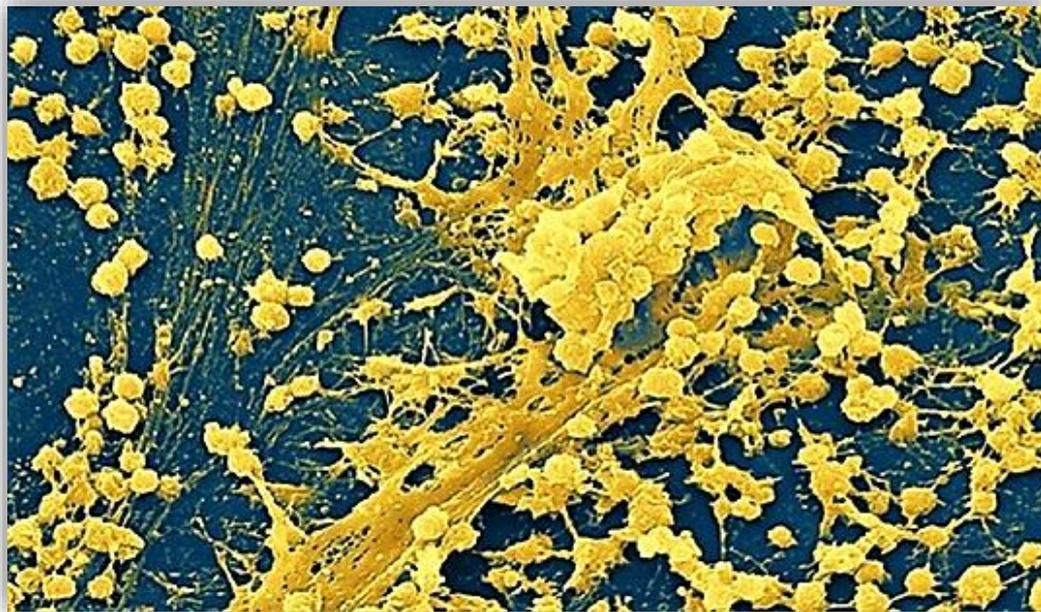




# MICROBIAL BIOFILMS

## BIOFILMS MICROBIANOS



Trabajo de Fin de Grado

**MELANIA TRUJILLO GARCÍA**

Trabajo tutorizado por Ángel M. Gutiérrez Navarro

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Junio 2017**

## ÍNDICE

HISTORIA .....	1
ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN .....	2
AGUA: .....	3
EXOPOLISACÁRIDOS: .....	4
.....	5
PROTEÍNAS EXTRACELULARES:.....	5
TENSIOACTIVOS Y LÍPIDOS: .....	5
ADN EXTRACELULAR (eADN): .....	6
FORMACIÓN .....	6
FASES DE FORMACIÓN DE UN BIOFILM .....	7
1º Adhesión bacteriana primaria: .....	7
2º Adhesión bacteriana secundaria: .....	7
3º Maduración del biofilm: .....	8
4º Desprendimiento activo: .....	8
PROPIEDADES DE LOS MICROORGANISMOS: .....	10
PROPIEDADES QUE ADQUIEREN LAS BACTERIAS AL FORMAR PARTE DE UN BIOFILM: .....	11
PROPIEDADES DE LA SUPERFICIE: .....	12
FACTORES MEDIOAMBIENTALES: .....	13
BIOFILMS EN EL ÁREA CLÍNICA: .....	15
BIOFILMS EN LA INDUSTRIA: .....	18
BIOFILMS EN LA NATURALEZA: .....	22
ELIMINACIÓN Y CONTROL DEL BIOFILM .....	23
Limpieza: .....	23
Desinfección: .....	24
TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO Y LA OBSERVACIÓN .....	25
VENTAJAS VS DESVENTAJAS.....	26
CONCLUSIONS: .....	27
CONCLUSIONES: .....	27
REFERENCIAS.....	28

## ABSTRACT

In this work we study how a biofilm is formed, its components and how its function affects different sectors such as industry, clinical area, cosmetics, nature, among others. In addition, there is talk of different techniques currently developed for the study and observation of biofilms, being able to develop prevention strategies that, together with the existing disinfection and sanitation techniques, could be the necessary combination to eradicate them.

