

## Biofilmes, escenarios de biodiversidad

Zamora A<sup>1</sup>, de la Rosa MA<sup>2</sup>, Mosso MA<sup>2</sup>, Guijarro JF<sup>3</sup>, Rodríguez, C<sup>2</sup>

*Sanid. mil.* 2009; 65 (4): 246-258

### RESUMEN

Los biofilmes bacterianos o biopelículas son comunidades estratificadas de células embebidas en un polímero extracelular y adheridas a una superficie sólida en un medio acuático; están constituidos por una única especie o por especies diferentes. Se organizan en comunidades complejas autorreguladas gracias a un eficaz sistema de comunicación, protegiéndose frente a los agentes hostiles mediante la construcción con materiales propios, de una estructura de arquitectura particular y dotada de una red interior de canalizaciones, que garantiza el abastecimiento de agua, nutrientes y gases a la mayoría de los integrantes. Además, a través de modificaciones de estas señales químicas, células individuales o pequeños grupos se destacan en avanzadas sobre el terreno y, tras afianzarse sobre la posición, retoman la pausada pero inexorable invasión de un hábitat. El deterioro de los cascos de los buques de guerra; la biocorrosión del armamento y de otros materiales de aleación –o no metálicos– susceptibles de humedecerse; la biodegradación de excedentes de trinitrotolueno; la presentación de infecciones alimentarias por contaminaciones cruzadas; la incidencia de patologías bucodentales; las infecciones pertinaces en las heridas crónicas; la contaminación de las redes de distribución de agua de los acuartelamientos; la aparición de limos en las paredes de los depósitos de instalaciones interiores, en los aljibes o en las fuentes de los comedores colectivos militares; la persistencia de *Legionella* spp. en las torres de refrigeración o la antibiorresistencia de infecciones surgidas tras la implantación de prótesis articulares o de cualquier otro dispositivo de uso clínico, son situaciones frecuentes en cuya gestación y evolución posterior, intervienen microorganismos formando biofilmes. En este trabajo se describen las distintas etapas que conducen a su desarrollo, los mecanismos de regulación y las estrategias que les permiten sobrevivir en un medio desfavorable, venciendo la acción de los biocidas o la respuesta inmunitaria del hospedador.

**PALABRAS CLAVE:** Biofilmes, Biotapetes, Comunidades bacterianas, *Quórum sensing*, Expolímeros

### Biofilms, scenarios of biodiversity

**SUMMARY:** Bacterial biofilms are stratified microbial communities imbibed in an extracellular polymer and adhered to a solid surface in an aquatic environment. They might be integrated by one or several species and are organized in complex communities self-regulated by an efficient communication system. They protect themselves against hostile agents assembling with their own materials a peculiar architecture with an interior network of channels guaranteeing the supply of water, nutrients and gases to the majority of its components. Moreover, through the modulation of these chemical signals, individual cells or small groups detach themselves and occupy new grounds initiating the slow but inexorable invasion of a habitat. The damage to the warships' hull; biocorrosion of the weaponry and other alloy materials – or non metallic ones- susceptible to moisture; biodegradation of excess of trinitrotoluene; foodborne diseases due to cross contaminations; oral pathologies; persistent infections in chronic wounds; contamination of the water supply in military barracks; development of slime on the walls of the water tanks, in cisterns or fountains of the military barracks dining-halls; persistence of *Legionella* spp in the cooling towers or the antibiotic resistance in infections after implantation of joint prosthesis or any other clinical device; these are frequent situations in which biofilm-producing microorganisms participate in their emergence and evolution. In this article the different phases leading to their development are described, the regulation mechanisms and the strategies that allow their survival in a hostile environment against the action of the biocides or the immune response of the host.

**KEYWORDS:** Biofilms, Biocovers, Bacterial communities, Quorum sensing, Expolymers

### INTRODUCCIÓN

*De muchos, uno:* unidad en la diversidad, unidad en la complejidad. Nos referimos a los biofilmes o biopelículas y los tapetes microbianos, comunidades estructuradas de microorganismos y forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Si obser-

vamos con atención, encontramos multitud de ejemplos de su desarrollo. Aparecen formando las estructuras pegajosas que se generan en los desagües de los fregaderos, en las cortinas de las duchas, en las conducciones de agua, son responsables del oscurecimiento superficial de las cerdas de los cepillos de dientes. Se encuentran en las mucosas, en los bordes anfractuados de las heridas infectadas, en las infecciones vaginales y recubriendo las vías respiratorias de los enfermos de fibrosis quística, en la lengua, en los dientes, y en los implantes médicos. Están presentes sobre la superficie de las rocas de las zonas umbrías húmedas, en los cascos de los barcos, en el interior de los aljibes, en las superficies de aspecto limoso de las carnes crudas fileteadas, y aunque no se aprecien a simple vista, en los filos de los cuchillos de cocina, en las tablas de corte y sobre las superficies donde se manipulan alimentos. Se trata de poblaciones de microorganismos que viven adheridos a una superficie sólida o

<sup>1</sup> Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos, Centro Militar de Veterinaria de la Defensa, Madrid.

<sup>2</sup> Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>3</sup> Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Central de la Defensa «Gómez Ulla». Madrid.

**Dirección para correspondencia:** Carmina Rodríguez. Email: carmina@farm.ucm.es

Recibido: 8 de mayo de 2008

Aceptado: 9 de julio de 2009

interfaz líquido-aire o aceite-agua, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares, estructuradas y autorreguladas como si de minúsculas ciudades se tratara. Surgen siempre que dispongan de humedad y de nutrientes suficientes; y su formación y desarrollo se hallan regulados mediante un sistema molecular de señales cuyo patrón de expresión génica difiere del de sus homólogos planctónicos o de vida libre. Por tanto, dado que los biofilmes representan a la mayoría de las bacterias en casi todos los ecosistemas, no parece razonable extrapolar sobre éstos los resultados obtenidos en los estudios de formas planctónicas.

Pero ¿de dónde proviene el concepto de biofilme? ¿en qué momento empezaron a interesarnos? Si el 95-99% de las bacterias forman habitualmente biofilmes en la naturaleza, ¿por qué son precisamente ahora objeto de tanta atención? ¿es posible que estemos tan acostumbrados a convivir con ellos, que hayan pasado desapercibidos? ¿O que por el contrario, que su estudio haya sido recurrente durante el pasado siglo, siempre que se aplicasen métodos directos de observación de las poblaciones naturales de los microorganismos en sus ecosistemas reales? Contemplando los avances científicos desde la atalaya de la perspectiva histórica, se observa cómo los conceptos científicos son el resultado del desarrollo histórico del pensamiento y los avances técnicos de cada época.

Cuando en septiembre de 1675 Anton van Leeuwenhoek observaba la presencia de diminutos «animálculos» en el agua de lluvia retenida en una bañera o, en 1692, los describía en el sarro de los dientes, los *biofilmes* entran en la historia de la Ciencia. No obstante, la idea de que las bacterias crecen preferentemente adheridas a las superficies, en sus ecosistemas, no llegó hasta doscientos cincuenta años después. Las limitaciones intrínsecas a su naturaleza microscópica hacían preciso separarlas de sus ecosistemas nativos, siendo necesario para su identificación aislarlas en cultivos axénicos o puros, donde crecen fundamentalmente como células planctónicas o de vida libre (flotando, en cultivos líquidos). Los trabajos de Louis Pasteur en 1881 y de Robert Koch en 1883, sobre el aislamiento e identificación de las bacterias en cultivo puro y en medios sólidos, que abrieron el camino para el estudio de la diversidad microbiana y el desarrollo de los métodos de clasificación y de la etiología de las enfermedades, dieron lugar al paradigma del «cultivo puro». Éste se mantuvo hasta los años treinta del siglo XX, en que S. Winogradsky, N. Cholodny, H. J. Conn y A. T. Henrici, observaron que el crecimiento de las bacterias del suelo adheridas a portaobjetos difería de las cultivadas a partir de la fase acuosa, y que la mayoría de las bacterias del agua no están flotando libremente sino adheridas a superficies<sup>3-6</sup>. Empezaban a estudiarse las bacterias en sus medios naturales. Entre los años treinta y cuarenta, los trabajos de E. C. Zobell —uno de los pioneros de la microbiología de los biofilmes a los que denominó *filmes adheridos*<sup>7-8</sup>—, contribuyeron decisivamente a un cambio de paradigma. La importancia de las interacciones entre los microorganismos, los nutrientes y su adhesión a las superficies, adquirieron un gran protagonismo. En estos años se va produciendo un cambio en el pensamiento y enfoque científicos que cristalizan, en 1978, con la definición por J. Costerton de la vida microbiana en la naturaleza «en función de las relaciones que los microorganismos mantienen entre sí —en asociaciones estructuradas— y con el medio ambiente»<sup>9</sup>. Se produce, por tanto, una transición desde una aproximación reduccionista a una percepción holística de los sistemas biológicos como sistemas integrales que interactúan y evolucionan conjun-

tamente<sup>10-11</sup>. Este cambio de paradigma ilustra cómo el pensamiento científico ha cambiado a lo largo de la historia y especialmente desde los años treinta hasta hoy, evolución anticipada por Karl Popper<sup>12</sup> en «La lógica del pensamiento científico» y por Ludwick Fleck<sup>13</sup> en «La génesis y el desarrollo de un hecho científico». Para L. Fleck «el progreso del conocimiento consiste en el desarrollo colectivo incesante del estilo de pensamiento». Fue precisamente en la obra de Fleck en la que Thomas S. Kuhn<sup>14</sup> basó su «Estructura de las revoluciones científicas», donde se analiza qué hace que un grupo de científicos abandone una tradición de investigación a favor de nuevos paradigmas, considerados «como realizaciones científicas universalmente reconocidas que, durante cierto tiempo, proporcionan modelos de problemas y soluciones a una comunidad científica».

