Il ruolo del flusso nella morfologia dei biofilm batterici

Federica Recupido^{1,2}

¹Dipartimento di Chimica, Università Aristotele di Salonicco 116, 54124 Salonicco (Grecia)

² Dipartimento di Ingegneria Chimica, dei Materiali e delle Produzioni Industriali (DicMaPi), Piazzale V. Tecchio 80 80125 Napoli (Italia).

federecu@chem.auth.gr

Sommario. Le comunità di microorganismi batterici, aderendo su supporti solidi, producono con il loro metabolismo macromolecole che costituiscono una matrice gelatinosa che fornisce ai batteri una protezione chimica e meccanica dall'ambiente esterno. Tale struttura, definita biofilm, costituita da un network di polisaccaridi, è caratterizzata da proprietà visco-elastiche, ed è spesso co-abitata da differenti specie microbiche. È noto in letteratura che il flusso condizioni la formazione e la morfologia dei biofilm batterici; in particolare, a seconda delle condizioni reologiche, si possono ottenere differenti microstrutture nel biofilm, influenzando altresì la cinetica di crescita. In questo lavoro sperimentale è stato investigato il ruolo del flusso sulla morfologia di biofilm batterici. Allo scopo è stato messo a punto un setup sperimentale basato su una camera microfluidica che consente di controllare il flusso della soluzione di nutrienti in un canale a sezione rettangolare. La morfologia dei biofilm è stata investigata in funzione delle condizioni di flusso (tutte nel regime laminare) mediante microscopia confocale e tecniche di analisi delle immagini.

Parole chiavi Cellule in flusso, Biofilm, Sforzo di taglio, Microscopia confocale, Analisi delle immagini.

Abstract. Biofilm are consortia made of sessile microorganisms, irreversibly attached on solid substrates. Once attached, bacterial cells produce a gel-like matrix mostly made of exopolysaccharides (known as EPS), which ensures protection from the external environments, and mechanical stability. The biofilm matrix appears as an highly hydrated macromolecules network, with viscous-elastic properties, which also assures cohesion among the microbial species. From the literature, it is well known that shear flow affects biofilm formation and subsequently their morphology. Under the different flow regime different microstructures can be induced, with different kinetics. In this experimental work, the role of flow on bacterial biofilm morphology has been investigated. A continuous experimental set-up has been used with the aim to control the imposed hydrodynamic conditions. Biofilm morphology has been investigated at different shear rate values (all in laminar regime) and characterized via Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and image analysis techniques.

Keywords, Cells under flow, Biofilm, Shear stress, Confocal microscopy, Image analysis.

1. INTRODUZIONE

I biofilm sono consorzi costituiti da microorganismi che, adesi su un substrato solido, secernono una matrice di esopolimeri, noti come EPS (*Extracellular Polymeric Substances*), in grado di assicurare loro stabilità meccanica e protezione dall'ambiente esterno (Branda *et al.* 2006, Flemming and Wingender 2010). In particolare gli EPS sono costituiti per la maggior parte da polisaccaridi, DNA extracellulare (eDNA), proteine e lipidi, e conferiscono alla struttura del biofilm proprietà visco-elastiche (Flemming *et al.* 2016, Jana *et al.* 2020), nonché coesione tra le cellule batteriche costituenti la stessa. Pertanto, i biofilm risultano estremamente resilienti verso le condizioni ambientali, anche quelle più estreme, tra cui, presenza di elevati *shear stress* (τ), variazioni di pH, temperatura, variazione della disponibilità di nutrienti (Jana *et al.* 2020) e presenza di antibiotici e soluzioni detergenti (Epstein *et al.*2011), rappresentando difatti un rischio in molte applicazioni biomedicali ed industriali tra cui contaminazione di apparecchiature biomedicali, bio-corrosione di apparecchiature industriali (esempio: scambiatori di calore, torri di raffreddamento, membrane) e *cross*- *contamination* di prodotti alimentari. Inoltre, i biofilm sono la causa di sporcamento dei canali delle acque potabili (oltre che di quelle reflue), causando problemi di alterazioni delle qualità organolettiche delle acque nonché di corrosione di tubi.

Per quanto concerne le proprietà fisico-chimiche, possono essere considerati, come materia soffice (*softmatter*), in cui i batteri sono assimilabili a particelle colloidali circondati da una matrice polimerica di tipo *cross-linked* (Wilking *et al.* 2011, Gloag *et al.* 2020), dotata di proprietà elastiche e viscose rispettivamente a bassi ed alti tempi di esposizione degli sforzi. A tal proposito, in letteratura sono stati condotti vari studi reologici sui biofilm batterici, sia riguardanti l'impiego di sforzi normali (Grumbein *et al.* 2016, Charlton *et al.* 2019) alla superficie del biofilm (mediante reometria piatto-cono o tronco conica, indentata), sia di sforzi di taglio (shear stress mediante reometria rotazionale o mediante celle di flusso (*flow cells*), come riportato da Stoodley *et al.* (1999) e da Charlton *et al.* (2019). In quest'ultimo caso, è possibile anche analizzare la deformazione del biofilm indotta dal flusso di shear.