In order to do this, we use the knowledge of its structure, composition, resistance and proportion of the different microorganisms that make up a particular biofilm, as well as the study of possible strategies that would lead to an improvement in both public and environmental health.

**Keywords:** Biofilm; Antimicrobial resistance; Microbial communities; Matrix of exopolysaccharides.

## RESUMEN

En este trabajo se estudia cómo se forma una biopelícula, sus componentes y como su función afecta a distintos sectores como son la industria, el área clínica, la cosmética, la naturaleza, entre otros. Además, se habla de distintas técnicas desarrolladas actualmente para el estudio y observación de las biopelículas, pudiéndose desarrollar estrategias de prevención que unidas a las técnicas de desinfección y saneamiento vigentes podrían ser la combinación necesaria para erradicarlos.

Para ello, se recurre al conocimiento de su estructura, composición, resistencias y proporción de los distintos microorganismos que conforman un determinado biofilm, así como al estudio de las posibles estrategias que provocarían una mejora, tanto de la salud pública como ambiental.

**Palabras Claves:** Biopelícula; Resistencia antimicrobiana; Comunidades microbianas; Matriz de exopolisacáridos.

## HISTORIA

Los “*biofilms*”, también llamados biopelículas, fueron descritos por primera vez en el siglo XVI por Antonie Van Leeuwenhoek, a consecuencia de haber examinado la placa de sus propios dientes declarando haber observado unos “animálculos” en un informe de la Royal Society de Londres:

*“The number of these animicules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom.”*

Pero la teoría general que describe el proceso de biopelícula no se promulgó hasta el año 1978. Dicha teoría se ha transformado y perfeccionado durante los últimos 25 años, entendiendo hoy en día, que la gran mayoría de los microorganismos en la naturaleza se encuentran adheridos a superficies donde crecen formando biopelículas o biofilms (Marsh, 2005); de hecho, los biofilms constituyen el estado habitual de las bacterias en la mayoría de los ecosistemas naturales (Stoodley y col. 2002).

Todo ello establece la definición de “*biofilm bacteriano*” entendido como «una comunidad sésil bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas irreversiblemente a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular polimérica producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes». (Costerton y col. 1999; Donlan, 2002).

Se tratan de un caso específico de contaminación microbiana. Éstos consisten en agrupaciones de microorganismos que se acumulan en una interfase sólido-líquido (También cabe la posibilidad que se establezcan en interfaces aire-líquido o sólido-aire) encontrándose rodeados por una matriz mucilaginosa provista de moléculas orgánicas, microbios y minerales. La matriz del biofilm en la que se encuentran embebidas las células, es el material extracelular de carácter adhesivo y gelatinoso, producido en su mayoría por los propios microorganismos y consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros – conocidos como Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) – que constituyen el soporte para la estructura tridimensional de dicho biofilm. La formación de estas

biopelículas permite a las células una forma de vida completamente diferente del estado planctónico, protegiéndolas de entornos adversos y facilitando su supervivencia.

Estas conformaciones microbianas presentan características específicas como su **heterogeneidad**, es decir, pueden estar formadas por una gran diversidad de especies bacterianas pudiéndose encontrar también hongos, levaduras, algas e incluso protozoos, su **diversidad de microambientes**, encontrándose en el mismo biofilm microorganismos con distintas necesidades fisiológicas (anaerobios, aerobios, microaerobios, entre otros), **resistencia a antimicrobianos**, esto es debido a la matriz de exopolisacáridos que los protege y la **capacidad de comunicación intercelular** que realizan gracias al sistema que poseen llamado “**quorum sensing**” que las convierte en complejos difíciles de erradicar en los ambientes donde se establecen.

## ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

A través de los nuevos métodos de observación como es el caso del microscopio láser cofocal de barrido (CSLM) se ha logrado la observación de estas biomasas “*in vivo*”, hidratadas y a tiempo real mostrando claramente que un “*biofilm*” típico se compone principalmente por:

- Agua (Hasta un 97% del contenido total (Zhang y col. 1998)).
- Los propios microorganismos (15-20% del volumen (Costerton y col. 1997)).
- Matriz de naturaleza polimérica (Entre un 75% y 95% del volumen de una biopelícula ya madura). Conteniendo en su mayoría exopolisacáridos (Sutherland, 2001) y en menor cantidad macromoléculas como proteínas, lípidos, minerales y ADN microbiano procedentes de la lisis de las bacterias (Branda y col. 2005).

La matriz de exopolisacáridos del biofilm retiene y mantiene próximas a las células entre sí, consiguiendo un elevado grado de interacción, comunicación intercelular y la formación de microconsorcios sinérgicos. Dicha matriz protege, además, a los microorganismos frente a la desecación, radiación ultravioleta, algunos antibióticos, biocidas, oxidantes, cationes metálicos, y

defensas inmunes (Carpentier y Cerer, 1993). Sin embargo, es necesario resaltar que los organismos que forman parte del biofilm no se encuentran completamente inmovilizados, sino que tienen la capacidad de moverse en el interior de la biopelícula y hasta llegar a desprenderse de la misma (Flemming y Wingender, 2010).

Por otro lado, cabe destacar que los distintos tipos de (EPS) que se pueden llegar a formar en la matriz que compone un biofilm dependen de:

Las fuerzas de cizalla producidas durante la formación de la propia matriz; La temperatura alcanzada durante el proceso de formación; La disponibilidad de nutrientes durante dicho proceso; Los microorganismos que se encuentran formando parte de estas estructuras (Flemming y Wingender, 2010).

→ Por lo general, la matriz de un "biofilm" se compone por:

Proteínas	Agua	Lípidos
Polisacáridos	Otros Biopolímeros	Ácidos nucleicos

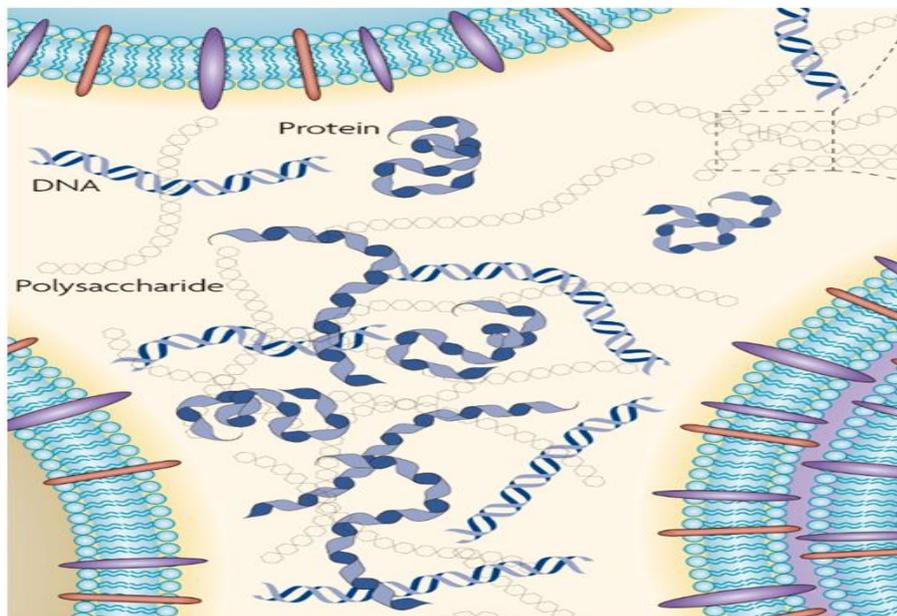
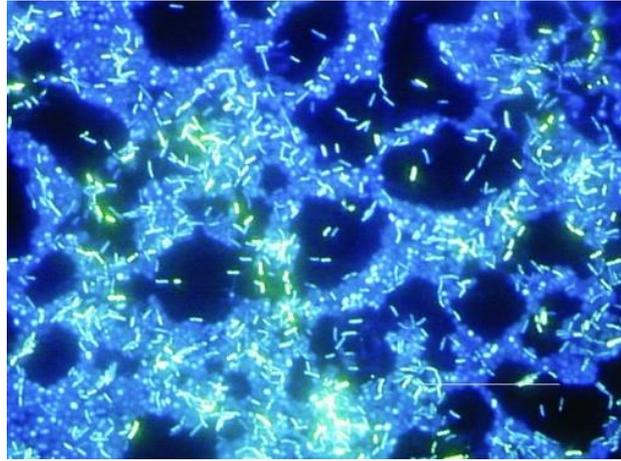