### CONCEPTO DE BIOFILME Y DE BIOTAPETE

Los biofilmes y los tapetes microbianos se definen como comunidades complejas, diferenciadas y estratificadas, de células embebidas en polímeros extracelulares y adheridas a una superficie sólida en un medio acuático<sup>15</sup>, en la interfaz líquido-aire o líquidos de diferente densidad como aceite-agua. Pueden estar constituidos por una única especie o por un abanico de especies diferentes<sup>16</sup>.

En general, los biofilmes cubren superficies sólidas, la mayoría están formados por microorganismos heterótrofos que dependen de la superficie o del agua circundante como fuente de nutrientes y alcanzan un grosor máximo de unos pocos milímetros. En cambio, los tapetes microbianos o biotapetes suelen establecerse sobre los sedimentos de las aguas poco profundas, de condiciones hidrodinámicas estables. Son habituales en hábitats que muestran unas condiciones ambientales extremas, tales como los manantiales de aguas termales o las aguas hipersalinas<sup>17</sup>. Presentan una alta densidad de población de microorganismos fotoautótrofos localizados en los estratos superiores, que actúan como productores primarios y desarrollan la matriz del tapete, pudiendo adquirir un espesor de varios centímetros (Tabla I).

A pesar de estas diferencias fundamentales, ambos comparten muchas características. Representan comunidades con estrategias complejas, adaptadas a la vida microbiana sobre superficies sometidas a gradientes extremos de variables fisicoquímicas. Han sido de máxima importancia a lo largo de las distintas eras geológicas para la evolución de la vida en nuestro planeta, en la mayoría de los ecosistemas acuáticos<sup>18</sup>. Se encuentran en todos los ambientes donde existan bacterias: en el medio natural, en el sanitario o en el industrial y sólo requieren un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, puesto que pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas y orgánicas o inorgánicas<sup>19</sup>.

### BIOFILMES COMO MODELO DE DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO

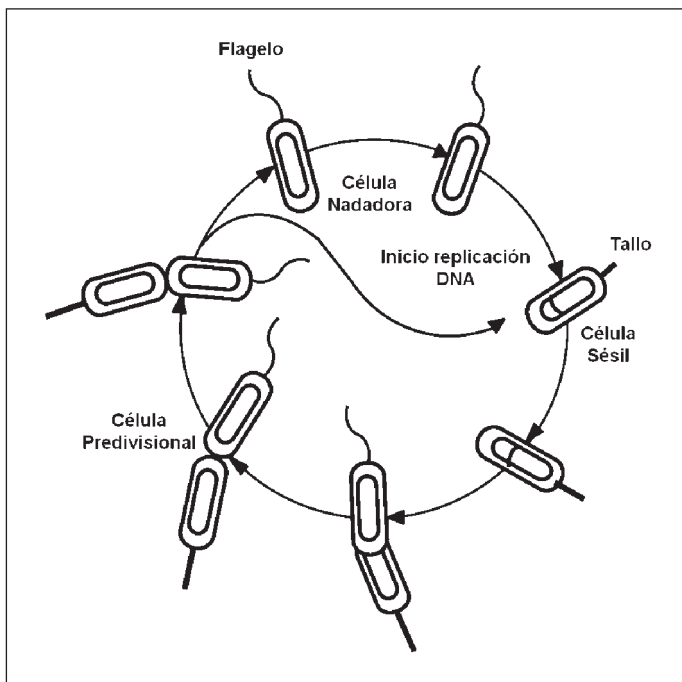
El «desarrollo microbiano» puede definirse como «los cambios en la forma y en la función que son esenciales en el ciclo de vida del organismo, inducidos por sistemas de señalización ambientales» (Shimkets y Brun<sup>20</sup>). Hasta el momento, los modelos microbianos para el estudio de la diferenciación, el desarrollo y el comporta-

**Tabla I.** Clasificación de los biofilmes y tapetes microbianos<sup>26</sup>

Interfase	Estructura	Microorganismos
Sólido-líquido	Monocapa	Una o varias especies. <i>Citrobacter</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Tapete	Fotosintéticos
		Metanógenos
		Sulfato-reductores
		Procedentes de estaciones de tratamiento de aguas residuales
	Placa dental	Cerca de 700 especies
	Con forma de cinta	Poblaciones bacterianas mixtas
Con forma de seta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i>	
	Sedimentos: bentónicos y de lechos fluviales; y copos en suspensión	Diversas especies
Líquido-aire	Capa primitiva sobre interfase	<i>Vibrio</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.
	Masas deformes	Hongos medusomicetos («Kombucha»: simbiosis de bacterias del ácido acético y levaduras)
	Biofilmes de consistencia ligera o laxa	<i>Bacillus</i> y otros géneros

miento celular mejor conocidos son : *Caulobacter crescentus* y *Dictyostelium discoideum*.

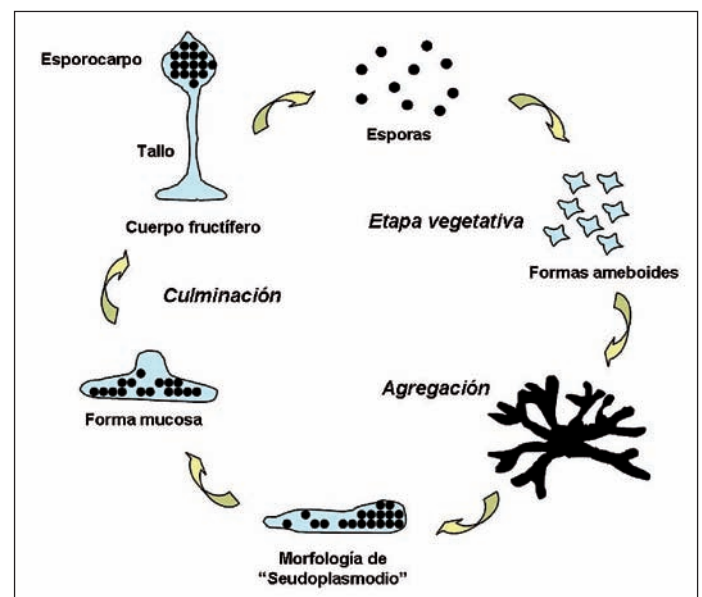
*Caulobacter crescentus* es una bacteria Gram negativa oligotrofa, distribuida ampliamente en el suelo, el agua dulce y el agua marina, que desempeña una función importante en el ciclo del carbono. Desarrolla un ciclo vital dimórfico en el que el proceso de división es intrínsecamente asimétrico (Figura 1a), dando una progenie morfológicamente distinta y con diferentes trayectorias: formas natatorias y células sésiles. Las primeras disponen de un flagelo con el que pueden nadar, son incapaces de dividirse, pero se pueden diferenciar a una forma sésil. Sólo en las células no nadadoras se produce la re-



**Figura 1a.** Ciclo de vida de *Caulobacter crescentus*.

plicación del genoma y la división celular; éstas pueden mantenerse fijas a una superficie mediante una especie de tallo que segrega un material adhesivo en el extremo y dar origen a células nadadoras<sup>21</sup>.

*Dictyostelium discoideum* es un hongo mucoso perteneciente a un grupo monofilético independiente (Mycetozoa), vive habitualmente en el suelo, se alimenta de bacterias y se multiplica por fisión binaria. En ausencia de nutrientes, las células inician un programa de desarrollo que implica una comunicación celular (Figura 1b). Las formas ameboides se agrupan dando lugar a un «seudoplasmodio» y posteriormente forman un cuerpo fructífero (estructura multicelular que contiene esporas) generalmente unido a un tallo compuesto por formas ameboides muertas. La germinación de las esporas origina nuevas formas ameboides y el ciclo se completa. El agente quimio-táctico (AMP cíclico) atrae a otras formas ameboides del entorno



**Figura 1b.** Ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum*.

que convergen y forman un montículo o cúmulo, aglutinando hasta 100.000 células. La estructura se compacta, se alarga y se convierte en una forma mucosa capaz de desplazarse en busca de luz y de condiciones adecuadas para terminar su desarrollo. La estructura final consta de un tallo unido a un esporocarpo con miles de esporas; presenta al menos dos tipos celulares perfectamente diferenciados: las células del tallo y las esporas. Las proteínas de *Dictyostelium discoideum* implicadas en estas rutas comparten homología de secuencia y función con las de los metazoos, por lo que esta especie también constituye un modelo interesante para el análisis de los procesos comunes a todos los organismos eucarióticos<sup>22-23</sup>.

En la actualidad, varios autores consideran la formación de los *biofilmes* como un nuevo sistema modelo de diferenciación<sup>24-26</sup>, ya que se caracteriza por las cuatro etapas comunes a todo proceso de desarrollo: adhesión y agregación; producción de una matriz extracelular; expresión génica coordinada y comunicación; y heterogeneidad morfológica. Si bien los mecanismos moleculares que regulan dichas etapas varían según las especies, los resultados son similares.