Pochi studi sono invece focalizzati sul ruolo del flusso imposto durante la fase di contaminazione e crescita sulla cinetica di formazione e sulla morfologia dei biofilm. Il flusso di shear sulla superfice svolge un ruolo fondamentale nella formazione dei biofilm batterici nelle varie fasi tra cui il passaggio da cellule planctoniche a cellule adese (mediante l'impiego di organi di motilità cellulari quali *pili* e flagelli), il distacco cellulare dal biofilm (Garret *et al.*, 2008), il rilascio di sostanze nutritive e lo smaltimento di metaboliti attraverso la matrice polisaccaridica e il *quorum sensing* batterico (Kim *et al.*, 2016, Recupido *et al.*, 2020). Inoltre, la presenza di forze di shear induce specifici riarrangiamenti delle comunità batteriche, alquanto variabili nello spazio e nel tempo (Berk *et al.*, 2012, Persat *et al.*, 2015). Difatti un biofilm rappresenta una struttura altamente complessa e dinamica, capace di modulare le sue proprietà fisico-chimiche nonché morfologiche nello spazio e nel tempo, in relazione a stimoli esterni, quali variazione dei nutrienti, temperatura, pH, composizione del mezzo nutriente e delle forze di taglio.

L'obiettivo di questo lavoro è analizzare il ruolo dello sforzo di taglio alla parete sulla morfologia di biofilm batterici.

Tipicamente, la morfologia delle strutture dei biofilm batterici dipende fortemente dalle condizioni di flusso. Sotto flusso laminare, i biofilm si presentano come agglomerati batterici uniformemente distribuiti nello spazio (Busscher & van der Mei 2006), mentre sotto flusso turbolento appaiono come strutture filamentose (*streamers*) e spazialmente molto eterogenee (Rusconi *et al.* 2011). Sebbene siano stati condotti studi concernenti il ruolo del flusso sulla morfologia di biofilm batterici, sono stati trovati risultati contrastanti e molte questioni risultano non risolte, tra cui come il flusso possa orientare le cellule batteriche nel formare strutture tridimensionali morfologicamente complesse. Nel presente lavoro sono stati coltivati *in vitro* biofilm batterici utilizzando un singolo ceppo di *Pseudomonas fluorescens*, principale responsabile di contaminazioni di apparecchiature industriali, in particolare nel settore alimentare. Allo scopo è stato impiegato un setup sperimentale in continuo costituito da una camera microfluidica a geometria planare (*flow cell*) utilizzata per controllare le condizioni fluidodinamiche, tutte in regime laminare. La morfologia dei biofilm ottenuti è stata ottenuta al variare delle condizioni di flusso e caratterizzata mediante microscopia confocale e tecniche di analisi delle immagini.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppo batterico e mezzi di coltura

Per la crescita di biofilm batterici è stato impiegato un singolo ceppo batterico di *Pseudomonas fluorescens*, estratto dal latte per produzioni casearie. Si tratta di un batterio Gram negativo, multiflagellato e aerobico. Il ceppo, acquistato dalla DSMZ (Braunschweig, Germania) in forma di liofilizzato, è stato riattivato mediante un mezzo complesso costituito da peptone di origine animale (5 g/L) e da estratto di carne (3 g/L). La sospensione batterica ottenuta è stata successivamente messa in incubazione a 30°C per 12 h in agitazione a 90 rpm e successivamente diluita al fine di ottenere una densità ottica a 600 nm (OD_{600nm}) all'incirca uguale a 0.5, corrispondente alla fase esponenziale di crescita batterica.

Per la crescita microbica, è stato impiegato un mezzo di coltura minimale costituito dalle seguenti componenti: 6.8 g/L di NaHPO₄, 3g/L di KH₂PO₄, 0.5g/L di NaCl and 1g/L di NH₄Cl, 95mg/mL di MgSO₄·7H₂O, 5.85 mg/mL di CaCl₂·2H₂O, 0.198 g/mL di EDTA, 2mg/mL di FeCl₃·6H₂O, 0.21 mg/mL di ZnCl₂, 0.03mg/mL di CuCl₂·2H₂O, 0.025mg/mL di CoCl₂·2H₂O, 0.025mg/mL di H₃BO₃, 0.004mg/ mL di MnCl₂·4 H₂O e 0.4 % di acido succinico, a pH prossimo alla neutralità.