Figura 1. Distribución de los componentes mayoritarios de la matriz de un "Biofilm bacteriano".

### AGUA:

En el interior de estas biopelículas las microcolonias están separadas por una red de canales de agua que funciona como un sistema circulatorio primitivo, actuando como un medio de transporte de nutrientes y de remoción de productos

de desecho. Todo ello ocurre debido a que el agua es predominantemente aniónica, de manera que crea un sistema para atrapar los nutrientes y minerales del medio externo que rodea al biofilm. Por lo tanto, los canales son, en esencia, la línea de vida del sistema (De Beer y col. 1994).



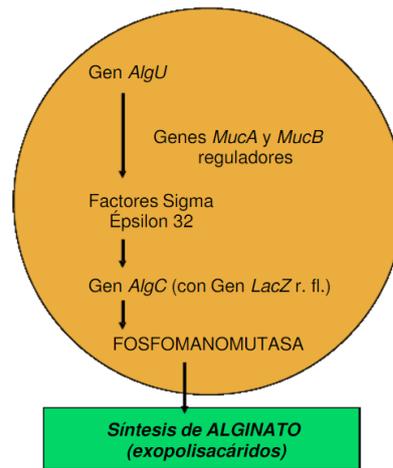
**Figura 2.** Biopelícula desarrollada en una superficie de acero inoxidable en un sistema de agua potable en un laboratorio. CANALES DE H<sub>2</sub>O

### EXOPOLISACÁRIDOS:

Se trata de moléculas largas, lineales o ramificadas, con masa molecular alrededor de  $10^6$ , consistentes en una mezcla de azúcares neutros y cargados, de forma que dan lugar a heteropolisacáridos. Pueden contener, además, sustituyentes orgánicos o inorgánicos que afectan de forma significativa a sus propiedades físicas y biológicas. **Por ejemplo**, uno de los exopolisacáridos más habituales es el **alginato**, constituido por los ácidos D-manúrico y L-gulurónico (Sutherland, 1990) y producido en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (uno de los modelos de biofilms más estudiados).

A continuación, haremos mención a la formación y producción de **alginato**:

En un primer momento, el gen *algU*, en presencia de los genes reguladores *mucA* y *mucB*, empieza a favorecer la síntesis de dos sustancias llamadas «factor sigma 32» y «factor épsilon 32», las cuales, al actuar sobre el gen *algC* (que tiene como regulador al gen *lacZ*), inducen la formación de una enzima denominada fosfomanomutasa. Ésta participa activamente en la síntesis de **alginato**, un exopolisacárido que favorecerá la protección, la adhesión de las bacterias a distintas superficies y el mantenimiento de la integridad estructural (Forte y Rebagliati, 2013).



**Figura 3.** Desencadenamiento de la producción de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* por la acción de los genes intervinientes. SNS 2013.

### PROTEÍNAS EXTRACELULARES:

- Las proteínas enzimáticas poseen funciones que permiten el crecimiento del biofilm y la supervivencia de las células alojadas mediante el acceso a nutrientes, la regulación de la integridad o la estabilidad del biofilm (Costerton y Zbigniew, 1997).
- Las proteínas no enzimáticas de la matriz, tales como las asociadas a las paredes celulares o las **lectinas** (proteínas de unión a carbohidratos), están implicadas en la formación y estabilización de la red de polisacáridos de la matriz y constituyen un enlace entre la superficie bacteriana y las (EPS) extracelulares.

