

JUNIO 2024

POLICY BRIEF N°16

*EL DESARROLLO DE **NUEVAS ESTRATEGIAS DE CONTROL Y TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS** BACTERIANAS EN **SALMONES** DEBE CONSIDERAR LA GENERACIÓN DE **BIOFILM***

Jaime Figueroa, María Alejandra Valenzuela, Alejandro Yañez y Alex Romero

ANTECEDENTES, ALCANCE Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Entre los desafíos más importantes de la salmonicultura, se encuentra la implementación de medidas de prevención y control de enfermedades de alto riesgo para salmónidos. Actualmente, para muchas enfermedades bacterianas se usan diversos productos con acción desinfectante y antimicrobiana, las que han sido ampliamente utilizadas para mejorar el estado sanitario de las poblaciones de peces en centros productivos. Más aún, el continuo uso de antimicrobianos ha contribuido a la aparición de bacterias menos susceptibles, afectar la microbiota de los peces y facilitar la diseminación de patógenos en el ecosistema. De igual forma, muchos de los patógenos bacterianos que producen brotes de enfermedades en los sistemas de cultivo poseen una serie de mecanismos de virulencia asociados a la formación de biofilm, tales como presencia de cápsula, formación de abundante lipopolisacáridos, sistemas de secreción y toxinas, entre otros. El *biofilm* o biopelículas corresponde a la formación de comunidades estructuradas, que le confiere a las bacterias y especialmente a microorganismos patógenos una diversidad de mecanismos de resistencia tales como: generación de enzimas que degradan compuestos antibacterianos, intercambio de genes intra- e inter-especies bacterianas, regulación de la actividad metabólica y tasa de crecimiento, entre otros. Estas características son de gran impacto, ya que les permiten a las bacterias resistir a condiciones ambientales hostiles e incrementar su resistencia al estrés ambiental y a los agentes antibacterianos, favoreciendo la permanencia de estos patógenos en una forma latente en los sistemas de cultivo y sus estructuras. El presente documento compila diversos estudios realizados por investigadores del Centro Incar, generando recomendaciones específicas acerca del rol de la formación de biofilm en la resistencia antibiótica y persistencia de las bacterias patógenas en ambientes acuáticos en torno a los centros de cultivo de salmónidos.



Formación de biofilm

El *biofilm* ha sido definido como un agregado de microorganismos en una matriz autoproducida conformada por ADN, ARN, proteínas, lípidos y sustancias poliméricas extracelulares y adheridas entre ellas y/o a una superficie, incluyendo también a las bacterias. Este es un sistema dinámico autoestructurado que se encuentra en constante remodelación y que puede adaptarse internamente a cambios ambientales. La matriz confiere protección a las bacterias contra condiciones medioambientales desfavorables como la desecación, radiación UV, metales, antibióticos, agentes oxidantes y durante la infección, evadir y/o bloquear los mecanismos del sistema inmune del hospedero. También puede contener una subpoblación de bacterias planctónicas, es decir, bacterias de vida libre que aún no son parte de la matriz. Éstas se movilizan por túneles o canales que existen al interior de la estructura, los que además permiten aumentar la disponibilidad de nutrientes y disminuyen el gradiente de sustancias dañinas para las bacterias y el *biofilm*.

La formación de *biofilm* constituye un proceso complejo, continuo y multifactorial, que surge en respuesta a condiciones ambientales que varían según cada microorganismo; los que pasan de un estado planctónico o de vida libre a un estado sésil (*biofilm*) adherido a una superficie biótica o abiótica. Para esto, se requiere de la activación de un tipo particular de señalización y la transcripción de diferentes conjuntos de genes en comparación a los de vida libre. En el mecanismo de formación del *biofilm* (Figura 1) se pueden distinguir cuatro etapas fundamentales: i) unión inicial de la bacteria a una superficie; ii) formación de una microcolonia; iii) maduración del *biofilm*; y iv) dispersión de células planctónicas, las cuales abandonan el biofilm para colonizar nuevamente y comenzar nuevamente el ciclo.