La observación de los *biofilmes* desarrollados en ecosistemas naturales, muestra una organización básica en la que las células crecen embebidas en una matriz y separadas por una red de canales de agua circulante; y pueden desplazarse o disgregarse para colonizar otros hábitats (Figura 2). La importancia de esta fantástica estructura radica en que demuestra un complejo nivel de organización que requiere de un sistema sofisticado de comunicación intercelular y un alto grado de especialización celular. Se trata de un proceso de desarrollo único en Biología, ya que supone que la actividad coordinada de varios genomas procarióticos, dé lugar a una comunidad microbiana multicelular funcional. Apenas se ha empezado a descifrar el sistema de señales ambientales y de respuestas fenotípicas que modelan las comunidades de multispecies microbianas, predominantes en la mayoría de los ecosistemas, pero las mismas comunidades muestran un proceso de diferenciación y desarrollo llamativamente complejo. Para Stoodley *et al.*<sup>25</sup>, este concepto alteraría la posición de las bacterias en la jerarquía de los seres vivos, puesto que las células individuales que tan tenazmente se han estudiado en los cultivos planctónicos, son realmente miembros de comunidades multicelulares coordinadas cuya complejidad y sofisticación está comenzando a apreciarse ahora. Los cambios celulares para adaptarse a la vida adherida a una superficie, constituyen la esencia del desarrollo en la formación de los *biofilmes*, por lo que podrían considerarse como un nuevo sistema modelo para el estudio del desarrollo y diferenciación microbianos.

### FORMACIÓN DE BIOFILMES: FASES DE DESARROLLO

Un *biofilme* inicia su formación cuando algunas bacterias de vida libre se adhieren a una superficie. La capacidad de asentamiento de las células depende, entre otros, de factores ambientales como la temperatura y el pH; y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental o la presencia de adhesinas y de otras proteínas<sup>19</sup>. Tras la adhesión inicial, las células se multiplican originando una monocapa sobre la superficie y formando –al mismo tiempo– microcolonias. Las células modifican su comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura del *biofilme* maduro, mediante la producción de una matriz de

exopolímeros –constituida principalmente por exopolisacáridos– que cementará todo el conjunto y hará que otros microorganismos queden atrapados<sup>27</sup>. La morfología de los *biofilmes* varía según las especies y depende de factores microbianos, nutricionales, físicos y ambientales.

Si las condiciones ambientales son las adecuadas, el *biofilme* se extiende hacia zonas no colonizadas o libera algunas células, que recuperan las propiedades planctónicas y colonizan nuevas superficies. Durante el proceso de formación de un *biofilme* se han identificado cinco fases que transcurren de forma sistemática (Figura 2). Una primera fase en la que tiene lugar la adsorción reversible de las bacterias a la superficie, seguida de una unión irreversible, maduración (crecimiento y división), una segunda producción de exopolímeros, y el desarrollo final del *biofilme* con la dispersión de las células «colonizadoras»<sup>28</sup>.

### Adsorción reversible

La primera fase en la formación de *biofilmes* consiste en la adsorción reversible de las bacterias planctónicas a una superficie, atraídas por quimiotaxis. Dicha adsorción depende de diversos factores y puede realizarse por varios mecanismos, según las bacterias.

### Tipos de factores

Los factores que influyen sobre la formación de los *biofilmes* pueden agruparse en tres categorías: factores ambientales, puesto que la capacidad de asentamiento de la célula depende de señales ambientales que varían entre organismos, como la existencia de determinados nutrientes, la temperatura, la osmolaridad, el pH o la presencia de hierro y de oxígeno; factores bióticos, ligados a las propiedades del microorganismo; y otros factores relacionados con el flujo de líquido y la superficie de fijación.

La respuesta de las bacterias frente a las variaciones cuantitativas y cualitativas de los nutrientes en el medio es diferente según la especie e incluso la cepa considerada. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* forma *biofilmes* casi bajo cualquier circunstancia que permita su crecimiento, algunas cepas de *Escherichia coli* K-12 y *Vibrio cholerae* requieren medios suplementados con aminoácidos y *Escherichia coli* O157-H7 sólo crece en *biofilmes* cuando se encuentra en medios oligotróficos<sup>24</sup>.

El efecto de la temperatura sobre la adhesión microbiana es altamente específico para cada especie considerada. Se conocen dos modelos de dependencia de la temperatura. Según el primero, el número máximo de células fijadas coincide con la temperatura óptima de crecimiento, es decir los microorganismos se adhieren en condiciones normales para su crecimiento. Este modelo de dependencia se ha observado en algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter cloacae*. En el segundo tipo la máxima adhesión transcurre a temperaturas que no son las óptimas, e incluso a temperaturas elevadas incompatibles con el crecimiento de estos microorganismos, como es el caso de *Staphylococcus epidermidis*<sup>29</sup>.

De igual manera, la acción del pH sobre la adhesión de las bacterias depende de la especie considerada. Así, para *Enterobacter cloacae*, el pH óptimo de adhesión fluctúa entre 5,5 y 7, y por encima de este rango la adhesión es mínima<sup>26</sup>.



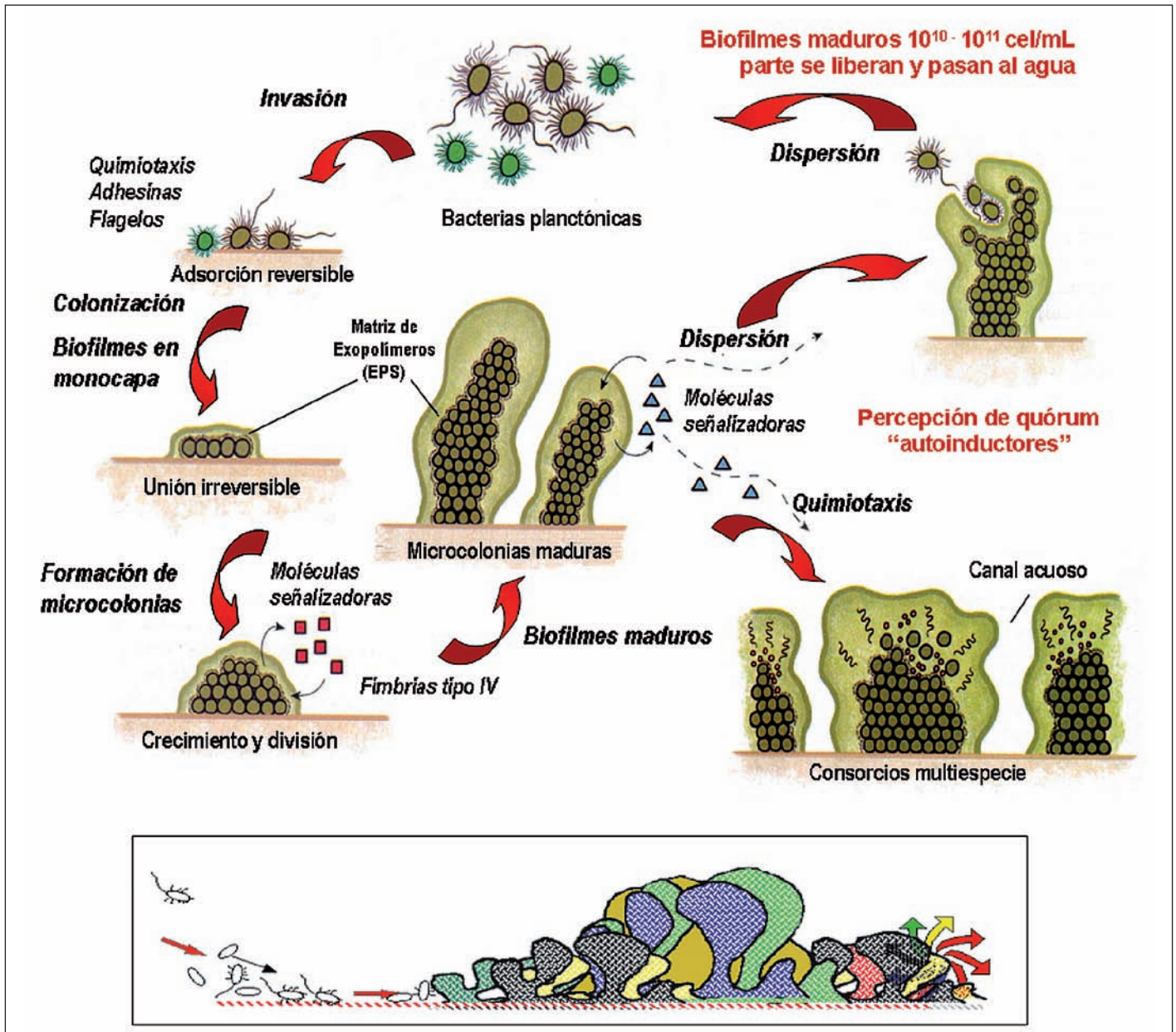


Figura 2. Fases del desarrollo de un biofilme. Modificado de Harrison et al.79 y Ghigo JM80.

En cuanto a la osmolaridad, un incremento de la fuerza iónica de la solución aumenta la adhesión cuando es baja (concentraciones inferiores de NaCl 0,1M). Por encima de esta concentración los resultados varían en función de la especie bacteriana<sup>30</sup>; por ejemplo la adhesión de *Pseudomonas fluorescens* se inhibe y la de *Staphylococcus epidermidis* se incrementa<sup>29</sup>.

Las concentraciones de oxígeno también pueden afectar a la adhesión, al igual que ciertos compuestos tóxicos y la radiación ultravioleta. Parece como si aquellos factores que se consideran estresantes para un microorganismo sean, precisamente, los que tienen un efecto positivo sobre la adhesión y en consecuencia sobre la formación del biofilme.

También se han investigado los efectos de los factores bióticos sobre la adhesión. La fase de crecimiento de un cultivo bacteriano determina en gran medida las propiedades adhesivas de sus células. Para las bacterias anaerobias la capacidad de adherencia se incre-

menta en la fase inicial del crecimiento logarítmico, se reduce con la edad, y es muy baja a medida que se agotan los nutrientes en el medio. Así mismo, a mayor movilidad y disponibilidad de nutrientes, se observa una mayor adherencia<sup>31</sup>.