Dichas proteínas promueven la formación de biofilms en diversas especies bacterianas y juegan papeles importantes como la adhesión a superficies inanimadas y a células huésped (Lasa y Penadés, 2006).

Por último, los apéndices proteicos, tales como **pili, fimbrias y flagelos**, pueden también actuar como elementos estructurales mediante su interacción con otras (EPS) de la matriz del biofilm (Cegelski y col. 2009).

### TENSIOACTIVOS Y LÍPIDOS:

De carácter hidrofóbico, son cruciales para la adherencia de las bacterias a superficies hidrófobas. Además, otras (EPS) con capacidad tensioactiva, como **surfactina, viscosina y emulsan**, pueden dispersar sustancias hidrofóbicas y facilitar su disponibilidad. Los biotensioactivos han sido identificados como

factores que promueven la formación inicial de microcolonias, facilitando la migración de bacterias asociadas a la superficie y la formación de estructuras con forma de champiñón, previniendo la colonización de canales y contribuyendo a la dispersión del biofilm (Costerton y col. 1999).

### ADN EXTRACELULAR (eADN):

Constituye una parte integral de la matriz (Wingender y col. 1999). Por ejemplo, se ha comprobado que el eADN es un componente mayoritario en la matriz de biofilms de *P. aeruginosa*, donde actúa como conector intercelular (Whitchurch y col. 2002). En biofilms de otras especies, el eADN actúa como adhesivo o incluso como antimicrobiano, causando lisis celular.

- Además, las biopelículas también se encuentran influenciadas por otros muchos factores como: -Las condiciones hidrodinámicas, movilidad bacteriana, concentración de nutrientes, comunicación intercelular y los iones metálicos que podrían existir en el medio- (Costerton y col. 1999).
- Esta población de células que crecen adheridas a una superficie y están rodeadas por dicha matriz de exopolisacáridos funcionan como un consorcio cooperativo de un modo complejo y coordinado, es decir, con un ciclo de vida interdependiente, en el cual, cada una de las células actúa como parte integral de una población o comunidad que se denomina “*biofilm*”.

## FORMACIÓN

La formación de estas estructuras sobre las superficies es una estrategia adaptativa que sigue un proceso secuencial dinámico y complejo que permite su predicción (Kumar y Anand, 1998). Dicho proceso comienza con la adhesión de células a la superficie, dando como resultado la creación de microcolonias, que induce a dichas células a cambios fenotípicos a través de los cuales se adaptan al nuevo entorno establecido y dan comienzo a la producción de (EPS) para formar la matriz del biofilm y hacerlo crecer.

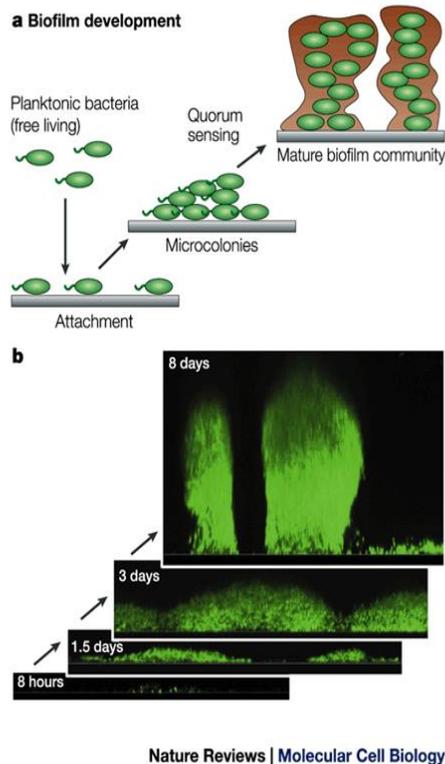


Figura 4. Etapas de la formación de un biofilm maduro sobre una superficie. Nature Reviews.