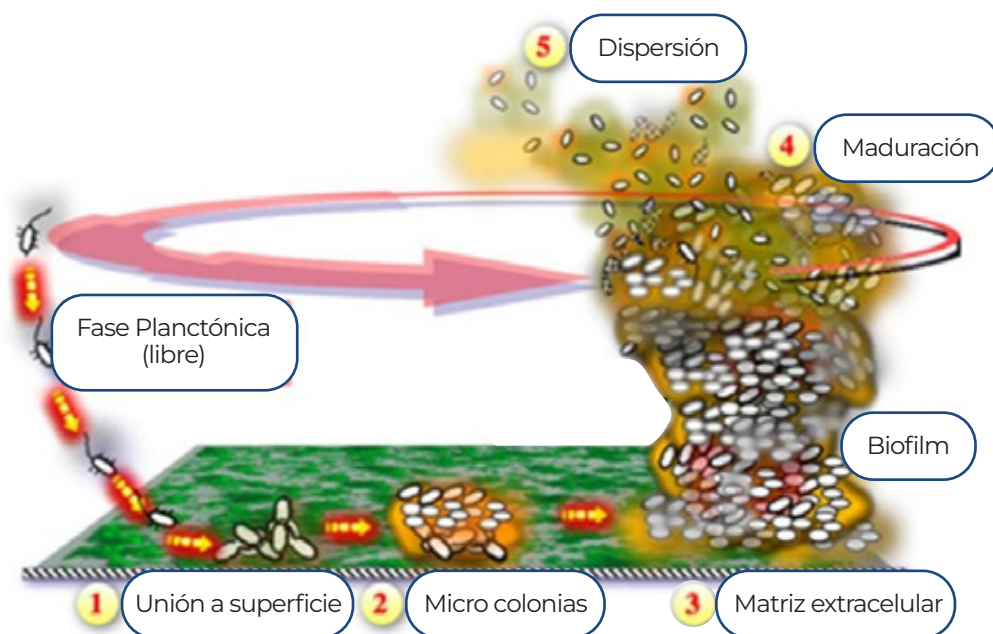


Figura 1.

Pasos esenciales en la formación de *Biofilm* bacteriano (Tomado de "*Bacteria Biofilm*", Dr. Yousef Elshrek).

Adhesión y colonización inicial, la bacteria planctónica se adhiere a una superficie utilizando apéndices celulares como pili, fimbria o flagelo y por la secreción de adhesinas. La bacteria se enfrenta a fuerzas atrayentes y repelentes dependiendo de las propiedades del medio, niveles de nutrientes, fuerza iónica, pH, temperatura y características propias de la composición de su superficie. Es un proceso reversible y dinámico debido a las débiles interacciones entre la superficie y los apéndices de la bacteria, constituyendo una etapa clave en el proceso de inicio del *biofilm*. La adhesión a una superficie provoca cambios en la expresión de genes y regulación positiva de factores que mantienen la adherencia. Una vez establecida la adhesión, se inicia la **Formación de una microcolonia** o multiplicación bacteriana originando agregados celulares comúnmente llamados microcolonias que secretan pequeñas cantidades de sustancias poliméricas extracelulares que conforman y estabilizan el *biofilm*. Estas microcolonias pueden corresponder a una o diversas especies bacterianas. En la etapa de **Maduración**, las bacterias se contactan entre sí mediante la producción de moléculas autoinductoras, que activan genes necesarios clave para la formación y estabilización de la matriz, y por consecuencia la diferenciación a macrocolonias. Asimismo, se liberan polisacáridos que le confieren estabilidad a la estructura. El *biofilm* maduro se caracteriza por presentar microcolonias en una compleja estructura tridimensional con canales de agua y abundante producción sustancias poliméricas extracelulares. En fase de **Dispersión**, las bacterias en estado sésil toman forma planctónica y se desprenden del *biofilm*, para colonizar nuevas superficies o áreas y dar origen a nuevas biopelículas. Ocurre una dispersión pasiva y a su vez, algunas bacterias se desprenden de forma activa. A medida que el *biofilm* madura, ocurre acumulación de productos tóxicos, fluctuación en las concentraciones de oxígeno, y los nutrientes se tornan limitados. Estos cambios son censados por las bacterias, se activan genes específicos, facilitando la dispersión ante condiciones estresantes y terminan conformando una biopelícula que otorga protección a la comunidad bacteriana contra agentes antimicrobianos. Así, las bacterias sésiles entran transitoriamente en un estado metabólico inactivo, disminuyendo la eficacia de los antibióticos y causando la recurrencia de enfermedades, debido a que el patógeno bacteriano se mantiene latente en el medio que habita su hospedero. También surge tolerancia, a través de la inactivación o atrapamiento de antimicrobianos por la matriz de las bacterias, a través de la formación de complejos con las sustancias poliméricas extracelulares, o bien son degradados por enzimas de la matriz.