Por otra parte, la formación de biofilmes está regulada de modo específico. Existen genes cuya expresión se induce tras la adhesión y sólo son activos en los biofilmes<sup>32</sup>. Algunos reaccionan ante una adhesión reversible, mientras que la fijación irreversible ocasiona un cambio sobre la actividad de otros. La presencia de sistemas de regulación específica se ha observado en *Escherichia coli*, estafilococos y estreptococos<sup>33-35</sup>.

Otros autores dan mayor importancia a los flagelos y las fimbrias de tipo IV, y a moléculas específicamente «pegajosas», como las lectinas y las adhesinas<sup>36</sup>.

Asimismo, el proceso de adhesión se regula por la presencia de antiadhesinas, metabolitos extracelulares específicos que evi-

tan la adhesión reversible, estudiados en diferentes especies como *Pseudomonas fluorescens*, *Actinobacillus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*<sup>37-38</sup>. Las adhesinas sirven tanto para regular la adhesión de los organismos productores de antiadhesinas como para obstaculizar la entrada de los competidores en el biofilme ya formado.

El flujo del líquido es el principal factor que afecta al desplazamiento tanto de los microorganismos móviles como de los inmóviles. La adhesión a las superficies sólidas es independiente de la velocidad del flujo. Otros factores que favorecen la adherencia son: las fuerzas de capilaridad entre las paredes de las bacterias y las de la superficie sólida, la hidrofobicidad celular elevada, la presencia de cationes Fe<sup>3+</sup> sobre la superficie y la movilidad de los microorganismos. En cambio, los fenómenos de sedimentación que se presentan en las aguas de flujo lento y las cargas negativas en la superficie de las bacterias, reducen considerablemente su capacidad de fijación<sup>26</sup>.

La adhesión de un biofilme no depende tanto de la naturaleza de la superficie (partículas orgánicas, mucosas, plásticos, cristal, metales, minerales y otros) como de las características estructurales de los microorganismos; y concretamente de las proteínas específicas de la envoltura celular y de las fimbrias y flagelos extracelulares. Arnold *et al.*<sup>39</sup> observaron que el acero inoxidable eran tan susceptible de ser colonizado por biofilmes como el plástico. En condiciones naturales, una superficie sólida inmersa en agua se cubre inmediatamente por un mal llamado «filme acondicionador» o biofilme primario, que modifica sus propiedades físicas y químicas<sup>40</sup>. La formación de esta capa de moléculas constituye la primera etapa, que precede a la formación del film bacteriano en sentido estricto. Por ejemplo la formación completa de la placa dental se produce sólo en presencia de saliva. Las proteínas de la saliva forman la capa superficial sobre la que se adherirán las bacterias colonizadoras<sup>16</sup>.

### **Tipos de mecanismos**

La formación del biofilme puede tener lugar al menos, a través de tres tipos de mecanismos. En el primero, las células fijadas se redistribuyen moviéndose por la superficie. Un segundo mecanismo sería consecuencia de la fisión binaria de las células adheridas y su dispersión hacia abajo y hacia arriba desde la superficie de adhesión para formar agrupaciones de células (microcolonias) similares a las colonias de los cultivos axénicos o puros en medios sólidos. Un tercer mecanismo de agregación implicaría el reclutamiento de células desde el medio líquido circundante hacia el biofilme en desarrollo<sup>25</sup>.

La adhesión de los microorganismos a un sustrato puede ser activa (mediada por los flagelos, fimbrias (*pili*), adhesinas, cápsulas y cargas eléctricas) o pasiva (fuerza de la gravedad, fenómenos de difusión y de dinámica de los fluidos). En condiciones normales, las células bacterianas son repelidas por fuerzas electrostáticas de las superficies. No obstante si encuentran el área «acondicionada», forman con ella una unión reversible mediante fuerzas de van der Waals, electrostáticas, de interacciones ácido base y de dispersión<sup>41</sup>. Si dicha unión se mantiene durante suficiente tiempo, aparecen nuevas estructuras físicas y químicas que la harán permanente e irreversible<sup>28</sup>.

### **Unión irreversible**

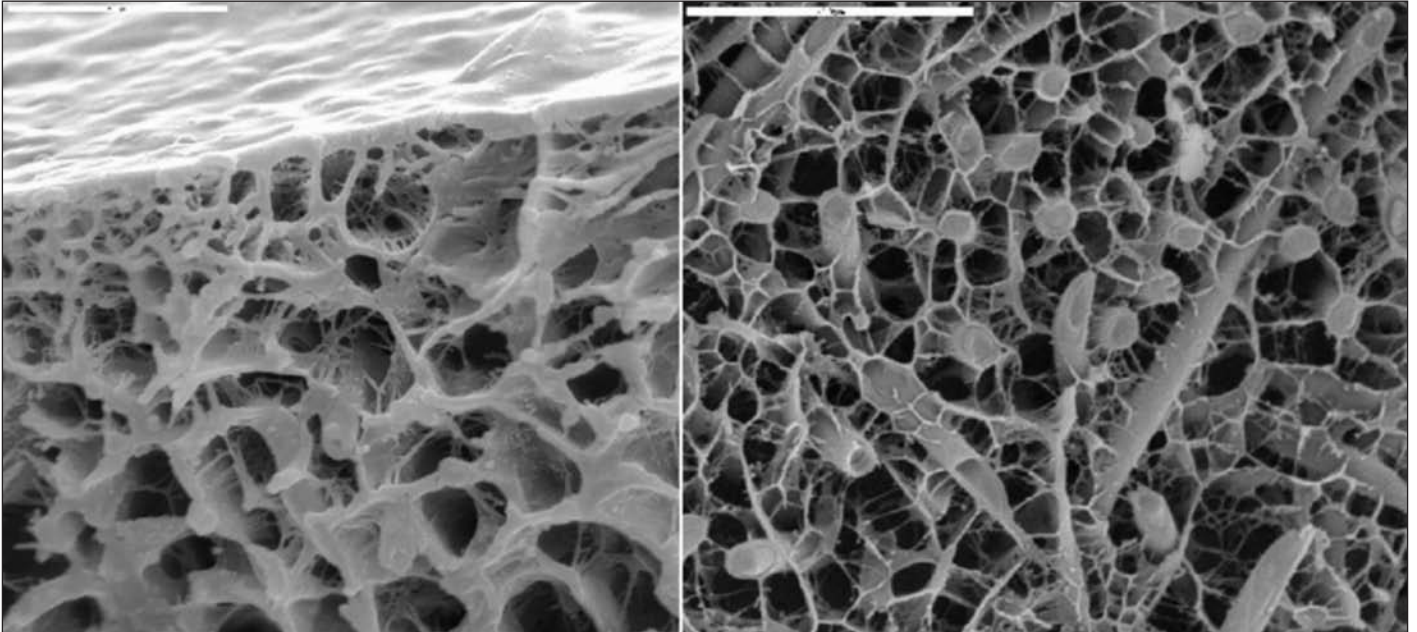
El proceso de diferenciación que transforma pequeños grupos de bacterias «adherentes» en un biofilme, encerrado en una matriz sobre una superficie colonizada, se percibe por una serie de cambios morfológicos. Las células que inician la formación del biofilme están rodeadas por pequeñas cantidades de material exopolimérico, y muchas son capaces de desplazarse a «saltitos» por flagelos, o deslizarse en ausencia de estructuras visibles y sin cambiar su morfología<sup>36</sup>. Estas células adherentes aún no se han «comprometido» con el proceso de diferenciación que conduce a la formación del biofilme, y muchas pueden, realmente, abandonar la superficie y reanudar su vida planctónica. Durante la etapa de fijación reversible las diferentes especies bacterianas muestran comportamientos específicos entre los que se incluyen rodar, avanzar gradualmente, apilarse, antes de comenzar a excretar exopolisacáridos y adherirse de manera irreversible.

Con la maduración del biofilme se desarrolla la arquitectura básica de los canales de agua y de las microcolonias y muchas células modifican sus procesos fisiológicos (por ejemplo, crecer anaeróbicamente) en respuesta a las condiciones de sus nichos particulares<sup>25</sup>.

La irreversibilidad de la unión supone el anclaje de los flagelos y las fimbrias bacterianas y la producción de exopolímeros. Para algunos autores, como Stoodley *et al.*<sup>25</sup>, el concepto de irreversibilidad debería ser revisado, puesto que mediante microscopía de secuencia temporal (*time-lapse*) demostraron los desplazamientos dinámicos a «saltitos» de las células individuales sobre la superficie, en las microcolonias del biofilme mediante movimiento flagelar, el flujo de microcolonias completas a lo largo de las superficies y la continua disgregación de células individuales y de microcolonias desde biofilmes maduros.

En 1943 Zobel<sup>42</sup> puso de manifiesto, por primera vez, esta evolución desde una adhesión reversible a una unión irreversible; actualmente algunos investigadores sugieren que dicha transición puede estar acompañada de cambios fisiológicos profundos. Sauer *et al.*<sup>43</sup> mostraron en 2001 mediante análisis de la expresión génica diferencial e inmunodetección (*Western blot*), cómo podía inducirse en *Pseudomonas putida* la unión irreversible a una superficie, modificando la movilidad por flagelos en una movilidad gradual producida por fimbrias de tipo IV. Probablemente, las interacciones de unas bacterias con otras en una superficie, formando grupos de células, ayudan a fortalecer el grado de fijación<sup>36</sup> y en especies como *Staphylococcus epidermidis* la formación del polisacárido intercelular adhesina, aglutina a las células y facilita la formación de microcolonias y la maduración del biofilme<sup>44</sup>.

