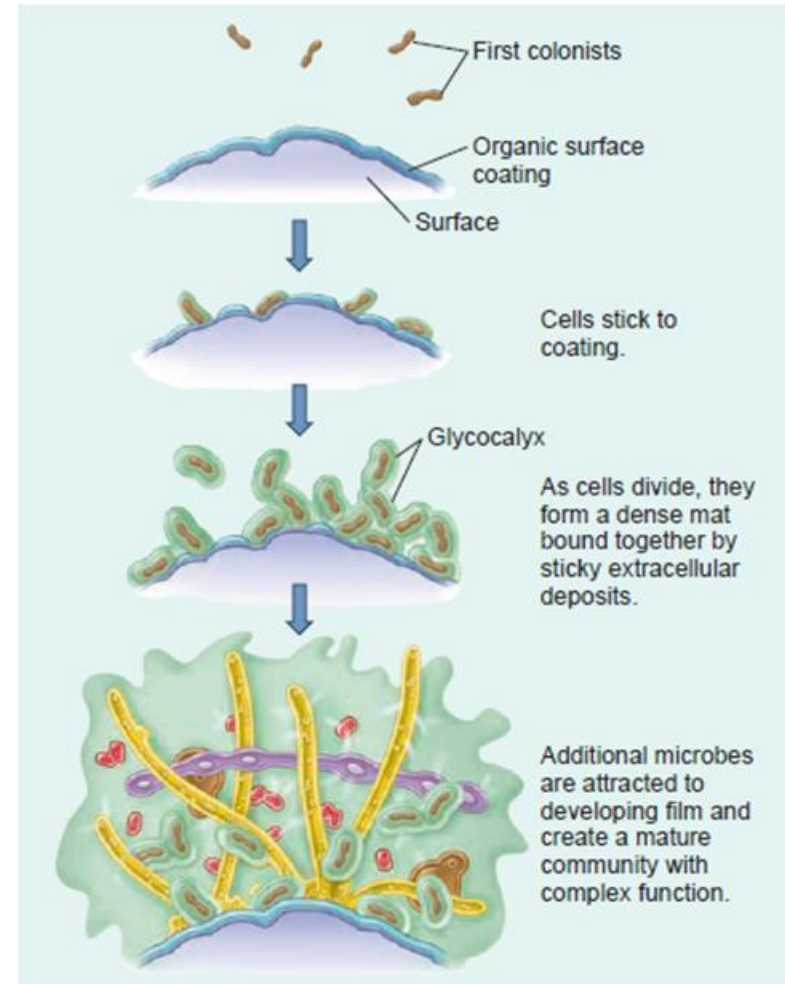
- La adherencia permite que los microorganismos permanezcan adheridos en una zona favorable al crecimiento

Resistencia

- A agentes antimicrobianos
- A fagocitosis por otros organismos
- A agentes físicos (calor, radiación UV)