Metodología

Previo al trabajo con los diferentes aislados de campo de *Piscirickettsia salmonis* y la cepa tipo LF-89 [ATCC VR-1361], estas fueron recuperadas de infecciones *in vitro* en la línea celular SHK-1, actividad que tuvo como objetivo la recuperación de la virulencia de cada *P. salmonis*. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en medio CASO modificado. Cada cultivo de medio líquido se incubó en un agitador a 18°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6-0,8 a longitud de onda de 600 nm. Se confirmó como pertenecientes a *P. salmonis* por Gram y PCR confirmatorio.

Cultivo bacteriano en medio líquido: El cultivo bacteriano de cepa tipo LF-89, y otros aislados de campo fue desarrollado en caldo de soja triptico modificado con NaCl, y suplementado con los nutrientes propios para esta especie bacteriana. Se tomaron tres alícuotas de bacterias del medio líquido y se extrajo ARN total para ensayos de qPCR.

Formación y cuantificación de *biofilm*: Todos los aislados de *P. salmonis* y la cepa tipo se crecieron sucesivamente en medio CASO. Después de un segundo y tercer pasaje de cultivo se evaluó la formación de *biofilm* en el primer y tercer pasaje de cada *P. salmonis*. Para la determinación cuantitativa de *biofilm* se emplearon placas de microtítulo de 96 pocillos con el protocolo modificado de Christensen (1985), incubando durante 3 días a 18°C. Luego, se retiró el medio de cultivo y se lavó con tampón fosfato estéril, incubándose a 37°C por 60 min para fijar el *biofilm* a la placa multipocillos y luego se realizó la tinción con solución de cristal violeta al 0,1% y se incubó durante 15 min. De acuerdo con los criterios descritos por Christensen (1985), la formación de *biofilm* es positivo cuando se ve una película de color violeta en la pared y/o en el fondo del pocillo. Posteriormente, se agregó ácido acético glacial a cada pocillo para solubilizar el tinte. Las placas se incubaron durante 15 min para finalmente registrar la OD_{600nm}. De forma similar, se determinó la formación de *biofilm* en otro tipo de superficies tanto bióticas como abióticas.



Resultados Más Relevantes

El *Biofilm* y su posible impacto en salmonicultura

En la salmonicultura, la formación de *biofilm* bacterianos genera un problema debido a la permanencia de bacterias patógenas después de aplicar los protocolos de desinfección y durante la aplicación de tratamientos antimicrobianos. Por ello, los *biofilm* constituyen un reservorio de microorganismos patógenos que pueden producir pérdidas económicas y que ponen en riesgo la sustentabilidad de la industria salmonera. En este sentido, las investigaciones con *Piscirickettsia salmonis*, causante de piscirickettsiosis en la salmonicultura chilena, han demostrado que la bacteria posee la capacidad de formar *biofilms* viables, estables y tolerantes al mucus de la piel de peces, pero también en superficies abióticas como microplacas y otros materiales inertes propios de la industria, así como condiciones bióticas como en cultivo de células y mucus de salmónidos (Levipan y col., 2020; Santibañez y col., 2020; Vidal y col., 2022). La formación de *biofilm* en *P. salmonis* en los dos genogrupos descritos para esta especie (LF-89 y EM-90), está modulada diferencialmente en medios restrictivos, regulando la expresión de genes asociados a virulencia. A su vez, la producción de *biofilm* se ve significativamente aumentada por condiciones tales como, medios de cultivos restrictivos en algún componente, salinidad cercana a condición de estuario y/o mar, bajas concentraciones de hierro (Santibañez y col., 2020).