Para un microorganismo, el cambio de una forma de vida libre o planctónica a la de una comunidad organizada y compleja como puede ser un biofilme, supone la activación de diferentes genes específicos responsables de su adhesión y de otras propiedades, como la resistencia a la acción de los antibióticos y los desinfectantes<sup>45</sup>. Gracias a los recientes avances en genómica y proteómica se han podido identificar hasta 800 proteínas que modifican su concentración durante las cinco fases del desarrollo del biofilme<sup>46</sup>. De éstas, más de 300 se detectan en biofilmes maduros, pero son indetectables en bacterias de vida libre. Las proteínas identificadas pueden incluirse en cinco grupos que intervienen en: metabolismo, biosíntesis de fosfolípidos y lipopolisacáridos, transporte de membrana y secreción, y en mecanismos de adaptación y protección<sup>47</sup>. En otro estudio



**Figura 3.** Micrografías de la estructura de un tapete microbiano de un manantial mineromedicinal al microscopio electrónico de barrido a bajas temperaturas (LTSEM). De la Rosa MC, Rodríguez C, Sánchez M, y Mosso MA.

realizado por Whiteley *et al.*<sup>48</sup> y publicado en *Nature* en 2001, se compararon los ácidos nucleicos (DNA) de biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa* frente a sus homólogos procedentes de cultivos en quimiostato. Más de 70 genes mostraron alteraciones en la expresión, y estaban sobreexpresados aquellos que codifican proteínas implicadas en la traducción, el metabolismo, el transporte de membrana o la secreción y la regulación génica.

### Crecimiento, división y maduración

Durante el crecimiento y la división celular, se inicia la producción de una mezcla de polímeros polianiónicos que se excretan al exterior formando una matriz muy hidratada que envuelve a las células. Esta matriz, generalmente llamada exopolímero (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), mantiene a las bacterias unidas entre sí y a la superficie, retiene los nutrientes, permite la circulación de fluidos y ofrece una mayor protección frente a la acción de los biocidas y los antibióticos; y contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador<sup>49</sup>.

La observación de la matriz resulta casi imposible mediante microscopía óptica, dadas sus características. Intentemos, por ejemplo, examinar una película fina de agar o de gelatina adherida a una lámina de cristal e inmersa en agua; la capa de gel transparente mojada desaparece. El microscopio electrónico convencional a menudo proporciona imágenes de fibras que interconectan a las células en el biofilme, pero se trata de estructuras colapsadas que se originan como consecuencia de la deshidratación, la fijación y post-fijación químicas, durante la preparación de la muestra. Actualmente, nuevas técnicas de alta resolución como son la microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LT-SEM) y en combinación con la modalidad de electrones retrodispersados (SEM-BSE) (Figura 3), nos permiten observar la estructura tridimensional de los biofilmes, la disposición de los microorganismos en ellos y los EPS en su estado nativo. Las técnicas para observar los EPS están evo-

lucionando. Quizá la mejor manera de contemplarlos sea mediante lectinas marcadas con fluorocromos. Las lectinas son proteínas de origen vegetal capaces de fijar residuos glucídicos específicos de los polisacáridos. Cuando se marcan con un compuesto fluorescente, se pueden poner de manifiesto los constituyentes específicos de la matriz extracelular<sup>50</sup>.

### Composición de la matriz de exopolímeros

Su composición es variable, consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares, como la manosa, glucosa, xilosa, y ribosa en diferentes combinaciones<sup>51</sup>. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos (DNA), ácidos teicoicos o ácidos micólicos<sup>52-53</sup>. Este material extracelular puede sintetizarse o secretarse directamente o proceder de la lisis de una fracción de las células del biofilme. Cuando se trata de biofilmes en una infección, los componentes de la matriz también pueden provenir de las células hospedadoras; por tanto, la composición de la matriz varía en función de las especies y del entorno.

En la mayoría de los biofilmes la matriz está compuesta principalmente de polisacáridos extracelulares. La celulosa es un componente esencial en el caso de *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* y *Escherichia coli*, y confiere una mayor resistencia a los antimicrobianos. En *Acetobacter xylinum* y *Sarcina ventriculi* parece protegerlos del ambiente y de las defensas del hospedador<sup>54</sup>. Diversos polisacáridos son fundamentales para la adhesión de los biofilmes en *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; en esta última también parecen ser importantes las proteínas Hwp1 y Als3.

Entre los componentes del EPS mejor caracterizados se encuentra el alginato, implicado en la formación de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* en las infecciones pulmonares y en los sistemas de agua en procesos industriales. En *Pseudomonas aeruginosa* la producción de alginato es un evento temprano en la formación de un



biofilme. A través de diferentes experiencias bajo factores ambientales diversos se ha observado que la hiperosmolaridad del medio activa uno de los genes promotores de su síntesis, el gen *algC*, y que esta regulación se verifica tras la fijación de la bacteria al sustrato, en menos de 15 minutos<sup>55</sup>. Con frecuencia se producen modificaciones enzimáticas de los polisacáridos, por la incorporación o la eliminación de grupos alquilo que alteran sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, la viscosidad del alginato sintetizado por las cepas mucoides de *Pseudomonas* spp. se incrementa en gran medida, debido a la O-acetilación de los residuos de ácido manurónico que acontece en la fase final del proceso<sup>56</sup>. Las bacterias mutantes que no son aptas para realizar la acetilación, se muestran incapaces de generar biofilmes. Un importante polisacárido presente en los EPS de los biofilmes estafilocócicos, se sintetiza a partir de monómeros de N-acetilglucosamina. Cuando el polímero recién sintetizado abandona la célula, se eliminan enzimáticamente algunos grupos acetilo, proporcionando al polímero carga positiva<sup>57</sup>. La formación de biofilmes resistentes depende de esta etapa.

Cada vez resulta más evidente que las bacterias sintetizan múltiples sustancias poliméricas extracelulares. Por ejemplo, la matriz de los biofilmes de *Escherichia coli* posee fimbrias de tipo rizado (*curli*), y polisacáridos como el ácido colánico (cargado negativamente), la celulosa, y una poliglucosamina (con carga positiva). En los biofilmes formados por *Staphylococcus epidermidis*, el interés de los investigadores se ha centrado sobre una molécula con carga positiva, la poliglucosamina. Un estudio reciente destaca la existencia de un segundo componente mayoritario de los EPS de esta bacteria, los ácidos teicoicos<sup>58</sup>. Son polímeros de glicerol fosfato con carga negativa. Cuando interaccionan polímeros de cargas opuestas, se forman estructuras resistentes denominadas complejos polielectrolito, de manera similar a lo que ocurre cuando se mezclan una resina epoxi y un endurecedor. Los microorganismos tienen la capacidad de controlar la adhesividad de la matriz, regulando las proporciones de los dos polímeros sintetizados o ajustando la densidad de carga de cada polímero. En este modelo, análogamente a lo que ocurre en la matriz de alginato, se produce la interacción entre hebras separadas del EPS, lo que parece ser un requisito general para la cohesión de la estructura.

Para algunas especies, la formación de la matriz depende de otros tipos de moléculas. Por ejemplo, *Mycobacterium smegmatis* requiere la síntesis y la secreción de ácidos micólicos para formar biofilmes maduros<sup>59-60</sup>. Sorprendentemente, en el caso de los biofilmes de *P. aeruginosa*, la matriz también está compuesta por DNA<sup>61-62</sup>. Este DNA, que puede ser excretado o proceder de la lisis celular, actúa manteniendo la integridad de los biofilmes. El tratamiento con DNasa inhibe la formación de biofilmes pero no el crecimiento celular. Esto explicaría la eficacia del tratamiento con DNasa en los pacientes con fibrosis quística, cuyo epitelio pulmonar está colonizado por biofilmes de *P. aeruginosa*<sup>63</sup>. Además de la función estructural, la presencia de DNA extracelular en la matriz de los biofilmes de *P. aeruginosa* ejerce otras dos funciones: a) actúa como quelante de cationes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) contribuyendo a crear un gradiente iónico que favorece la lisis celular, al alterar la integridad de la membrana externa (LPS); y b) induce la resistencia a ciertos antibióticos, mediante interacción iónica con péptidos antimicrobianos catiónicos (como polymixina B y colistina) y aminoglicósidos (como gentamicina y tobramicina), o mediante la inducción de operones específicos de resistencia a antibióticos<sup>64</sup>.

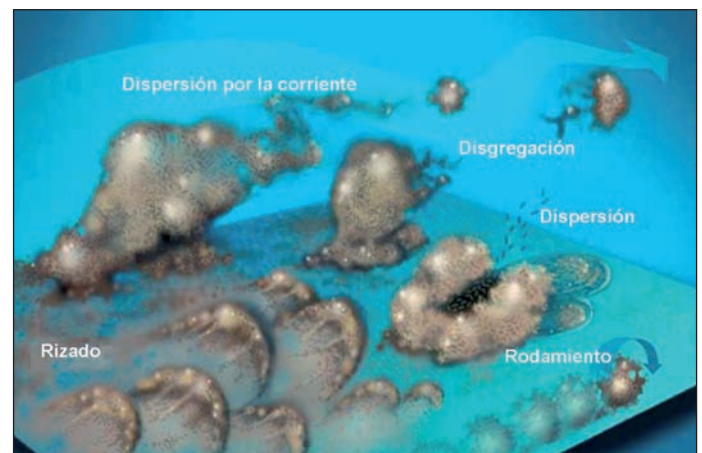
No es éste el único caso en los que el DNA es protagonista de la composición del EPS, también aparece en biofilmes de *P. putida*, *Rhodococcus erythropolis* y *Variovorax paradoxus*<sup>49</sup>. Recientemente, Pinchuk *et al.*<sup>65</sup> han descrito la utilización del DNA como única fuente de carbono, de fósforo y energía por *Shewanella* spp. Dado que esta bacteria también produce biofilmes, *S. putrefaciens* en alimentos y *S. oneidensis* en ecosistemas acuáticos, se podría especular sobre la posibilidad de que en aquellos consorcios en los que el DNA integre la matriz, también pudiese ser utilizado por otras especies como fuente de nutrientes.