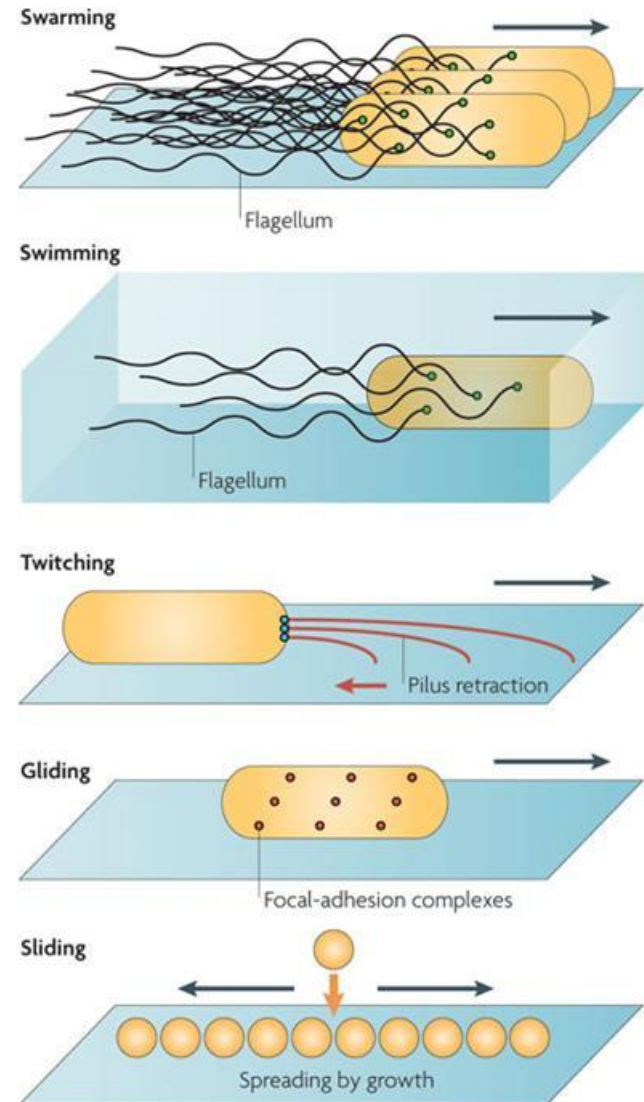
Interacción comunitaria

- Complementación metabólica
- Transferencia horizontal de genes



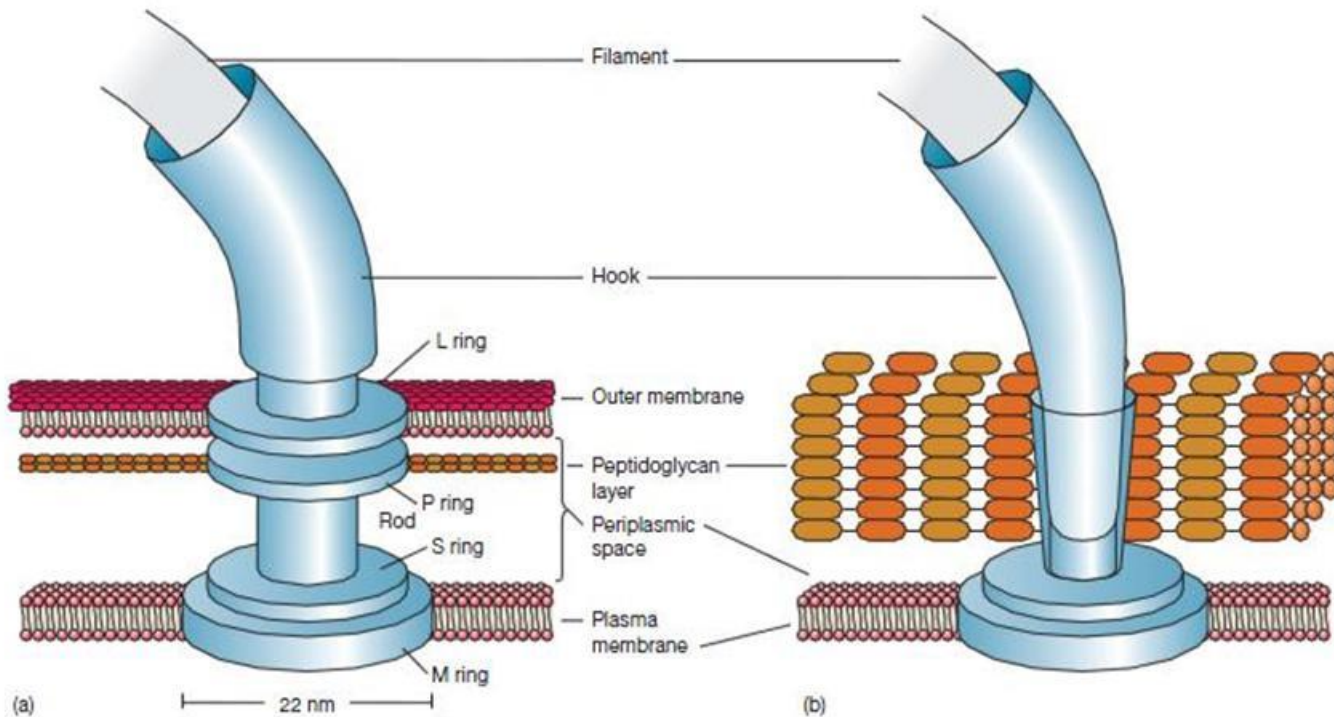
Movilidad bacteriana

Tipo	Movimiento atribuido a..	Las células se mueven	
		En conjunto	Aisladas
Swarming	Flagelo	+	
Swimming	Flagelo		+
Twitching	Pili tipo IV	+	+
Gliding	Complejos de adhesión focal	+	
Sliding	La células nuevas desplazan a las ya existentes hacia afuera en forma pasiva.	+	



Swimming

El movimiento de swimming ocurre en medio líquido, y se debe a la rotación del flagelo bacteriano. Esta estructura atraviesa la pared celular y se ancla a la membrana citoplásmica, donde se encuentran las proteínas responsables del giro del mismo. Éstas hacen girar el gancho y el filamento a expensas de fuerza protón motriz.



<https://www.youtube.com/watch?v=VzqC7nag6KM>

Swimming

- Monótrico

Polar

- Anfítricos

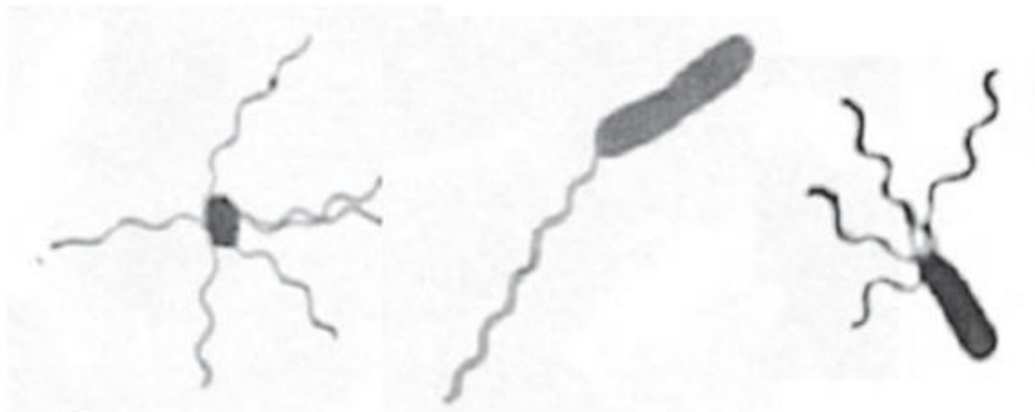
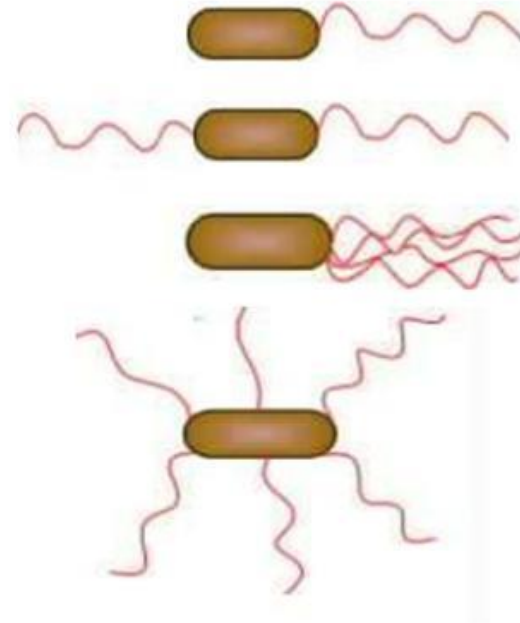
Polares