Por su parte, concentraciones sub-inhedoras de florfenicol, el antibiótico más utilizado para el control de la piscirickettsiosis incrementa la formación de *biofilm* en *P. salmonis* (Oliver y col., 2023). Por lo tanto, el *biofilm* producido por este patógeno, podría considerarse un importante factor que puede influir en virulencia y cuya modulación tendría efectos relevantes sobre los mecanismos de persistencia ambiental y resistencia a la exposición de florfenicol.

Santibañez y col. (2020), utilizaron aislados pertenecientes a los genogrupos EM-90 y LF-89 de *P. salmonis* para estudios de infecciones *in vitro* y demostraron que el estado planctónico y sésil de *P. salmonis*, genera diferentes patrones de virulencia y expresión de genes que, aparentemente, depende de cada aislado y condiciones bacterianas evaluadas, lo que había sido reportado previamente por Levipan y col. (2020). Aunque el rol específico que cumple el *biofilm* en la virulencia no está del todo claro, la presencia y abundancia de *biofilm* sugiere que cumple una función biológica importante mediante la interacción con proteínas del hospedador y modula su respuesta inmune, quedando por demostrar el efecto en la patogénesis bacteriana en el hospedador (Santibañez y col., 2020).

Las diferencias de la producción de *biofilm* por parte de bacterias de ambos genogrupos, se podrían relacionar con la expresión diferencial de genes involucrados en el proceso de quimiotaxis de *P. salmonis*. Estudios realizados en este sentido, sugieren que esta bacteria regula su crecimiento, metabolismo y virulencia, reprogramando su fisiología al interior del *biofilm* como una forma de supervivencia y persistencia ante ambientes hostiles y probablemente en las primeras etapas de infección en el hospedero (Zuñiga y col., 2020). Por otro lado, la habilidad de *P. salmonis* para formar *biofilm* viable y tolerante a la acción antibacteriana del mucus en superficies plásticas en agua de mar representa un importante mecanismo para la persistencia y diseminación de la piscirickettsiosis en los peces de cultivo (Levipan y col., 2020). En este sentido, Vidal y col. (2022) reportan la formación de *biofilm* en superficies abióticas nylon, acero inoxidable, policarbonato y polietileno de alta densidad por parte de *P. salmonis* pertenecientes a ambos genogrupos. Los resultados obtenidos demuestran que la formación de biopelículas en nylon fueron significativamente mayor que en acero inoxidable, policarbonato y polietileno de alta densidad. De esta forma, los materiales empleados en los utensilios y estructuras de cultivos podrían ser un reservorio de la bacteria si no se limpian adecuadamente.

Por último, en este patógeno se ha identificado que la bacteria produce vesículas que contienen toxinas y proteínas claves para la supervivencia, pili y otras proteínas relevantes (Sanchez y col., 2018), todos ligados a procesos de adhesión a la superficie celular y la producción de biofilm, lo que da cuenta del establecimiento de una matriz que permite una alta interacción bacteriana mono o multi-especie. De igual manera, existen otros ejemplos de la producción y participación del *biofilm* en otras bacterias patógenas de salmónidos, tales como *Tenacibaculum maritimum* (Levipan y col., 2019), *Yersinia ruckeri*, *Vibrio sp*, *Aeromonas sp* y *Edwardsiella tarda*. Por tanto, es fundamental considerar el papel de los *biofilm* en enfermedades infectocontagiosas que poseen una alta persistencia en la salmonicultura chilena y que afectan la sustentabilidad de este sector productivo.