## FASES DE FORMACIÓN DE UN BIOFILM

### 1º Adhesión bacteriana primaria:

Consiste en el encuentro entre una superficie y una bacteria planctónica basándose en una serie de variables fisicoquímicas que dan lugar a la interacción entre la pared bacteriana y la superficie en cuestión. En primera instancia, la bacteria debe acercarse a la superficie, bien de manera directa por quimiotaxis, por una corriente de flujo o por la movilidad de la propia bacteria (Costerton y col. 1999). Una vez que el microorganismo está a menos de 1 nanómetro (nm) de la superficie se produce la unión gracias a las fuerzas atractivas o repulsivas en ambas superficies (Por ejemplo, las interacciones electrostáticas) (Lindhe y col. 2000). Cabe destacar que esta unión es totalmente **reversible**.

### 2º Adhesión bacteriana secundaria:

La unión comentada anteriormente se consolida con la producción bacteriana de exopolisacáridos, que se acoplan con los materiales de la superficie por ligandos específicos de receptores que se localizan en pilis, fimbrias y flagelos de la bacteria en el proceso de adhesión. En este caso, la unión es **irreversible**

y el microorganismo queda firmemente unido a la superficie inerte. Durante esta fase, las bacterias planctónicas se pueden unir unas a otras (Co-agregación) y a diferentes especies que estén ya unidas al material (Co-adhesión), formando las microcolonias de sustrato (Lindhe y col. 2000).

### 3º Maduración del biofilm:

Una vez que la bacteria se ha unido de forma irreversible, comienza el proceso de maduración del biofilm. Las bacterias se dividen activamente y los compuestos extracelulares originados por ellas mismas interaccionan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio creando así, el glicocálix (Busscher y Van Der Mei, 1997).

### 4º Desprendimiento activo:

El equilibrio dinámico de un biofilm se alcanza cuando las capas más externas de éste comienzan a generar células planctónicas metabólicamente activas y capaces de dividirse, las cuales pueden colonizar nuevas superficies (Busscher y Van Der Mei, 1997). Esta liberación puede darse por dos mecanismos (Xabier y col. 2003):

- Erosión (Pérdida de células individuales).
- Migración (Pérdida de agregados mayores).

Además, es necesario resaltar que la formación de las biopelículas puede ocurrir por al menos tres mecanismos distintos:

#### 1. **Redistribución de las células unidas por la motilidad superficial:**

Estudios realizados por O'Toole y Kolter sobre mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* revelan que la motilidad nerviosa (mediada por pili de tipo IV) juega un papel importante en la agregación superficial en este organismo.

#### 2. **División binaria de las células:** A medida que las células se van dividiendo, las células hijas se extienden hacia fuera y hacia arriba desde la superficie de unión para formar grupos de células (como la formación de colonias en las placas de AGAR). ("Crecimiento y desprendimiento de células del cluster biofilm en flujo turbulento", [www.microbelibrary.org/Visual/page1.htm](http://www.microbelibrary.org/Visual/page1.htm)).

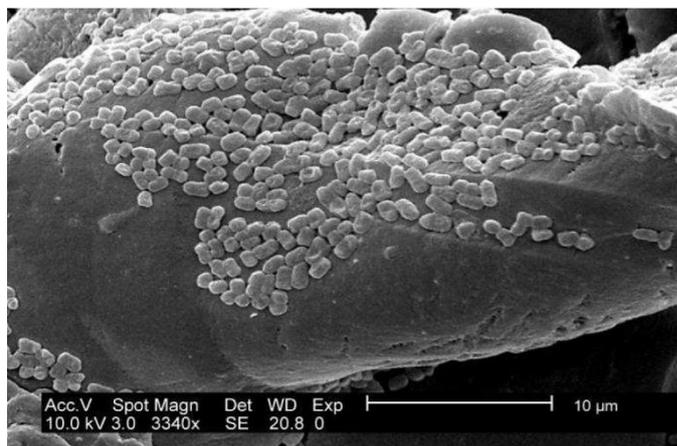
### 3. Reclutamiento de células del fluido a granel al biofilm en desarrollo:

La biopelícula madura muestra una estructura que se extiende perpendicular a la superficie (con forma de champiñón) (Kumar y Anand, 1998) y que presenta canales o huecos intersticiales por los que circula agua, nutrientes, productos metabólicos y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. Este hecho se ha probado gracias a la labor de los investigadores que a través de técnicas de partículas de seguimiento han sido capaces de demostrar dicho flujo.