- Lofótricos

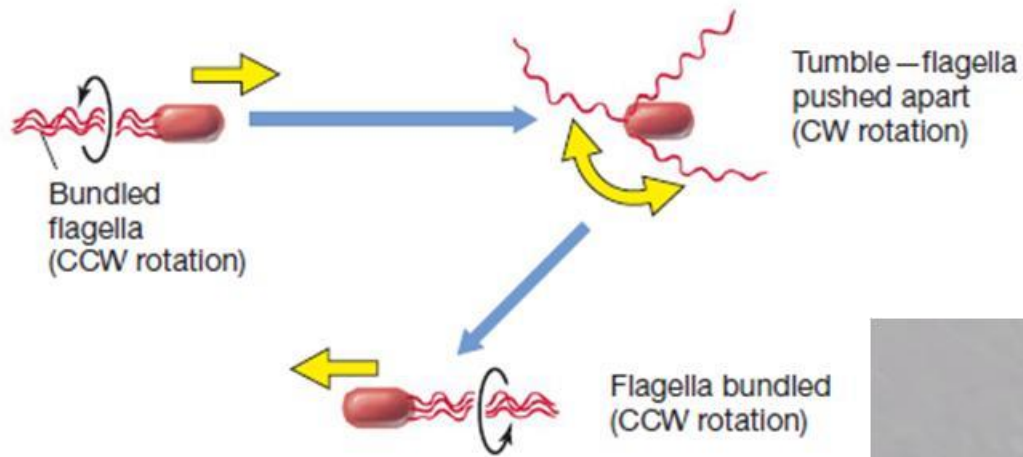
Polares
múltiples

- Perítricos

Periféricos
múltiples



Swimming – Flagelos perítricos

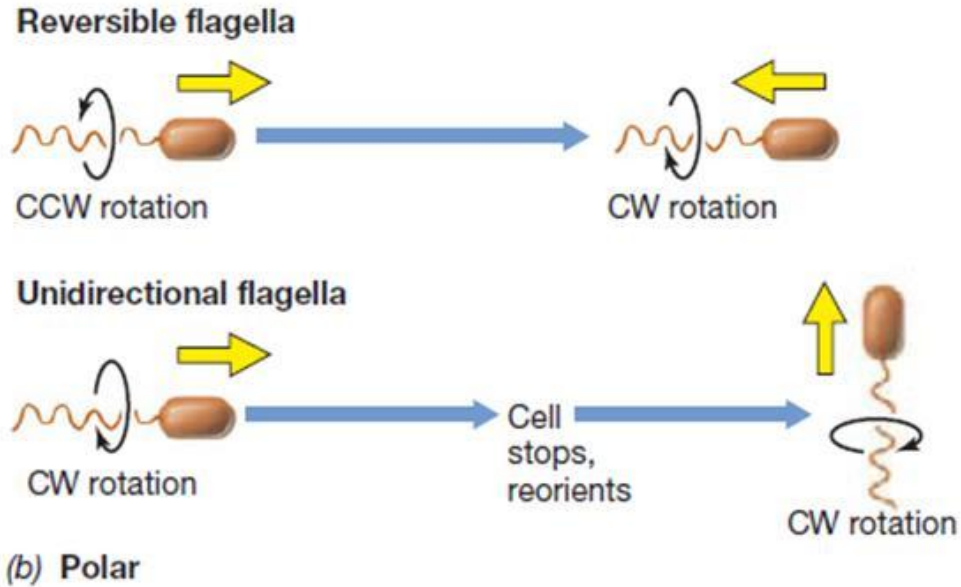


(a) Peritrichous



<https://www.youtube.com/watch?v=F6QM U3KD7zw>

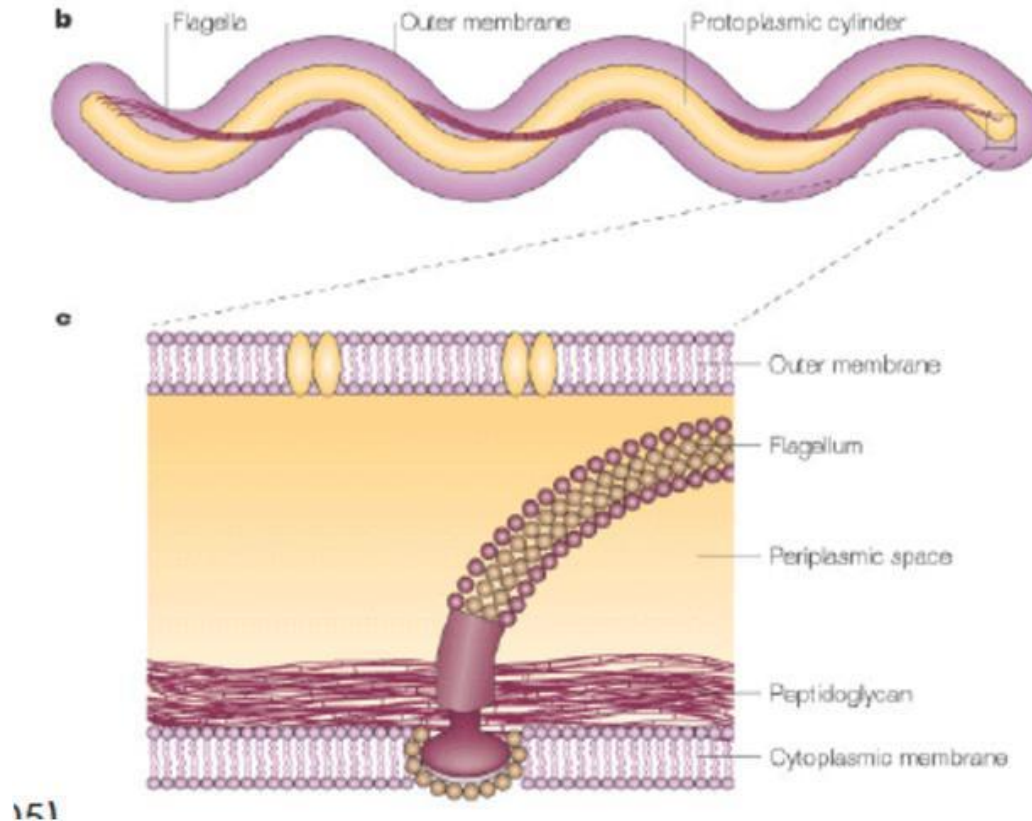
Swimming – Flagelos polares



<https://www.youtube.com/watch?v=wMkMRXu2tVA>



Swimming – Flagelos periplásmicos



Modelo

<https://www.youtube.com/watch?v=RUV6mr7MVB1>

Video

<https://www.youtube.com/watch?v=F9B60gsCg4w>

Swarming

- Swarming involucra la diferenciación de células aisladas a células elongadas e hiperflageladas que llevan a cabo la migración rápida y coordinada de la **población a través de superficies sólidas húmedas**.
- Estas células se movilizan en grupos, o rafts, organizando paralelamente a su eje mayor para maximizar los contactos célula-célula y secretando surfactantes que facilitan la migración.