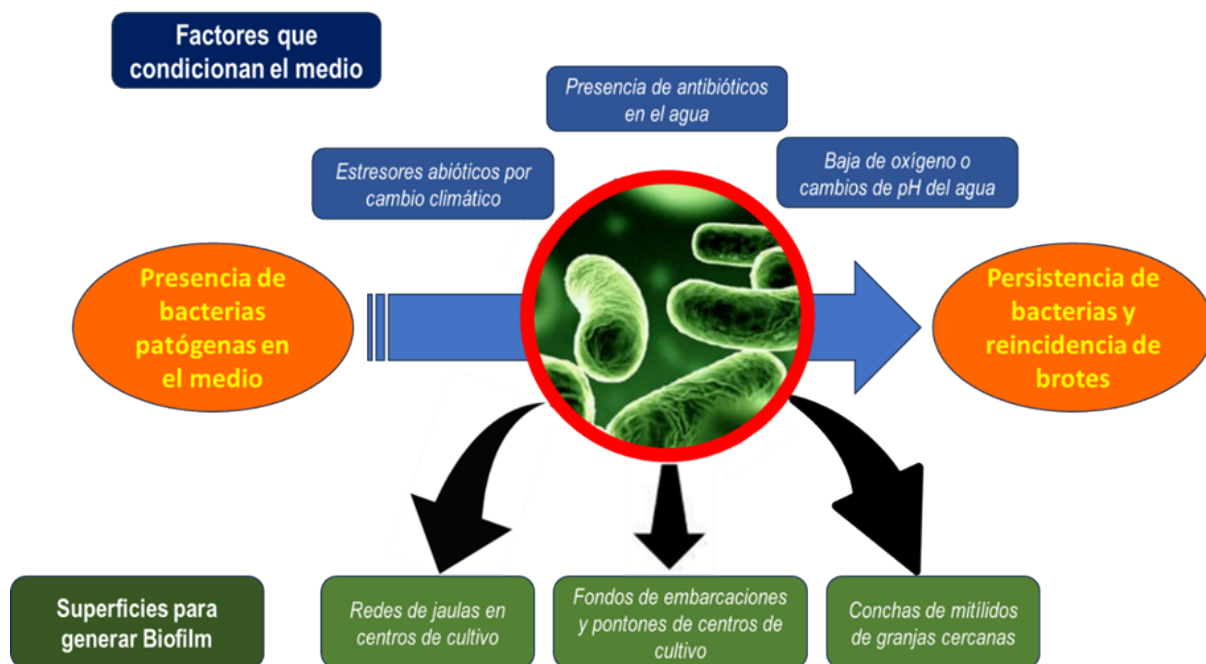


Figura 2.

Factores que influyen en la capacidad de las bacterias de formar *biofilm* en diversas superficies bióticas y abióticas y persistencia de bacterias en el medio acuático marino.

La figura 2, evidencia en forma frágica el rol que puede tener la formación de biofilm en la persistencia de los patógenos que son capaces de formarlo como estrategia de supervivencia. Lo anterior, no sólo influiría en las características propias de virulencia de las bacterias antes mencionadas, las que se relacionan a la adhesión a superficies de diversos materiales constituyentes de estanques, sistemas de flujo de agua y mallas, sino que también a estrategias de persistencia ambiental, reservorios naturales en peces nativos y otros organismos de cultivo masivo como Mitílidos y mecanismos de resistencia a desinfectantes y agentes antibacterianos. En este sentido, la matriz de poliméricas extracelulares de bacterias juega un rol clave en la estabilidad estructural del biofilm y actúa como barrera frente a diversos antibióticos debido a la inactivación o atrapamiento de éstos por la matriz, otorgando tolerancia y resistencia. Los componentes de la matriz pueden “quelar” o “atrapar” los antibióticos formando complejos inactivos. Polisacáridos como alginato y glucanos presentes en el biofilm pueden unirse o secuestrar antibióticos aminoglucósidos.

Además, los antibióticos pueden ser degradados e inactivados por las enzimas presentes en la matriz. Como resultado, los antibióticos no alcanzan una concentración efectiva para matar las bacterias, generando supervivencia de éstas aún después de la exposición. Asimismo, la tasa de crecimiento de las bacterias que residen en el biofilm va disminuyendo, asociada a una gradiente de oxígeno descendiente hacia la profundidad de la matriz.