2.2. Set-up sperimentale

E' impiegato un sistema a flusso continuo "*home made*" (Figura 1, riportato da Recupido *et al.* 2020) Tale sistema consente di studiare la cinetica di formazione dei biofilm controllando il gradiente di velocità e gli sforzi di taglio.

Il sistema è costituito da un micro-bio-reattore a geometria planare (*flow cell*) costituito da un alloggio per un vetrino da microscopio (76 mm x 26 mm x 1 mm) su cui è investigata la formazione dei biofilm batterici. La *flow cell* è stata incorporata in un sistema costituito rispettivamente da un'unità di alimentazione e da una pompa. L'unità di alimentazione è costituita da un serbatoio contenente la soluzione di mezzo minimale (contenente tutte le componenti per la crescita batterica, le cui proprietà fisico-chimiche possono essere assimilabili a quelle dell'acqua), da un filtro per l'aria che garantisce l'ossigenazione del mezzo nutriente prevenendo la contaminazione esterna; e da un tubo flessibile in silicone in cui scorre lo stesso. L'unità di pompaggio è costituita da una pompa peristaltica a singola testa (Gilson MiniPlus 3, Francia), mediante cui il flusso è convogliato al micro-bio-reattore. In prossimità dell'imbocco della *flow cell*, un sistema di valvole a tre vie consente l'iniezione della sospensione batterica. Un ulteriore tank di raccolta è stato utilizzato per il recupero degli effluenti del bioreattore. Gli esperimenti sono stati condotti pre-condizionando il sistema con mezzo minimale sterile. Successivamente, la sospensione batterica è stata iniettata attraverso la valvola a tre vie e il flusso è stato interrotto per due ore al fine di consentire l'adesione delle cellule batteriche sul supporto di vetro. Di seguito, gli esperimenti sono stati condotti a portata volumetrica costante per 72 ore alla temperatura di 25 ± 2 °C.

Sono stati impiegati i seguenti valori della portata volumetrica, Q: 0.25 mL/min, 0.5 mL/min, 1.5 mL/min, e 3 mL/min, corrispondenti ai seguenti valori di *shear stress* alla parete, τ_w (Pa): 1.49·10⁻⁴, 2.78 ·10⁻⁴, 8.33 10⁻⁴ e 1.67 10⁻³. Lo shear stress alla parete è stato determinato mediante l'equazione (1), riportata da Bird *et al.* (2002).

$$\tau_w = \frac{3Q}{2\,\delta^2 W} \cdot \mathbf{h} \tag{1}$$

Dove Q è la portata volumetrica (m³/s), δ è il semi-spessore del canale (m), W è la larghezza del canale (m) e h è la viscosità dinamica del mezzo minimale (Pa ·s).



Figura 1. Rappresentazione del sistema di flusso. Dal serbatoio a sinistra, il mezzo di coltura è convogliato in un tubo da 3 mm attraverso una pompa peristaltica. Il mezzo raggiunge la cella, che ospita vetrini da microscopio da 76 mm x 26 mm, in cui si verifica la formazione di biofilm. Il mezzo in uscita dalla cella è raccolto nel serbatoio a destra.

Per il calcolo del numero di Reynolds, è stato considerato il diametro idraulico, che è stato valutato mediante l'equazione (2).

$$D_h = \frac{4 \cdot A}{P} = \frac{4 \cdot W \cdot \delta}{W + 2 \cdot \delta} \tag{2}$$

Dove D_h è il diametro idraulico (m), A è l'area della sezione trasversale (m²) e P è il perimetro bagnato (m). Pertanto, il numero di Reynolds è stato determinato come segue:

$$Re_{D_h} = \frac{\rho \cdot Q \cdot D_h}{W \cdot \delta \cdot h} \tag{3}$$

Dove le proprietà fisico-chimiche del mezzo minimale (densità, ρ in kg m⁻³ e la viscosità *h* in Pa ·s) sono assimilabili a quelle dell'acqua.

In Tabella 1, sono riportate le condizioni idrodinamiche riferite alle portate volumetriche utilizzate. Per tutte le condizioni fluidodinamiche, risulta verificata la condizione di flusso laminare.

| Q (mL/min) | τ_w (Pa) | Re (-) |
|------------|---------------|--------|
| 0.25 | 1.49 E-04 | 1.39 |
| 0.50 | 2.78 E-04 | 2.78 |
| 1.5 | 8.33 E-04 | 8.33 |
| 3 | 1.67 E-03 | 16.67 |

Tabella 1. Valori di shear stresses e di Reynolds al variare della portata volumetrica in ingresso alla flow cell.