- Como consecuencia, la población termina colonizando toda la superficie disponible.
- Distintas especies presentan distintos patrones de migración

<https://www.youtube.com/watch?v=7zn9-MT5yig>

<https://www.youtube.com/watch?v=5R-i969UJOs>

a Featureless mat



b Bull's eye

(Also known as zones of consolidation or terraces)



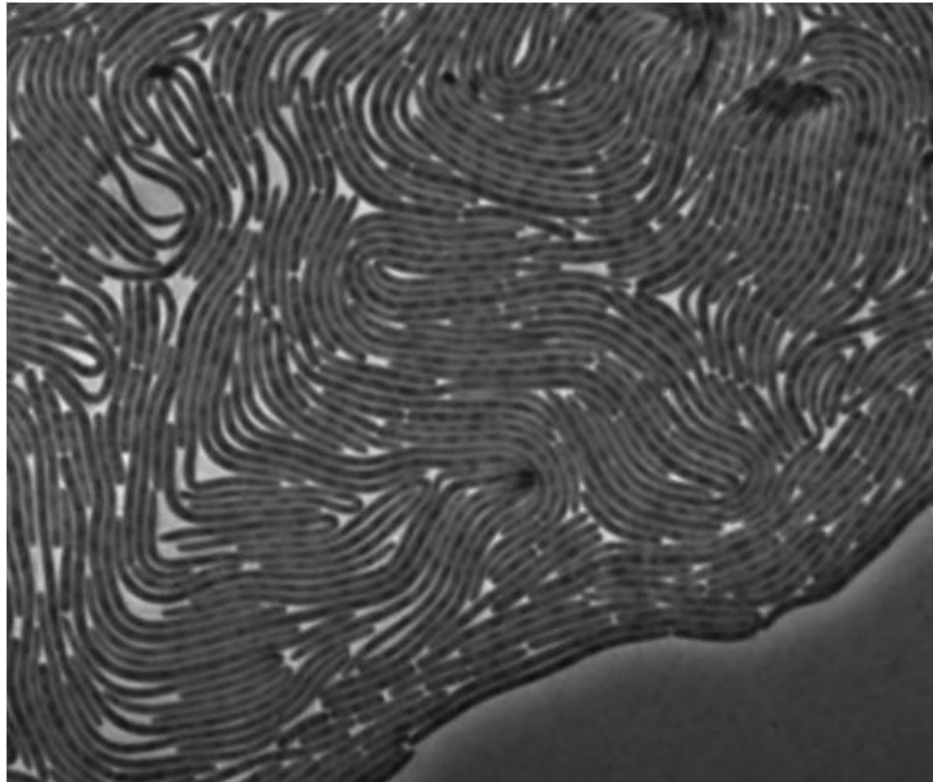
c Dendrites

(Also known as deep branches or tendrils)



Observación microscópica de swarming

- Swarming de *Proteus mirabilis*
 - <https://www.youtube.com/watch?v=XzmokbE3kEs>
 - <https://www.youtube.com/watch?v=0YYAtPCIMc0>
- Swarming de *Serratia Marcescens*
 - https://www.youtube.com/watch?v=aoCIMMnE_m0



Twitching

- Las bacterias que se mueven por twitching son capaces de sintetizar una estructura de pili (Pili tipo IV), que se adhiere a la superficie. Luego, al depolimerizar el pili, la bacteria se mueve en dirección al punto de adhesión, pudiendo reiniciar nuevamente el ciclo de extensión-adhesión-retracción de pili.