Finalmente, el *biofilm* producido por *P. salmonis* y otros patógenos bacterianos marinos, podría considerarse un importante factor de virulencia, así como un buen candidato para el futuro desarrollo de nuevos y mejores agentes antimicrobianos. Además, la regulación de la expresión génica por *P. salmonis* planctónico y sésil *in vitro*, podría considerarse un componente clave que afecta la respuesta inmune de los peces.

CONCLUSIONES

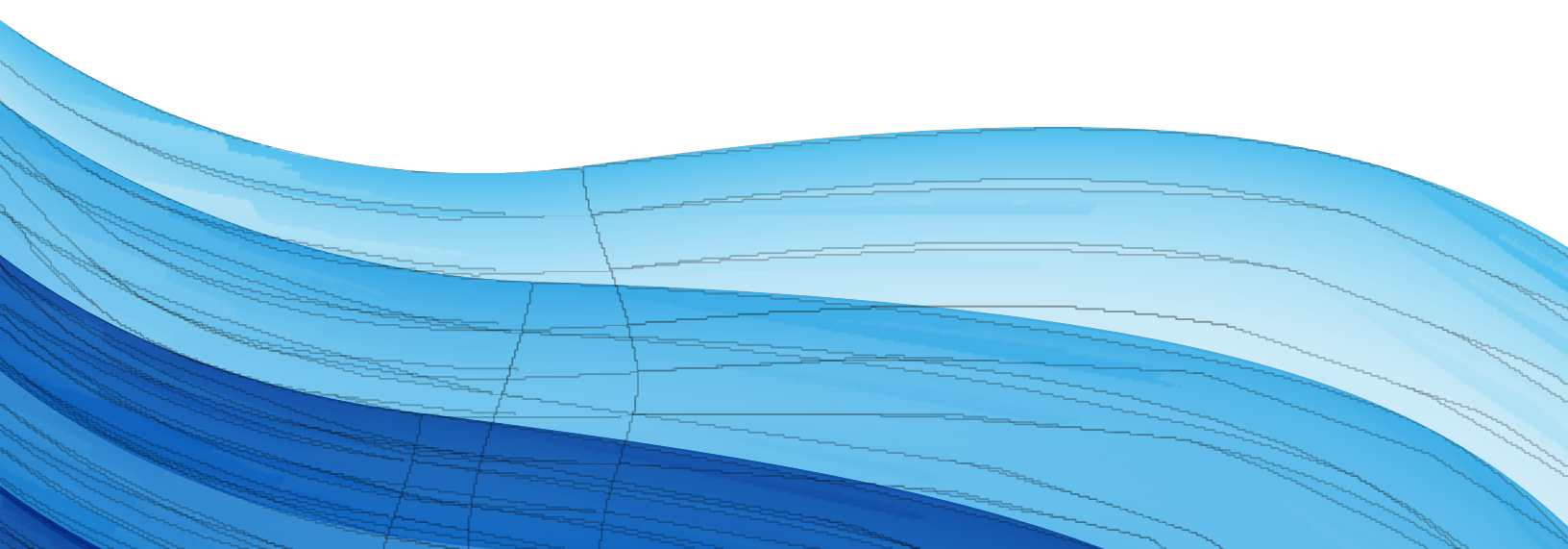
- ▶ Se puede establecer que la producción de *biofilm* en bacterias patógenas de salmónidos, puede constituir un mecanismo de persistencia en el ambiente, con importantes repercusiones económicas asociada a mortalidad y gastos en tratamientos.
- ▶ Una amplia variedad de condiciones ambientales determina la formación de *biofilm* en el hospedero y materiales utilizados comúnmente en salmonicultura, según lo cual, las bacterias patógenas incluidas en esta revisión son capaces de adherirse, constituir micro colonias y formar un biofilm estable en el tiempo y resistente a tratamientos de antibióticos.
- ▶ La forma sésil bacteriana constituye una fuente de persistencia ambiental y diseminación de agentes bacterianos patógenos a flujos de agua natural, pudiendo repercutir de manera indirecta a la vida silvestre acuática y terrestre.