2.3. Simulazione numerica delle condizioni di flusso

Al fine di verificare le condizioni laminari del regime di flusso è stata condotta una simulazione numerica mediante l'analisi CFD (*Computational Fluid Dynamics*) del software COMSOL Multiphysics (versione 6.1). È stata scelta una custom mesh di tipo fine aventi circa 35000 nodi tetraedrali, la quale è stata infittita in corrispondenza dei bordi della celletta di flusso. Per la simulazione, sono state considerate le ipotesi di flusso newtoniano e laminare e regime stazionario. Le proprietà fisico-chimiche del mezzo nutriente che scorre all'interno della cella di flusso sono state assimilate a quelle dell'acqua e fenomeni di bordo alla parete della cella di flusso sono stati considerati trascurabili. Per ciascuna delle condizioni di flusso investigate, è stato ottenuto il profilo di velocità nel dominio 2D in corrispondenza dei seguenti piani: x=13 mm piano YZ e y=38 mm piano XZ. Successivamente, sono stati ottenuti i profili di velocità e di sforzo di taglio (*shear rate*) valutati in corrispondenza del centro della cella di flusso.

2.4 Microscopia confocale

È stata investigata la morfologia dei biofilm batterici al variare delle condizioni di flusso a valle delle 72 ore di crescita. In particolare, i vetrini ricoperti dal coating batterico sono stati analizzati mediante microscopia confocale. È stata effettuata una doppia marcatura dei campioni al fine di discernere alcune componenti del biofilm stesso attraverso l'uso di marcatori fluorescenti con eccitazione/emissione a differenti lunghezze d'onde. Le cellule batteriche sono state marcate mediante il marcatore verde fluorescente SYTO9TM (da LIVE/DEADTM Biofilm Viability Kit, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alla concentrazione di 3 µg/mL, mentre l'impiego del marcatore rosso TRITC Concanavalina A (Concanavalina A Tetra-metilrodamina coniugata, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alla concentrazione di 100 µg/mL ha consentito di marcare i legami α mannosi della matrice polisaccaridica. La marcatura è stata effettuata con 200 μL di ciascun marcatore al buio per 30 minuti. Sono state acquisite immagini dei campioni con un microscopio rovesciato (Nikon Eclipse Ti E, Nikon Corporation, Giappone). Sono stati ottenuti z-stacks lungo lo spessore del biofilm utilizzando un ingrandimento 40 X (Plan Apo λ 40 X/1.49 NA). L'eccitazione dei campioni analizzati è stata possibile mediante laser ad Argon alla lunghezza d'onda di 488 nm, avente un filtro di emissione a 498 nm e un laser ad elio alla lunghezza d'onda di 562.5 nm e un filtro di emissione a 580 nm, rispettivamente. Inoltre, per ogni campione, sono stati acquisiti tre campi di vista indipendenti aventi area dell'ordine di $10^5 \,\mu\text{m}^2$. Gli esperimenti sono stati effettuati almeno in triplicato.

2.5 Analisi delle immagini

Al fine di effettuare una quantificazione della morfologia delle strutture biologiche ottenute, gli z-stacks ottenuti dalla microscopia confocale sono stati processati mediante il software di analisi delle immagini, *COMSTAT 2.1*, uno script implementato in MATLAB da Heydorn *et al.* (2000) e successivamente sviluppato da Vorregaard (2015) nel software *Image J.* Il software è in grado di valutare parametri fisico-biologici quali la biomassa dei batteri adesi al supporto ($\mu m^3/\mu m^2$), il grado di copertura del biofilm (-), l'altezza del film (μm) e il coefficiente adimensionale di rugosità, Ra (-), valutato secondo l'equazione (4) e riportato da Recupido *et al.* (2020) and Di Somma *et al.* (2020). Tale parametro indica il grado di eterogeneità delle superfici rivestite dal *coating* batterico.

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left| \frac{L_i - L_F}{L_F} \right| \tag{4}$$

Dove L_i è i-esimo valore di spessore (µm), L_F è lo spessore medio (µm) e N è il numero degli spessori considerati. Dall'altra parte, la biomassa adesa è stata valutata come la somma del numero di *voxels* ("pixels" nelle 3 dimensioni) nei diversi piani orizzontali, acquisiti nel canale verde. Lo spessore del biofilm è stato, invece, determinato come la matrice delle altezze calcolato per ciascun piano orizzontale, valutato nel canale rosso. Infine, il grado di copertura è stato determinato come l'area occupata dai biofilm, espressa come percentuale della superficie totale.