La existencia de estos canales no evita que dentro del biofilm se puedan encontrar diferentes ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea distinta. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentran las bacterias dentro del biofilm y dificulta su estudio (Lasa y col. 2009).

Además, la formación de una biopelícula depende fundamentalmente de la interacción entre:

- Los microorganismos: Puede estar constituida por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas.
- La superficie de anclaje.
- Factores medioambientales.



**Figura 5.** Imagen de un biofilm de la bacteria *Escherichia coli* obtenida con un microscopio electrónico de barrido. Imagen obtenida del CDC Public Health Image Library.

Es preciso destacar que las biopelículas pueden tener diferentes formas dependiendo de las condiciones ambientales bajo las cuales se forme; Por ejemplo, las propiedades superficiales e intersuperficiales, los nutrientes

disponibles, el tipo de bacterias que conforman la comunidad microbiana, hidrodinámica, entre otras (Davey y O'toole, 2000). Los biofilms que crecen bajo un flujo laminar se observan poco uniformes y están constituidos por células redondas, irregulares y agregados separados por espacios intersticiales; los que crecen bajo corrientes turbulentas se observan dispares, elongados, en serpentina y oscilan en la mayor parte del fluido y los que crecen estratificados y compactos se desarrollan sobre los dientes (Hirsch, 1984).

### PROPIEDADES DE LOS MICROORGANISMOS:

Los microbios pueden colonizar una amplia variedad de superficies tanto en ambientes bióticos como abióticos (Costerton y col. 1995); su habilidad para persistir en la biosfera obedece tanto a su versatilidad metabólica como a su plasticidad genotípica.

El anclaje de microbios a superficies para la formación de biofilms es un proceso físico-químico determinado por fuerzas electrostáticas entre las células y la superficie. Por ello la superficie externa de los distintos microorganismos determina si dichas propiedades pueden dar lugar a la formación de la biopelícula.

- La presencia de **flagelos** favorece la capacidad para formar estas biopelículas, sobre todo, en las primeras etapas de su formación ya que ayuda a vencer las fuerzas de repulsión asociadas con el substrato durante la adhesión.
- Las **fimbrias** también favorecen la formación del biofilm.
- La función de los **pilis** en la conjugación (Transferencia horizontal de genes a otras células) puede estimular la formación de estas estructuras.
- Presencia de **polisacáridos** en la superficie externa de las células fomenta la formación de biopelículas.
- “**Quorum sensing**” o autoinducción (consiste en un mecanismo de regulación en la formación del biofilm que depende de la producción de moléculas señal de bajo peso molecular las cuales permiten a las bacterias apreciar la densidad poblacional existente).
  - Bacterias Gram -: La principal molécula señal es la **Acilhomoserina lactona**.

- **Bacterias Gram +:** Los principales inductores son **péptidos**.

Por consiguiente, cuando existe una suficiente cantidad de autoinductor en el medio extracelular estas moléculas mandan una señal activando a un receptor específico, el cual altera la expresión génica afectando a distintos fenotipos.

**CURIOSIDAD:** Se ha identificado una molécula denominada “**Furanona**” producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura similar a las acilhomoserinas lactonas pero en lugar de producir la activación consiguen bloquear al receptor específico inhibiendo, por consiguiente, la formación del biofilm. En la actualidad, se está intentando desarrollar inhibidores derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica.