Recomendaciones para Políticas Públicas y Gestión de Bioseguridad

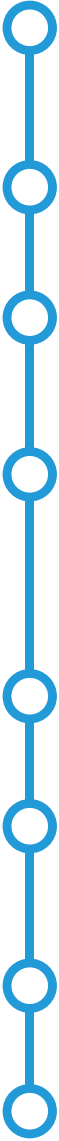
- ▶ Se deben tomar los resguardos necesarios en procesos que impliquen la limpieza, reemplazo y cambio de redes y estructuras de jaulas y superficies marinas de granjas y en pisciculturas de agua dulce, por la alta posibilidad de liberar al ambiente bacterias establecidas como biopelículas en todo tipo de superficie.
- ▶ Ampliar el estudio de los reservorios naturales de estas bacterias, junto a su patogenia, mecanismos de infección y los factores de virulencia asociados, para permitir mejorar significativamente las estrategias de control y tratamiento de los brotes en los sistemas productivos.
- ▶ Desarrollar nuevas estrategias para la prevención y tratamiento antibacteriano, dirigidos a reducir y/o inhibir la producción de *biofilm*. Ello debería mejorar la acción de los antibióticos que actualmente son utilizados en la salmonicultura disminuyendo la resistencia antimicrobiana y optimizando la calidad del salmón para el consumo humano.



AGRADECIMIENTOS

Centro INCAR, FONDAP-ANID 1522A0004 y 1523A0007

REFERENCIAS

- 
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clinical. Microbiology*. 1985;22:996–1006
- Levipan, H. A., Irgang, R., Yáñez, A., & Avendaño-Herrera, R. (2020). Improved understanding of biofilm development by *Piscirickettsia salmonis* reveals potential risks for the persistence and dissemination of piscirickettsiosis. *Scientific Reports*, 10(1).
- Levipan, H. A., Tapia-Cammas, D., Molina, V., Irgang, R., Toranzo, A. E., Magariños, B., & Avendaño-Herrera, R. (2019). Biofilm development and cell viability: An undervalued mechanism in the persistence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture*, 511(734267), 734267. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734267>
- Oliver, C., Céspedes, C., Santibañez, N., Ruiz, P., & Romero, A. (2023). Subinhibitory concentrations of florfenicol increase the biofilm formation of *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 46, 591–596.
- Ruiz, P., Sepúlveda, D., Vidal, J. M., Romero, R., Contreras, D., Barros, J., Oliver, C. (2021). *Piscirickettsia salmonis* produces a N-Acetyl-L-Homoserine Lactone as a bacterial quorum sensing system-related molecule. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1059.
- Sánchez, P., Oliver, C., Hernández, M., Cortés, M., Cecilia Rauch, M., Valenzuela, K., Yáñez, A. J. (2018). In vitro genomic and proteomic evidence of a type IV pili-like structure in the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *FEMS microbiology letters*, 365(16), 169.
- Santibañez, N., Vega, M., Pérez, T., Yáñez, A., González-Stegmaier, R., Figueroa, J., Enríquez, R., Oliver, C., & Romero, A. (2020). Biofilm Produced In vitro by *Piscirickettsia salmonis* Generates Differential Cytotoxicity Levels and Expression Patterns of Immune Genes in the Atlantic Salmon Cell Line SHK-1. *Microorganisms*, 8, 1609.
- Vidal JM., Ruiz P., Carrasco C., Barros J., Sepúlveda D., Ruiz-Tagle N., Romero A., Urrutia H*, & Oliver C. (2022). *Piscirickettsia salmonis* forms a biofilm on nylon surface using a CDC Biofilm Reactor. *Journal of Fish Diseases*, 45, 1099– 1107.
- Zúñiga, A., Solis, C., Cartes, C., Nourdin, G., Yáñez, A., Romero, A., Haussmann, D., & Figueroa, J. (2020). Transcriptional analysis of metabolic and virulence genes associated with biofilm formation in *Piscirickettsia salmonis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 367(21).

Las Fotografías de este documento son referenciales y alguna de ellas creadas con IA.



www.centroincarc.cl