3. RISULTATI

3.1 Simulazione numerica delle condizioni di flusso all'interno della cella di flusso In





Figura 2 come L) e passante per il punto z=1 mm e il piano trasversale XZ (riportato in Inlet



Figura 2 sono riportati la mesh utilizzata e i profili di velocità con le relative linee di flusso valutati in

Figura 2 come T) valutato nel punto y=38mm. A titolo di esempio, sono riportati i risultati della simulazione numerica considerando come portata volumetrica in entrata alla celletta di flusso 0.25 mL/min. In Figura 3 sono mostrati i profili di velocità (Figura 3a) e di shear rate (Figura 3b) in corrispondenza del centro della celletta di flusso lungo la direzione del flusso y.



Figura 2. a) Schematizzazione della celletta di flusso insieme alla mesh usata per la simulazione numerica. b-c) Profili di velocità con relative linee di flusso relativamente ai piani L e T. La simulazione numerica è stata condotta impiegando una portata volumetrica di 0.25 mL/min.



Figura 3. a) Profilo di velocità simulato (grafico a punti) e a seguito del fitting (linea continua). b) Profilo dello shear rate simulato (grafico a punti) e simulato (linea continua).

Dalla



Figura 2b e c si evince che il flusso risulta essere ben sviluppato all'interno della cella di flusso. Inoltre, il profilo di velocità risulta essere di tipo parabolico tipico del regime di flusso laminare (Figura 3a). Pertanto, l'assunzione di un canale rettangolare stretto aventi $W >> \delta$ (dove W è la larghezza e δ è il semispessore del canale) risulta essere verificata. Il profilo di velocità lungo la direzione y (v_y) in funzione dell'altezza del canale (direzione z) è ben descritto dall'equazione (5):

$$v_{y} = \frac{3}{2} \cdot v \cdot \left(1 - \left(\frac{z}{\delta}\right)^{2}\right) \tag{5}$$

Dove v è la velocità media all'interno del canale.

Analogamente, l'andamento dello sforzo di taglio, $\dot{\gamma}$ (Figura 3b), ottenuto come la derivata del profilo di velocità, in funzione della posizione z è di tipo lineare. I risultati ottenuti dalla simulazione numerica sono confrontabili con i valori ottenuti mediante il *fitting* dei dati della simulazione . Il valore della shear rate alla parete, $\dot{\gamma}_w$, calcolato dalla misura della portata volumetrica in ingresso alla *flow cell* è pari a 0.147 s⁻¹, che molto vicino al valore stimato dalla simulazione numerica (0.149 s⁻¹).

3.2 Morfologia dei biofilm batterici al variare delle condizioni di flusso

In Figura 4 sono riportate le massime proiezioni ortogonali degli z-stacks di biofilm ottenuti tramite microscopia confocale al variare delle condizioni di flusso. L'analisi della morfologia dei biofilm è stata ottenuta alla fine delle 72 h di incubazione.

Dalla Figura 4 si evince che la morfologia dei biofilm dipende fortemente dal flusso. A bassi sforzi di taglio, i biofilm sono costituiti da micro-colonie distribuite attorno alla matrice polisaccaridica. All'aumentare dello shear stress, prevalgono differenti morfologie. In particolare, prevalgono agglomerati batterici più densi e di spessore maggiore. Dall'altro canto, anche l'intensità della fluorescenza emessa dal marcatore cresce all'aumentare dello shear stress fino al valore di 0.83 mPa per poi diminuire. È altresì importante affermare che la struttura del biofilm è fortemente eterogenea. Tale eterogeneità può essere di tipo geometrico (spessore, rugosità, area di copertura del biofilm, porosità), di tipo chimico (concentrazione di nutrienti, presenza di metaboliti e di inibitori di crescita, variazioni di pH), di tipo biologico (differente attività cellulare) oppure infine di tipo meccanico (stabilità meccanica, permeabilità del biofilm, viscoelasticità della matrice polisaccaridica) (Tsagkari & Sloan 2018).

Un altro aspetto interessante che può essere messo in luce riguarda i dati di morfologia in corrispondenza del valore sperimentale di 0.83 mPa, corrispondente alla massima formazione di biofilm. Difatti, in corrispondenza di tale valore si assiste ad un'inversione di tendenza; per valori più bassi di 0.83 mPa, la struttura del biofilm appare come una matrice polisaccaridica porosa, all'interno della quale si distribuiscono gli agglomerati batterici, mentre a shear stress maggiore, predominano strutture tridimensionali formate da grossi *clusters* batterici. In tali condizioni, è altresì importante specificare che la morfologia dei biofilm è fortemente indotta dal flusso in modo tale da riarrangiare gli agglomerati batterici nello spazio trasversalmente alle linee di flusso (direzione y). A shear stress più elevati (1.67 mPa), prevalgono densi *clusters* batterici, dove si assiste una buona sovrapposizione del canale verde e rosso. Ciò implica che la matrice polisaccaridica è presente unicamente in corrispondenza dei clusters batterici e non in forma dispersa come nel caso dei biofilm ottenuti a shear più bassi.