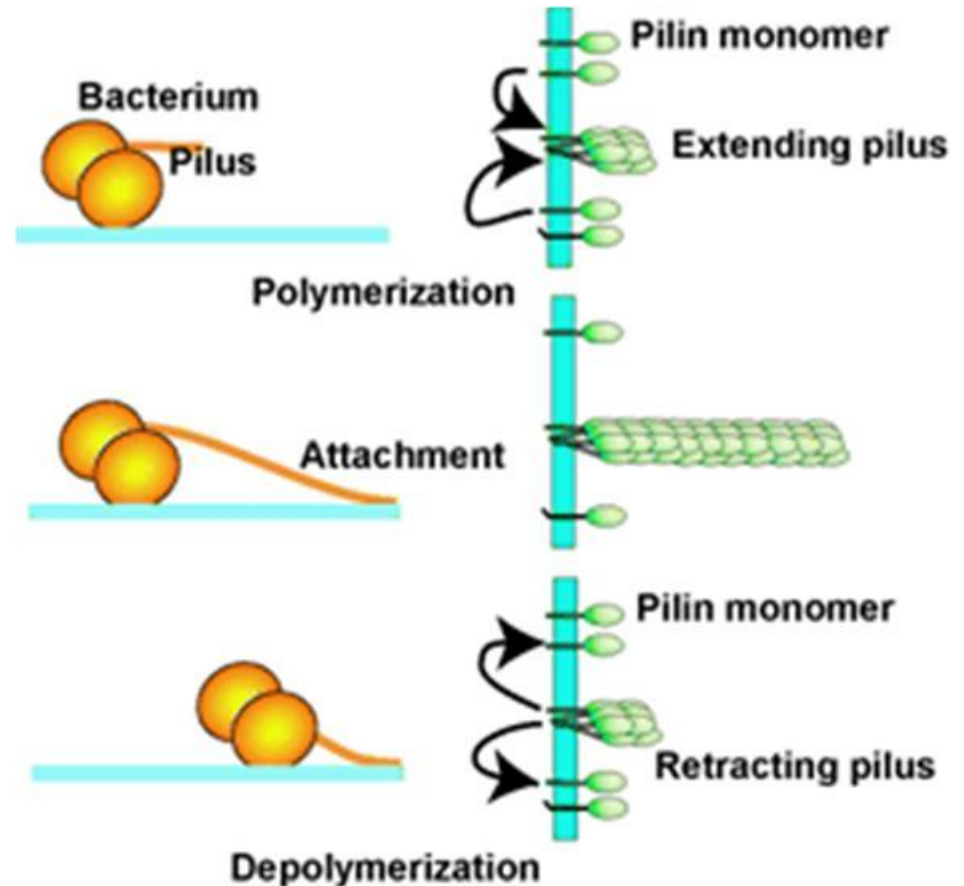
Modelo

<https://www.youtube.com/watch?v=jkod7MT7gQ0>

Videos

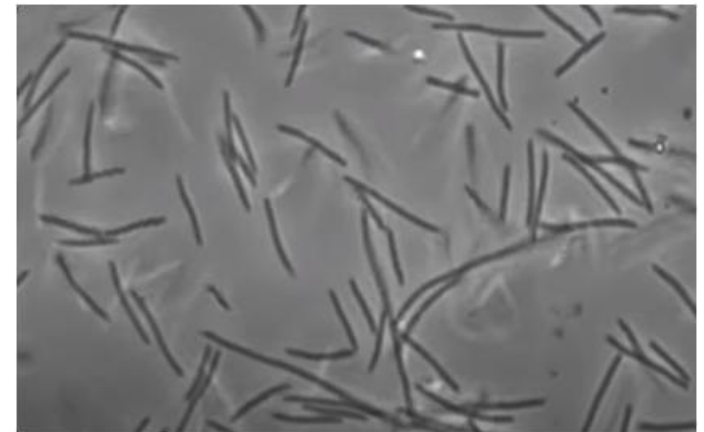
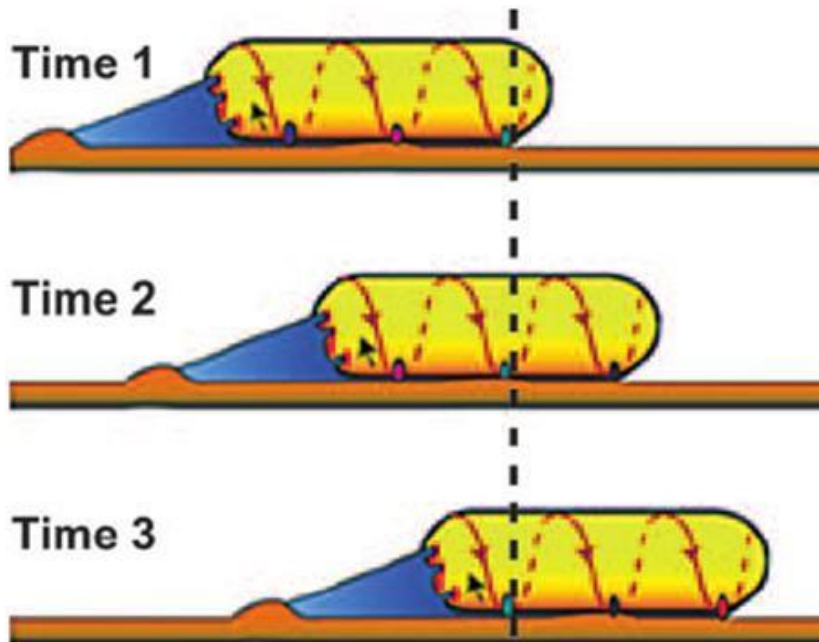
https://www.youtube.com/watch?v=m1vJKz_bV7U