### Maduración

Finalmente, durante la etapa de la maduración, la estructura se permeabiliza con una red de poros y de canales atravesados por agua, residuos microbianos, enzimas, nutrientes, metabolitos y oxígeno. En la periferia de la estructura se localizan la mayoría de las células viables, cuyo número se reduce con la edad del biofilme. Así, en un biofilme joven se ha detectado un 80% de células viables<sup>66</sup>, mientras que en un biofilme antiguo su número se reduce hasta el 50%. La comunidad, en división continua, libera periódicamente unas pocas células, junto con residuos y nutrientes que serán usados para acondicionar nuevas superficies y alimentar a otras células. Esta colonización está relacionada con la evolución y la supervivencia de las bacterias a largo plazo.

### Desprendimiento y dispersión

*Desprendimiento*, *dispersión* y *disgregación* son términos genéricos empleados para describir la liberación de células, ya sea de manera individual o en grupos, desde un biofilme o sustrato; y puede realizarse de diferentes formas (Figura 4). La separación activa es un proceso regulado fisiológicamente, pero existen pocos estudios que demuestren sus bases biológicas. Allison *et al.*<sup>67</sup>, señalaron que siguiendo una incubación prolongada, los biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* experimentaban fenómenos de desprendimiento, coincidiendo con una reducción en la liberación de EPS. Se ha observado que la falta de alimentos puede conducir a la separación de células mediante un mecanismo desconocido que permita a las bacterias



**Figura 4.** Modelos de dispersión de los biofilmes. Modificado de Stoodley y Dirckx<sup>81</sup>.



buscar otros hábitats ricos en nutrientes<sup>24</sup>. Esta hipótesis coincide con los estudios realizados por Sauer *et al.*<sup>47</sup>, en los que se compararon los patrones de proteínas en electroforesis bidimensional, para demostrar que las células liberadas de *Pseudomonas aeruginosa* son más parecidas a las células de vida planctónica que a las que forman parte de biofilmes maduras. Estos hallazgos indican que las células del biofilme en disgregación, regresan a la forma de crecimiento planctónico, cerrando así, el ciclo vital de desarrollo<sup>47</sup>.

Se ha visto que *Streptococcus mutans* produce una enzima liberadora de proteínas de superficie (SPRE) que interviene en la salida de las células desde los biofilmes<sup>68</sup>. Otros estudios realizados sobre *Pseudomonas aeruginosa*, mostraron que una sobreexpresión de la alginato liasa, ocasionaba la degradación del alginato, permitiendo la eliminación de los biofilmes formados mediante un suave aclarado de las superficies. Cabría pensar que el incremento en la concentración de una molécula inductora estimula la producción de enzimas que degradan la matriz polimérica, desembocando en la liberación de células desde el biofilme<sup>25</sup>.

El nivel de estrés ambiental y la transición entre entornos diferentes, constituyen los factores principales que influyen en la liberación celular<sup>24-68</sup>.

## REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE BIOFILMES: QUORUM SENSING

Tras la colonización inicial, otros microorganismos quedan incluidos en la matriz estructural polimérica. Las diferentes especies conviven en un nicho ecológico mínimo, constituyendo una comunidad metabólica altamente especializada que coopera y se comunica de manera compleja y fascinante, mediante un sistema de señalización denominado *quorum sensing* (QS) o «percepción de quórum».

*Quorum sensing* es el término inglés que designa el mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de moléculas señalizadoras o *autoinductores*, que hacen que las bacterias *sientan* (*perciban*) la densidad de la población existente, y cuándo dicha densidad ha alcanzado un valor crítico para dar una determinada respuesta, según un programa controlado genéticamente. Las respuestas pueden consistir en: la emisión de luminiscencia (bacterias luminiscentes); la secreción de sustancias viscosas que las adhieren unas a otras y a un sustrato (bacterias que forman biofilmes); el inicio de la formación de nódulos radicales (bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas de plantas). Las bacterias se comunican excretando al medio unas moléculas señalizadoras que son reconocidas por otras (Tabla II). Pero no se trata de un único «lenguaje» (*sic*<sup>69</sup> «mira quién habla»), ya que se conocen varias clases de moléculas señalizadoras y el mensaje emitido por una bacteria puede no ser captado por otra, si ésta no dispone del mecanismo de reconocimiento adecuado.

Aunque el fenómeno se conoce desde hace más de 30 años, el término inglés *quorum sensing* es reciente. Apareció por primera vez en una revisión que W. C. Fuqua, S. C. Winans y E. P. Greenberg<sup>70</sup> publicaron en 1994. Según Greenberg<sup>71</sup>, el término fue idea de una persona ajena al mundo de la Biología. Su colaborador Winans, en una reunión familiar navideña, explicó a su cuñado –abogado de profesión– el tipo de investigación en el que trabajaba, y a éste se le ocurrió que la expresión *quorum sensing* (darse cuenta de que se había alcanzado el número mínimo para algo) describía mejor que

«autoinducción» el fenómeno que ponía en marcha el dispositivo para que las bacterias actuaran.

¿Cómo expresar el fenómeno en castellano? En el foro de debate de MedTrad-200172, se planteó la necesidad de buscar una equivalencia en castellano que evitase el uso del término inglés. Surgieron varias propuestas: «densitodetección», «densitocepción» (percepción de densidad) y «noción de quórum» o «*percepción de quórum*». Ésta última parece expresar mejor la idea del fenómeno que se quiere describir, por lo que la Asociación Internacional de Traductores y Redactores ha propuesto a la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales la inclusión del término «*percepción de quórum*» en su *Vocabulario científico y técnico*.

Existen tres mecanismos moleculares de QS: el sistema LuxI/LuxR en Bacterias Gram negativas, el sistema de péptidos en bacterias Gram positivas y el sistema híbrido (Tabla II).

Bacterias Gram negativas (LuxI/LuxR): En los últimos 25 años se ha identificado el sistema de *quorum sensing* en unas 25 especies de bacterias Gram negativas que, a excepción de *Vibrio harveyi*, siguen el modelo de la bacteria simbiote *V. fischeri*. Este modelo de QS opera a través de proteínas homólogas a las proteínas LuxI y LuxR (de *V. fischeri*) actuando como molécula señal una acil homoserina lactona (acil-HSL).

Un buen ejemplo de este sistema es *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 5), dotado de dos sistemas *las* y *rhl* de QS que controlan un total de 39 genes, es decir, del 6 al 11% de su genoma<sup>73</sup>. Dichos sistemas operan a través de los autoinductores N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3OC<sub>12</sub>-HSL) y N-butiril-L-homoserina lactona (3OC<sub>4</sub>-HSL). La síntesis de estas moléculas señalizadoras se encuentra regulada por los genes *lasI* y *rhlI*, respectivamente. Davies *et al.*<sup>68</sup> demostraron, en 1999, que *P. aeruginosa* requiere del producto del gen *lasI* (3OC<sub>12</sub>-HSL) para desarrollar biofilmes normales. Así, suprimieron la actividad de este gen en cepas mutantes y observaron que al no generarse la molécula señal, el biofilme que se formaba tenía el 20% del grosor del originado por la cepa silvestre. En cambio, si el autoinductor se añadía al cultivo de los mutantes *lasI*, éstos generaban biofilmes indistinguibles de los producidos por sus homólogos silvestres. Además, si la cantidad y la naturaleza de los polímeros de la matriz influyen sobre esta estructura, los fenómenos de autoinducción serán al menos parcialmente responsables de la síntesis de los EPS.

Un segundo sistema de comunicación intercelular se relaciona con esta hipótesis, habiéndose observado que los genes responsables de la síntesis de alginato *algC* y *algD* (componente de la matriz de EPS) son inducidos por los productos génicos de *las* y *rhl* (3OC<sub>12</sub>-HSL y 3OC<sub>4</sub>-HSL, respectivamente). En un estudio diferente, Olvera *et al.*<sup>74</sup> confirmaron que la proteína activadora de la transcripción *RhlR* asociada al sistema *rhl*, activa la expresión del gen *algC*, que a su vez interviene en la síntesis de ramnolípidos, componentes de la matriz de EPS. Estos hechos destacan la función del *quorum sensing* como un sistema de transducción de señales, a través del cual *P. aeruginosa* inicia la producción de alginato y de otros tipos de EPS durante el desarrollo de biofilmes.