Figura 4. Massime proiezioni ortogonali di z-stacks ottenuti tramite microscopia confocale al variare dello shear stress alla parete. Le immagini al confocale sono state ottenute mediante doppia marcatura dei campioni biologici. In particolare, le cellule batteriche sono state marcate mediante il marcatore fluorescente verde SYTO9TM, mentre la matrice polisaccaridica è stata marcata mediante il marcatore TRITC Concanavalin A nel canale rosso. Ingrandimento 40 X, scale bar 50 μ m.

Aspetti quantitativi della morfologia dei biofilm batterici al variare delle condizioni di flusso sono riportati in Figura 5. Sono stati analizzati parametri biologici e fisici quali la biomassa adesa al substrato solido ($\mu m^3/\mu m^2$), la superficie coperta da biofilm (%), lo spessore del biofilm (μm) e il coefficiente di rugosità medi adimensionale (-).

Si può osservare che, all'aumentare dello sforzo di taglio, la biomassa adesa al supporto solido (Figura 5 a) aumenta notevolmente (a τ_w =1.67 mPa è circa 7 volte in più rispetto a τ_w =0.149 mPa). Dall'altra parte, anche nel canale rosso la superficie ricoperta dal biofilm incrementa fino a 0.83 mPa per poi diminuire in corrispondenza del valore di shear più elevato (Figura 5b). Lo spessore del film batterico (Figura 5c) presenta un andamento simile a quello del grado di copertura del biofilm; tuttavia, nessuna variazione significativa è stata osservata ad elevati valori di sforzi di taglio. È inoltre possibile affermare che, ad elevati sforzi di taglio, i biofilm sono sviluppati per la maggior parte in altezza.

Nessun particolare andamento è stato osservato per quanto concerne il coefficiente di rugosità dei biofilm (Figura 5d). Questo implica che, nelle condizioni di flusso esaminate, risulta essere marginale il ruolo del flusso nel modificare le caratteristiche morfologiche della superficie del biofilm esposta all'erosione indotta dal flusso.



Figura 5. Parametri morfologici in funzione dello shear stress alla parete. a) biomassa (μm³/μm²) adesa al supporto solido. B) superficie ricoperta dal biofilm (%), c) spessore del biofilm (μm) e d) coefficiente di rugosità medio (-). I dati sperimentali sono riportati come la media e la deviazione standard di tre misure indipendenti.

4. DISCUSSIONE

In questo lavoro sono stati coltivati *in vitro* biofilm di un singolo ceppo batterico di *Pseudomonas fluorescens* in differenti condizioni di flusso. Allo scopo, è stato progettato e realizzato un set-up sperimentale costituito da un reattore a geometria planare (*flow cell*). Tale configurazione ha permesso di controllare il gradiente di velocità e gli sforzi di taglio, mediante regolazione delle portate volumetriche in ingresso al sistema e di ottenere velocemente condizione di regime stazionario. Inoltre, il reattore permette di analizzare la cinetica di crescita e la morfologia dei biofilm in flusso in maniera non invasiva nel tempo.

In questo lavoro sono state scelte quattro differenti condizioni di flusso corrispondenti ai seguenti valori di shear stress: 0.14 mPa, 0.28 mPa, 0.83 mPa e 1.67 mPa, e del numero di Reynolds (riportato nell'equazione 3): 1.39, 2.78, 8.33 e 16.67, rispettivamente. Tali condizioni di flusso corrispondono a valori di flusso che si realizzano in sistemi di flusso quali piccoli condotti e filtri industriali e apparecchiature medicali come riportato da Recupido *et al.* (2020). Inoltre, un'accurata valutazione delle condizioni idrodinamiche ha permesso di dimostrare che il flusso ottenuto risulta essere ben sviluppato e di tipo laminare con proprietà assimilabili a quelle dell'acqua.

In questo lavoro, è stato investigato il ruolo del flusso nella morfologia dei biofilm batterici. Allo scopo, la morfologia dei biofilm ottenuta è stata investigata tramite microscopia confocale e tecniche di analisi delle immagini.