<https://www.youtube.com/watch?v=oR-N0uSsvkQ>



Gliding

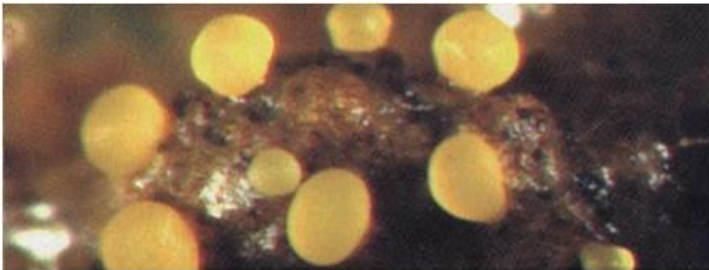
- Las bacterias que se mueven por gliding, no emplean flagelos giratorios ni pili, sino que utilizan sistemas para deslizarse por la superficie húmeda, generalmente basados en complejos de adhesión focal.



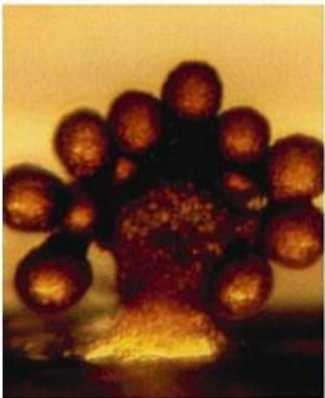
<https://www.youtube.com/watch?v=0BuVarYDurA>
<https://www.youtube.com/watch?v=VKrkiCGOgUY>

Formación de cuerpos fructíferos

- Es un caso ejemplar de comportamiento comunitario y diferenciación celular en bacterias
- Cuando la comunidad sensa alta densidad celular y limitación de nutrientes, se dispara coordinadamente la formación de estas superestructuras.
- A diferencia del biofilm, en este caso se requiere la migración coordinada y la agrupación de las células en determinados puntos mediante mecanismos de movilidad regulados tanto espacial como temporalmente