Existe, además, un tercer compuesto aislado por Pesci *et al.*<sup>75</sup>, en 1999 –de cultivos de *P. aeruginosa*– que interviene como señal de comunicación intercelular. Se trata de la 2-heptil-3hidroxi-4-quinolona o «quinolona señal de *Pseudomonas*» (PQS). Esta molécula controla múltiples factores de patogenicidad, como la producción de la elastasa (*lasB*) y parece ser un enlace de regulación entre los siste-

**Tabla II.** Sistemas de Quorum-sensing en bacterias: sistema LuxI/R en bacterias Gram negativas (columna izquierda), sistema de oligopéptidos en bacterias Gram positivas (columna central), y sistema híbrido (columna derecha). Abreviaturas: (HPt) histidina- fosfo-transferasa; (P), fosfato; (RR) regulador de respuesta; (SHK) sensor histidina-kinasa; (AHL) acil homoserina lactona; (3OC12-HSL) N-(3oxododecanoil)-L-homoserina lactona; (3OC4-HSL) N-butiril-L-homoserina lactona; (AI-2) Autoinductor-2. Modificado de Miller<sup>82</sup>, Henke<sup>83</sup> y Williams<sup>84</sup>

	Bacterias Gram negativas: LuxI/R	Bacterias Gram positivas: oligopéptidos	Sistema híbrido
Estructuras moleculares de los autoinductores	<p>3-O-C12-HSL/LasI <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>C4-HSL/RhlI <i>P. aeruginosa</i></p> <p>C8-HSL/TraI <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>C6-HSL/LuxI <i>Vibrio fischeri</i></p>	<p>ERGMT</p> <p>CSF/phrC <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>ADPITRQWGD<sup>*</sup></p> <p>comX <i>B. subtilis</i></p> <p>YSTCDFIM</p> <p>GVNACSSLF</p> <p>INCDFLL</p> <p>YSTCYFIM</p> <p>AIP I-IV <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>3-OH-C4-HSL/LuxM <i>Vibrio harveyi</i></p> <p>AI-2/LuxS <i>V. harveyi</i></p> <p>AI-2/LuxS <i>Salmonella typhimurium</i></p>
Procesos regulados por Quorum sensing	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Producción de elastasa, lecitinas, rhamnolípidos, pirocianina, fimbrias tipo IV (virulencia)</p> <p><i>Vibrio fischeri</i>: Bioluminiscencia</p> <p><i>Aeromonas hydrophila</i>: Proteasa, biofilmes</p> <p><i>Agrobacterium tumefaciens</i>: Conjugación del plásmido Ti</p> <p><i>Burkholderia cepacia</i>: proteasa, sideróforo</p> <p><i>Erwinia carotovora</i>: Producción de exoenzimas (virulencia), y antibióticos carbapenem</p> <p><i>Escherichia coli</i>: División celular</p> <p><i>Rhizobium leguminosarum</i>: nodulación, bacteriocinas</p> <p><i>Serratia liquefaciens</i>: Producción pigmento, proteasa, antibióticos</p> <p><i>Sinorhizobium meliloti</i>: Síntesis de exopolisacáridos (simbiosis)</p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Y. pestis</i>, <i>Y. pseudotuberculosis</i></p>	<p><i>Bacillus subtilis</i>: Competencia, esporulación</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>: Virulencia, biofilmes</p> <p><i>Lactococcus lactis</i>: Producción de nisina</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>: Competencia</p>	<p><i>Vibrio harveyi</i>: Luminiscencia, secreción tipo III</p> <p><i>Vibrio cholerae</i>: Virulencia, biofilmes</p> <p><i>Vibrio anguillarum</i>: Producción de proteasa</p> <p><i>Salmonella typhimurium</i>: Transportador Lsr</p> <p><i>Photobacterium luminescens</i>: Producción de antibióticos</p> <p><i>Clostridium perfringens</i>: Producción de toxinas</p> <p><i>Streptococcus pyogenes</i>: Producción de hemolisina</p>

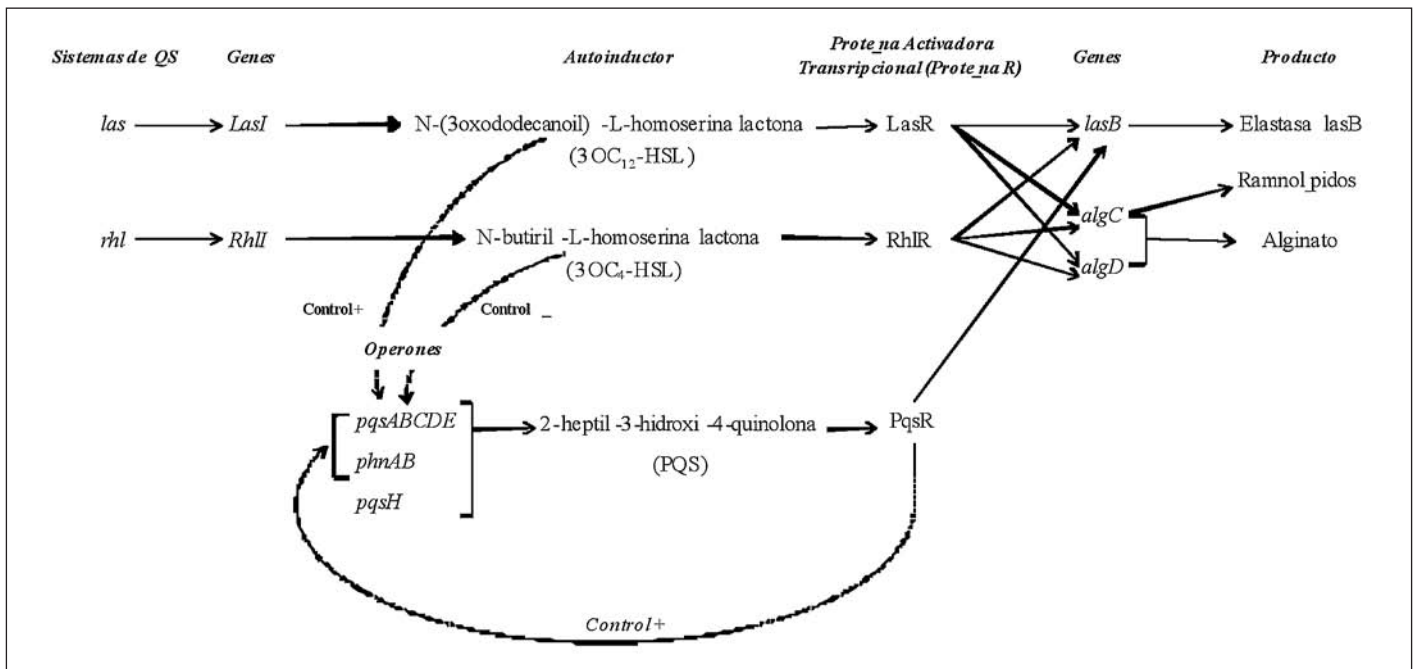


Figura 5. Sistemas de quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*.

mas *las* y *rhl*. La elastasa es una proteasa secretada por las bacterias cuando colonizan los pulmones de los enfermos de fibrosis quística, desarrollando su acción sobre muchas de las proteínas que intervienen en los mecanismos de defensa del hospedador y lesionando el propio epitelio respiratorio<sup>76-77</sup>. Cuando el 3OC<sub>12</sub>-HSL alcanza la concentración umbral, se produce la síntesis de la proteína activadora transcripcional o proteína R, *LasR*, que activa la expresión del gen *LasB* responsable de la síntesis de la elastasa LasB. En la activación transcripcional del gen *LasB* también interviene la proteína R, *RhIR*, inducida por la molécula señal 3OC<sub>4</sub>-HSL. La síntesis de PQS, que se produce a través de múltiples operones (*pqsABCDE*, *phnAB* y *pqsH*), promueve la síntesis de la proteína activadora transcripcional *PqsR*, responsable parcialmente de la activación de la expresión del gen *lasB*. Los autoinductores de los sistemas *las* y *rhl* obran diferentes efectos sobre la actividad de los operones de la PQS. Así, la 3OC<sub>4</sub>-HSL ejerce un efecto regulador negativo reduciendo la concentración de PQS, mientras que la 3OC<sub>12</sub>-HSL tiene efecto positivo sobre la transcripción de los operones, al igual que la presencia de la proteína *PqsR73* (Figura 5).

Bacterias Gram positivas (sistema de péptidos): Las bacterias Gram positivas también responden al aumento en la densidad de población regulando muchos procesos. Sin embargo, a diferencia de las bacterias Gram negativas, usan la secreción de péptidos como autoinductores en lugar de las acil-HSL (Tabla II). Estos sistemas de QS están implicados en la regulación de procesos tan diversos como la patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (inhibición de la colonización y activación de la producción de toxinas), la competencia para la captación de DNA en *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*, la esporulación en *B. subtilis* y la producción de bacteriocinas (nisina) en bacterias del ácido láctico. En *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, la señalización se realiza mediante oligopéptidos modificados, secretados al medio mediante un sistema de transporte de tipo ABC (*ATP-binding cassette*). Un «sistema proteico de dos componentes» detecta las señales, que se transducen

via fosforilación-desfosforilación a los genes diana, activándolos o reprimiéndolos según los casos.

Sistema híbrido: Este sistema posee características tanto del sistema QS de bacterias Gram negativas como de Gram positivas (Tabla II). Ejemplos de este sistema son *Vibrio harvey* y *V. cholerae*. En *V. cholerae* se han descrito tres sistemas de regulación del QS: el primer sistema, mediado por las proteínas CsqA (sintetasa del autoinductor CAI-1) y CqsS (sensor quinasa híbrido que responde a CAI-1); el segundo, LuxPSQ transcurre por una cascada de fosforilación a través de LuxU y LuxO; y un tercero aun no bien caracterizado, pero se piensa que responde a una señal intracelular que interacciona con LuxO (donde convergen los tres sistemas)<sup>78</sup>. Estos sistemas actúan de modo que cuando la densidad de células es baja, LuxO activa la expresión de genes de patogenicidad; mientras que si es elevada, LuxO está inactivado y los genes de patogenicidad no se expresan.

Por último, los sistemas de percepción de quórum están siendo utilizados como biosensores y podrían usarse en nano-robots. Además, el conocimiento de estos mecanismos supone una nueva vía para tratar las infecciones bacterianas por otros mecanismos distintos a la inhibición del crecimiento, actuando como dianas antimicrobianas en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, que interfieran la señalización celular y controlen la expresión de los genes de patogenicidad.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha dado una visión general de las comunidades microbianas denominadas biofilmes. En él se han descrito su desarrollo, qué especies los forman, cómo se comunican y se regulan todos estos procesos.