Al variare delle condizioni di flusso, sono state ottenute strutture aventi differenti morfologie. A bassi sforzi di taglio, prevalgono strutture costituite da microcolonie batteriche distribuite da una matrice polisaccaridica porosa. All'aumentare dello sforzo di taglio, le strutture ottenute appaiono maggiormente dense e spesse. In tali condizioni, i biofilm appaiono strutture a colonna (in inglese column-like structures), come riportato da Zhang et al. (2011). I risultati ottenuti da questo lavoro sperimentale possono essere confrontati con quelli ottenuti da precedenti lavori sperimentali nell'ultimo ventennio, sebbene sia necessario affermare che i risultati relativi alla morfologia dei biofilm in flusso controllato siano poco esaustivi e spesso contraddittori. Pereira et al.(2002) hanno dimostrato che, in condizioni di flusso laminare, i biofilm appaiono più densi e spessi rispetto a quelli ottenuti in condizione di regime turbolento, a causa dei fenomeni erosivi indotti dal flusso. Tuttavia, in un lavoro successivo (Simões et al., 2007), i biofilm ottenuti ad elevati valori di shear rate risultano metabolicamente più attivi, ossia con un'elevata concentrazione di biomassa adesa e di contenuto di EPS rispetto a quelli ottenuti a valori di sforzo più bassi. Dall'altra parte, Zhang et al. (2011) hanno investigato la morfologia in flusso di *Pseudomonas aeruginosa* al varire del gradiente di velocità e del flusso di nutrienti, dimostrando che, a bassi valori di sforzo di taglio, si assiste ad una veloce crescita microbica dovuta a un maggiore apporto di nutrienti; tuttavia, ad elevati sforzi di taglio, la formazione del biofilm risultava essere inibita a causa di fenomeni di distacco (detachment) cellulare. Infine, Recupido et al. (2020) hanno analizzato il ruolo del flusso sulla morfologia e le proprietà di bagnabilità (*wetting*) di biofilm di *P.fluorescens*, dimostrando che la morfologia risulta essere fortemente indotta dal flusso. Inoltre, gli autori hanno analizzato la cinetica di formazione di biofilm in flusso mediante un approccio basato sull'analisi dei fenomeni di trasporto. In particolare, è stato valutato il trasporto di massa all'interno del biofilm in specifiche condizioni di flusso, dimostrando che la resistenza al trasporto di materia esterna (legata ai moti convettivi) risulta essere lo stadio limitante del processo di formazione del biofilm, pertanto regolando il trasporto di nutrienti e di ossigeno verso la struttura del biofilm stesso.

Tuttavia, al fine di avere una visione globale del fenomeno qui descritto, sarà necessaria una più dettagliata analisi della morfologia dei biofilm batterici incrementando l'intervallo degli sforzi di taglio. A tal fine potrebbe essere utile scindere gli aspetti cinematici da quelli meccanici, Investigando ad esempio condizioni di flusso differenti a parità di sforzi alla parete, utilizzando sostanze viscosizzanti quali alginato, PVP (Polivinilpirrolidone) o sostanze inerti come le microfibre all'interno del mezzo di coltura. A tal fine sarà ovviamente indispensabile una preventiva verifica dell'impatto di tali additivi sul metabolismo cellulare.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro, è stato presentato il ruolo del flusso sulla morfologia dei biofilm batterici. Sono stati coltivati biofilm di *Pseudomonas fluorescens* a singolo ceppo mediante flusso controllato. Allo scopo è stata impiegato un micro-bio-reattore a geometria planare, opportunamente costruito al fine di controllare il profilo di velocità e degli sforzi di taglio. La morfologia dei biofilm è stata investigata attraverso microscopia confocale e tecniche di analisi delle immagini. I risultati di questo lavoro sono qui riassunti.

La morfologia evidenziata dalla microscopia confocale manifesta una complessa dipendenza dallo sforzo di taglio in tutti i parametri calcolati dall'analisi delle immagini (spessore del film, densità della biomassa vitale, rugosità). In particolare, i biofilm formano strutture dense e spesse all'aumentare dello sforzo di taglio per poi subire parzialmente il distacco cellulare causato da maggiori velocità di deformazione. In maniera conclusiva, si può affermare che, nelle condizioni di flusso analizzate, l'aumento della velocità di deformazione risulta associato ad un aumento del coefficiente di scambio di materia, corrispondente ad un maggiore apporto di nutrienti, determinando in tal modo un aumento della biomassa e dello spessore delle strutture batteriche.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito di una collaborazione tra l'università di Napoli Federico II in Italia e la Aristotele University di Salonicco in Grecia. Si ringrazia l'associazione italiana di reologia-SIR per il supporto economico fornito tramite il finanziamento di una borsa di studio dal titolo "Aspetti reologici nella formazione di biofilm batterici".

BIBLIOGRAFIA

Berk V, Fong JCN, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J (2012), Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms, Science 337:236-239 doi: 10.1126/science.1222981.

Bird RB, Stewart WE, Lightfoot EN (2002), Transport Phenomena, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (USA).

Branda SS, Chu F, Kearns D B, Losick R, Kolter R (2006), A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix, Mol. Microbiol. 59:1229–1238, doi 10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x.