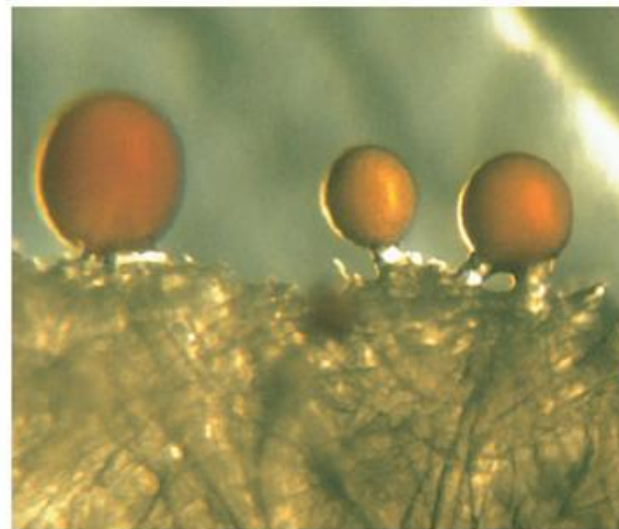
Myxococcus xanthus



Stigmatella aurantiaca



Chondromyces crocatus



Hans Reichenbach



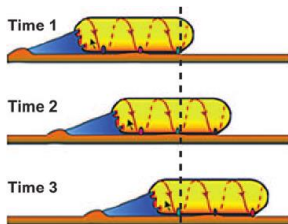
Hans Reichenbach

Ciclo de vida de *Myxococcus xanthus*

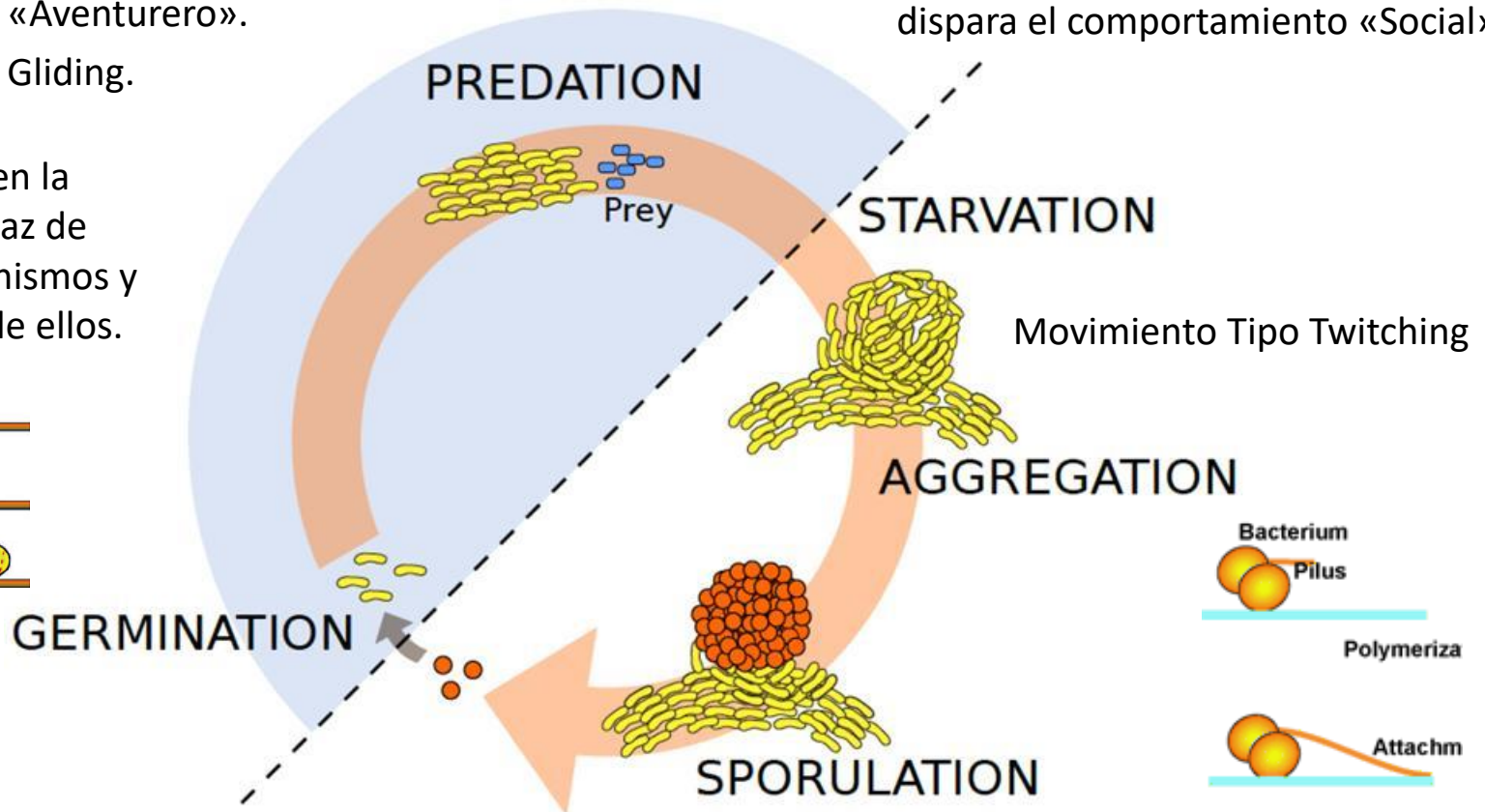
En presencia de nutrientes
Comportamiento «Aventurero».

Movimiento Tipo Gliding.

M. xanthus es un heterótrofo que en la naturaleza es capaz de matar otros organismos y nutrirse a partir de ellos.



Ante la ausencia de nutrientes se dispara el comportamiento «Social».



Se forman los cuerpos fructíferos, donde las células superiores forman esporas, muchas veces a expensas de la lisis de bacterias de las capas inferiores.

Ciclo de vida de *Myxococcus xanthus*

M. xanthus

Movimiento comunitario sobre una colonia de *E. coli*

Formación de cuerpos fructíferos en zonas depletadas de nutrientes

<https://www.youtube.com/watch?v=tstc6doiNCU>

Cuerpos
fructíferos



M. xanthus

E. coli

Vista lateral de cuerpos fructíferos: <https://www.youtube.com/watch?v=O1jPzhz1Qyc>

Actividades para TP4

Comportamientos microbianos en comunidad

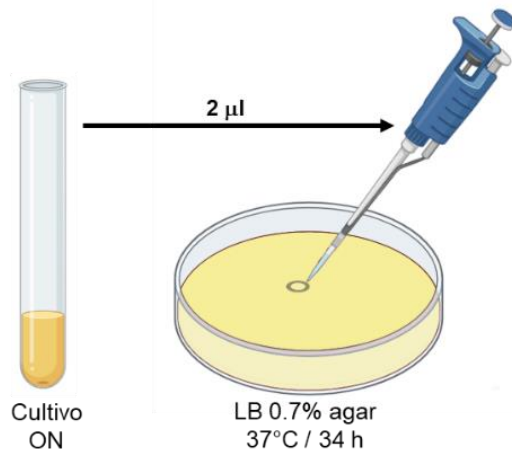
TP4 - Día 1

Inicio de cultivos para la observación de comportamientos microbianos en comunidad

Ejercicio 1: "Swarming" (Realiza: Grupo 1)

- Preparar 4 placas de LB 0.7% agar
- Inocular en el centro de cada placa 2 μ l de cultivo ON de las siguientes bacterias:

- 1- *B. subtilis* 3610 (salvaje)
- 2- *B. subtilis* MARBURG (salvaje)
- 3- *B. subtilis* JH642 (domesticada)
- 4- *B. subtilis* NATO (salvaje)