Al igual que en la vida en general, el éxito en el mundo microbiano radica en la conjunción de tres factores: cohesión, comunicación y medios. Tienen éxito los individuos que se unen formando



comunidades con un objetivo común, comparten un sistema de comunicación eficaz (*quorum sensing*) y pueden obtener los recursos necesarios para la supervivencia. De hecho, la forma de vida predominante de las bacterias en la naturaleza es formando *biofilmes*. Al tratarse de comunidades complejas que aparecen en todos los ecosistemas, es preciso estudiarlos en su conjunto; es decir, considerando la interacción de las diferentes células que integran los biofilmes de una misma especie y la interacción de diferentes especies en las comunidades heterogéneas. Este cambio conceptual de paradigma se inscribe en la Biología de sistemas, como nueva visión de la Ciencia. Queda un largo camino por recorrer en el estudio de los biofilmes. Se abren numerosos interrogantes sobre los mecanismos moleculares que los regulan, cuáles son los fenotipos celulares específicos de los mismos y sus orígenes genético y epigenético; así como el esclarecimiento de las interacciones que se establecen entre dichas especies. Todos estos aspectos son esenciales para lograr una comprensión más profunda de su evolución y ecología. Al ampliar nuestro conocimiento de la diversidad microbiana, de los biofilmes y su control, contribuiremos a elaborar el inventario completo de la biodiversidad microbiana, sus efectos y aplicaciones en beneficio de la ciencia, la tecnología y, en suma, de la sociedad.

### BIBLIOGRAFÍA

- Lasa I, del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilmes bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28:163-175.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284:1318-1322.
- Winogradsky S. Soil Sci. 1928; 25:37.
- Cholodny N. Arch Mikrobiol. 1930; 1:620.
- Conn HJ. Z Bakt. 1932; 87:233.
- Henrici AT. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. J Bacteriol. 1933; 25:277-286.
- ZoBell CE, Allen EC. Attachment of marine bacteria to submerged slides. Proc Soc Exp Biol Med. 1933; 30:1409-1411.
- ZoBell CE, Allen EC. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. J Bacteriol. 1935; 29:239-251.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How bacteria stick. Sci Am. 1978; 238:86-95.
- Zavarzin GA. Evolution of Microbial Communities throughout the History Earth. En Problemy doantropogennoi evolyutsii biosfery (Problems of Pre-anthropogenic Biosphere Evolution). 1993; Pp. 212-222. Moscow: Nauka.
- Zavarzin GA. Paradigm Shift in Biology. Vest. Ross. Akad. Nauk. 1995; 65:8-17.
- Popper KR. La lógica de la investigación científica. Editorial Tecnos. 1973.
- Fleck L. La génesis y el desarrollo de un hecho científico [1935]. Alianza Editorial. Madrid. 1986.
- Kuhn TS. The Structure of Scientific Revolutions. University of Chicago Press. Chicago. 1962.
- Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Rev Microbiol. 2004; 2:95.
- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(4):847-867.
- Karsten U, Kühl M. Die Mikrobenmatte-das kleinste Ökosystem der Welt. Biol. Zeit. 1996; 26:16-26.
- De Beer D, Kühl M. Interfacial microbial mats and biofilms. 2001; Pp.374-394 En: B.P. Boudreau y B.B. Jørgensen (eds.), The Benthic Boundary Layer, Oxford University Press, New York.
- Kraigsley A, Ronney PD, Finkel Se. Hydrodynamic influences on biofilm formation and growth. <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html> [Consulta: 2008-17-03]
- Shimkets LJ, Brun, YV. Prokaryotic development: strategies to enhance survival. En: Prokaryotic development, ed. LJ Shimkets, YV Brun. 1999; Pp. 1-7. Washington, DC. Am. Soc. Microbiol.
- Goley ED, Iniesta AA, Shapiro L. Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. J Cell Sci. 2007; 120:3501-7.
- Insall R, Andrew N. Chemotaxis in *Dictyostelium*: how to walk straight using parallel pathways. Curr Opin Microbiol. 2007; 10:578-81.
- Kikuchi H. Novel biologically active compounds isolated from unexploited organisms, cellular slime molds. Yakugaku Zasshi. 2007; 127:1431-9.
- O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:49-79.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol. 2002; 56:187-209.
- Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm-«City of microbes» or an analogue of multicellular organisms? Microbiology. 2007; 76:125-138.
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. J Bacteriol. 2000; 182:3593-3596
- Denkhaus E, Meisen S, Telgheder U, Wingender J. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. Microchim Acta. 2007; 158:1-27.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesion Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemoter. 2000; 44:3357-3363.
- Busalmen JP, Sánchez SR. Influence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas* spp. to titanium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2001; 26:303-308.
- Van Schie PM, Fletcher M. Adhesion of Biodegradative Anaerobic Bacteria to Solid Surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65:5082-5088.
- Jefferson KK. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? FEMS Microbiol. Letts. 2004; 236:163-173.
- Otto K, Silhavy TJ. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by Cpx-signalling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:2287-2292.
- Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. icaR Encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 2002; 184:4400-4408.
- Wen ZT, Burne RA. Functional Genomics Approach To Identifying Genes Required for Biofilm Development by *Streptococcus mutans*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68:1196-1203.
- O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Molecular Microbiology. 1998; 30:295-304.
- Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. J. Bacteriol. 2003; 185:4693-4698.
- Batrakov SG, Rodionova TA, Esipov SE, Polyakov NB, Sheichenko VI, Shekhovtsova NV, Lukin SM, Panikov NS, Nikolaev YA. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* Strain 603, Biochim. Biophys. Acta. 2003; 1634:107-115.
- Arnold JW, Silvers S. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poult Sci. 2000; 79:1215-1221.
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – Its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol. Rev. 1999; 23:179-230.
- Boonaert CJ, Dufrière YF, Rouxhet PG. Adhesion (primary) of microorganisms onto surfaces. 2002; pp.113-132 En: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Flemming HC, ed., Biofilms, Wiley, New York.
- ZoBell CE. The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity. J. Bacteriol. 1943; 46:39-56.
- Sauer K, Camper AK. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. J. Bacteriol. 2001; 183:6579-89.
- Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem. 1998; 273:18586-93.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001; 9:34-9.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature. 2002; 30:417:552-5.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 2002; 184:1140-54.

48. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413:860-64.
49. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:5404-5410.
50. Bockelmann, U, Manz, W, Neu, TR, Szewzyk, U. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent in situ hybridization and lectin-binding analysis. *J. Microbiol. Methods* 2002; 49:75-87.
51. Parikh A, Madamwar D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresour Technol.* 2006; 97:1822-7.
52. Wingender J, Neu TR, Flemming H-C. What are bacterial extracellular polymeric substances? 1999; Pp.93-112. En: J Wingender, TR Neu, H-C Flemming, *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, ed. Berlin: Springer.
53. Chmielewski RA, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp. Rev. Food Sci. and Food Saf.* 2003; 2:22-32.
54. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006; 8(9):1382-91.
55. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61:860-867
56. Nivens, DE, Ohman, DE, Williams, J, Franklin, MJ. Role of alginate and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* in microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.* 2001; 183:1047-1057
57. Vuong, CS, Kocianova, S, Voyich, JM, Yao, Y, Fischer, ER, DeLeo, FR, Otto, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:54881-54886.
58. Sadosvskaya, I, Vinogradov, E, Flahaut, S, Kogan, G, Jabbouri, S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect. Immun.* 2005; 73:3007-3017.
59. Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs Jr WR, Hatfull GF. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in *Mycobacteria*. *Cell* 2005; 123:861-873
60. Ojha, A.K, Baughn AD, Sambadan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, Alahari A, Kremer L, Jacobs Jr W R, Hatfull GF. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* 2008; 69:164-174.
61. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295:1487
62. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1114-28
63. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm. Pharm. Therapeutics* 2008, 21: 595-599
64. Mulcahy H, Charron-Mazenod, L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofilms PLoS Pathog.* 2008; 4:e1000213
65. Pinchuk, GE, Ammons, C, Culley, DE, Li, S-MW, McLean, JS, Romine, MF, Neilson, KH, Fredrickson, JK, Beliaev, AS. Utilization of DNA as sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella* spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. *Appl. Env. Microbiol.* 2008; 74:1198-1208.
66. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2000; 24:661-71.
67. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 167:179-184.
68. Davies DG. Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion. 1999; pp 93-112 En: *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Wingender J, Neu TR, Fleming HC, ed. Berlin: Springer.
69. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and *quorum sensing* in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007; 362:1119-34.
70. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 1994; 176:269-75.
71. Greenberg EP. *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria. *ASM News* 1997; 63: 371-377
72. Piqueras, M. Fichas de MedTrad: *quorum sensing*. Panace@ 2001; 2
73. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2005; 187:4372-80.
74. Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R, Soeron-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 179:85-90.
75. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:11229-34.
76. Suter S. The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150:S118-22.
77. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Al Nassafi K, Manos J, Elkins M, Bye P, Willcox M, Bell S, Wainwright C, Harbour C. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:1697-704.
78. Cámara M, Williams P, Hardman A. *Quorum sensing* in *Vibrio cholerae*. *Nature Genetics* 2002; 32: 217-218
79. Harrison, JJ; Turner RJ; Marques L.L.R, Howard, C. Biopelículas. *Investigación y Ciencia* 2006, 354
80. Ghigo JM. Genetics of Biofilm Laboratory. Institut Pasteur. 2009. <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/recherche.html>.
81. Stoodley P, Dirckx P. *Biofilm Migrates in Various Ways*. Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozman, MT. (2003) [http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image\\_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/CBE-03\\_BfMigration.htm](http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library/Structure-Function/Full-image%20pages/CBE-03_BfMigration.htm)
82. Miller MB, Bassler BL. *Quorum sensing* in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55: 165-199
83. Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biol.* 2004, 14: 648-656.
84. Williams P, Cámara M. Grupo de investigación sobre *quorum sensing* de la Universidad de Nottingham. 22/06/2009 <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/table.htm>