Busscher J, van Der Mei H (2006), Microbial adhesion in flow displacement systems, Clinical Microbiology Reviews, 19: 127-141.

Charlton SGV, White AM, Jana S, Eland LE, Jayathilake PG, Burgess JG, Chen J, Wipat A, Curtis TP (2019), Regulating, Measuring, and Modeling the Viscoelasticity of Bacterial Biofilms, Journal of Bacteriology 201:101.doi.org/10.1128%2FJB.00101-19.

Di Somma A., Recupido F., Cirillo A., Romano A., Romanelli A., Caserta S., Guido S and Duilio A., Antibiofilm Properties of Temporin-L on Pseudomonas fluorescens in Static and In-Flow Conditions, International Journal of Molecular Sciences 21(2020)8526, doi:10.3390/ijms21228526.

Epstein AK, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J (2011), Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration, Proc. Natl. Acad. Sci 108: 995-1000, doi.org/10.1073/pnas.1011033108.

Flemming, HC, Neu, TR, Wingender, J (2016), The perfect slime: microbial extracellular polymeric substances (EPS) Water Intelligence Online Digital Reference Library.

Flemming, HC, Wingender J (2010), The biofilm matrix, Nat. Rev. Microbiol., 8:623-633. doi.org/10.1038/nrmicro2415.

Garret TR, Bhakoo M, Zhang Z (2008), Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, Progress in Natural Science 18:1049-1056 doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001.

Gloag ES, Fabbri S, Wozniak DJ, Stoodley P (2020), Biofilm mechanics: implications in infections and survival, Biofilm 2:1-9. doi/10.1016/j.bioflm.2019.100017.

Grumbein S, Werb M, Optiz M, Lieleg O (2016), Elongational rheology of bacterial biofilms in situ, The Society of Rheology 60: 1085-1094 doi/10.1122/1.4958667.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S (2020), Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT, Microbiology 146: 2395-2407 doi: 10.1099/00221287-146-10-2395.

Jana S, Charlthon SGV, Eland LE, Burgess JG, Wipat A, Curtis TP, Chen J (2020), Nonlinear rheological characteristics of single species bacterial biofilms, Nature-Biofilms and Microbiomes 6:1-11. doi.org/10.1038/s41522-020-0126-1.

Kim MK, Ingremau F, Zhao A, Bassler BL, Stone HA (2016), Local and Global Consequences of Flow on Bacterial Quorum Sensing, Nature Microbiology 1:15005.

Pereira M.O., Khuen M., Wuertz S., Neu T., Melo L.F (2002), The effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilms, Biotechnology and Bioengineering 78-2, https://doi.org/10.1002/bit.10189 Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremau F, Syriaporn A, Drescher K, Wringreen NS, Bassler BL, Gitai Z, Stone HA (2015), The mechanical world of bacteria, Cell 161:988-997 doi.org/10.1016%2Fj.cell.2015.05.005.

Recupido F, Toscano G, Tatè R, Petala M, Caserta S, Karapantsios TD, Guido S (2020), The role of flow on bacterial biofilm morphology and wetting properties, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 192:11047 doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111047.

Rusconi R, Lecuyer S, Autrusson N, Guglielmini L, Stone HA (2011)., Secondary Flow as a Mechanism for the Formation of Biofilm Streamers, Biophysical Journal, 2011, 100 (6), 1392-1399.

Simões M., Pereira M.O., Sillankorva S., Azaredo J. and Vieira M.J. (2007), The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, Biofouling, 23 (4) 249 – 258, https://doi.org/10.1080/08927010701368476.

Stoodley P, Lewandoski Z, Boyle JD, Lappin Scott HM (1999), Structural Deformation of Bacterial Biofilms Caused by Short-Term Fluctuations in Fluid Shear: An In Situ Investigation of Biofilm Rheology, Biotecnology and Bioengineering 65:85-92.

Tsagkari E and Sloan W (2018), Turbulence accelerates the growth of drinking water biofilms, Bioprocess and Biosytems Engineering 41:757-770 https://doi.org/10.1007/s00449-018-1909-0.

Vorregaard M (2008), a modern 3D image analysis environment for biofilms, Technical University of Denmark, Kogens Lyngby, Denmark.

Wilking JN, Angelini T., Seminara A, Brenner MP, Weitz DA (2011), Biofilms as Complex Fluid, Materials Research Society 36: 385-391. doi.org/10.1557/mrs.2011.71

Zhang W., Sileika T.S., Cheng C., Liu Y., Lee J., Packman A.I. (2015), A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow-biofilm interactions, Biotechnology and Bioengineering 108(11): 2571-2582, doi:10.1002/bit.23234.