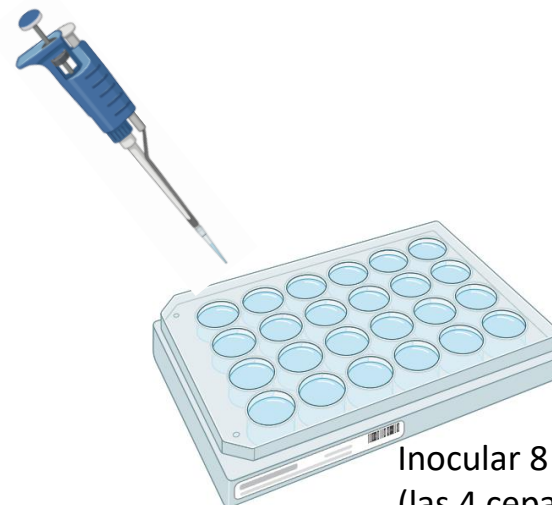


Inocular 1 colonia por placa

Ejercicio 2: Biofilms de tipo película (Realiza: Grupo 2 y 3)

- Dispensar 1 ml de LB en 4 pocillos (por grupo) de una placa multipocillo.
- Inocular cada pocillo con 10 μ l de cultivo ON de cada cepa de *B. subtilis* detallada a continuación:

- 1- *B. subtilis* 3610
- 2- *B. subtilis* MARBURG
- 3- *B. subtilis* JH642
- 4- *B. subtilis* NATO



Incubar a 30°C
y sin agitación por
48 h

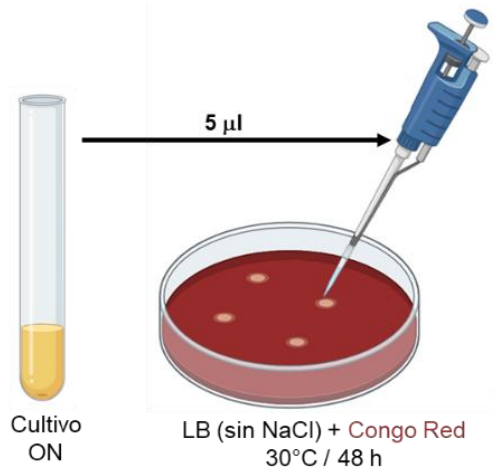
Inocular 8 pocillos por placa
(las 4 cepas x 2 grupos)

TP4 - Día 1

Ejercicio 3.1.: Biofilms de macrocolonia de *B. subtilis* (Realiza: Grupo 4)

- Inocular una placa de LB (sin NaCl) suplementada con Rojo Congo (ya preparada) con 5 μ l de cada cultivo ON de las siguientes cepas de *B. subtilis*:

- 1- *B. subtilis* 3610
- 2- *B. subtilis* MARBURG
- 3- *B. subtilis* JH642
- 4- *B. subtilis* NATO

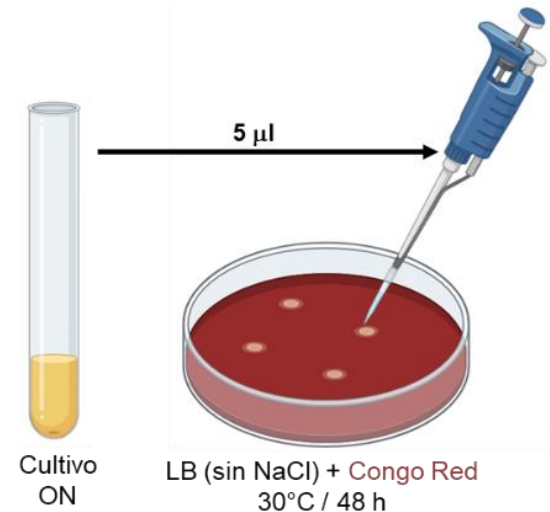


Inocular 4 colonias (una de cada cepa) en la placa

Ejercicio 3.2.: Biofilms de macrocolonia de *E. coli* (Realiza: 1 grupo por comisión)

- Inocular una placa de LB (sin NaCl) suplementadas con Rojo Congo (ya preparada) con 5 μ l de cada cultivo ON de las siguientes cepas:

- 1- *E. coli* AR3110 (curli+ / celulosa+)
- 2- *E. coli* AR3110 Δ *csgB* (curli- / celulosa+)
- 3- *E. coli* AR3110 Δ *bcsA* (curli+ / celulosa-)
- 4- *E. coli* AR3110 Δ *csgB/bcsA* (curli- / celulosa-)



Inocular 4 colonias (una de cada cepa) en la placa

TP4 - DÍA 2

Evaluación de resultados de los comportamientos microbianos en comunidad. Rol estructural de la matriz extracelular en biofilms.

Ejercicio 1: Observación macroscópica de swarming y de biofilms en tipo película y macrocolonia de *B. subtilis* y/o *E. coli*.

- Swarming: observar el patrón de colonización del agar en cada cepa de *B. subtilis*.
- Biofilm de tipo película: Observar, para cada cepa de *B. subtilis*, la formación de una película en la interfase líquido-aire en los pocillos de la placa multipocillo.
- Biofilm de tipo macrocolonia: Observar, para cada cepa de *B. subtilis* y *E. coli*, el patrón morfológico y de tinción con RC. Para *E. coli*, discutir la correlación entre dichos patrones y la composición de la matriz extracelular.

Ejercicio 2: Demostración del rol estructural de la matriz extracelular en biofilms de *E. coli*.

- Utilizar la placa con las macrocolonias de *E. coli* cultivadas en el ejercicio 3.2.;
- Verter 10 ml de agua destilada sobre el agar;
- Agitar las placas durante 3-5 min;
- Observar el comportamiento de las distintas macrocolonias frente al estrés mecánico.