### PROPIEDADES QUE ADQUIEREN LAS BACTERIAS AL FORMAR PARTE DE UN BIOFILM:

Una vez los microorganismos forman parte de este tipo de estructuras desarrollan diferentes interacciones metabólicas:

- **Modificación del microambiente:** Modificación del pH según sus necesidades metabólicas, dando lugar a microambientes óptimos para el crecimiento de microorganismos anaeróbicos, a pesar de la presencia de oxígeno en el medio líquido (Wolfaardt y col. 1994).
- **Sinergismo:** La tendencia de las bacterias a la colonización es una gran ventaja ya que induce las relaciones simbióticas entre diferentes especies. Por ejemplo, cuando un alimento es requerido por un microorganismo, otro no lo puede utilizar, pero sí puede existir intercambio de nutrientes permitiendo de esta manera la supervivencia de ambos dentro de un mismo biofilm.
- **Competencia:** Por nutrientes, factores de crecimiento, espacio... da lugar a que los diferentes microorganismos embebidos en estas estructuras lleguen a producir distintos mecanismos de acción como son la producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisosomas, proteasas e incluso llegar a alterar el pH produciendo ácidos orgánicos (Ácido butírico, Ác. Propiónico, entre otros) (Costerton y col. 2005).

- **Antagonismo:** En las biopelículas supone un desafío la supervivencia de dos especies que produzcan sustancias antagonistas. Estas sustancias varían y pueden ir desde las que afectan a las uniones hasta las que pueden llegar a destruir la especie (Por ejemplo, peróxido de hidrógeno). Por ello, la forma que tienen las bacterias para evitarlo es producir factores que destruyan las especies antagonistas o hallar sitios que no estén colonizados por estos antagonistas, entre otros mecanismos.

### PROPIEDADES DE LA SUPERFICIE:

- **Rugosidad superficial:** La colonización microbiana incrementa cuando dicha rugosidad aumenta y el área de superficie es mayor (Costerton y col. 1995).
- **Hidrofobicidad:** Mecanismo importante para el proceso de adhesión ya que las interacciones hidrofóbicas tienden a incrementarse cuando aumenta la despolarización natural de uno o ambas superficies involucradas (superficie celular y substrato de la superficie).
  - En este punto, las fimbrias y los flagelos, aparte de participar en la transferencia de virus o ácidos nucleicos bacterianos también contribuyen de forma importante proporcionando hidrofobicidad a la superficie celular ya que muchos contienen aminoácidos hidrófobos (Rodney y Costerton, 2002).
- **Mantenerse limpia.**
- **Resistencia al desgaste.**

Las bacterias son capaces de formar biofilms sobre muchas superficies bióticas y sobre todas las abióticas probadas. La capacidad de unirse a diversos plásticos, cristales y metales, depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices (pili tipo IV y flagelos; los cuales son utilizados por los microorganismos para moverse a lo largo de la superficie hasta encontrar otras bacterias para formar microcolonias y adherirse a dicha superficie. Han sido ampliamente documentadas algunas especies bacterianas incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*).

Asimismo, diversos investigadores han afirmado que la adhesión microbiana ocurre con mayor rapidez en superficies hidrófobas (como es el caso del Teflón, entre otros plásticos) que en materiales hidrofílicos como el vidrio o los metales.

Aunque numerosos estudios demuestran que el acero inoxidable puede llegar a ser tan susceptible como el plástico (Pedersen, 1990). La acción del aire o de la humedad sobre el acero inoxidable, va originando una capa de óxido de cromo sobre el que se pega la suciedad orgánica. Así se pre-acondiciona el sustrato para la adhesión de las bacterias.

El biofilm puede desarrollarse en distintos tipos de superficies, gracias a que previamente entra en contacto con la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de los microorganismos.

#### **FACTORES MEDIOAMBIENTALES:**

- pH.
- Cantidad de nutrientes.
- Cargas iónicas.
- Temperatura.
- Fluidez.

Los cambios de pH pueden tener una gran influencia sobre el crecimiento de las bacterias, lo que es utilizado con frecuencia en la producción de detergentes y desinfectantes para matar dichos organismos. Estos microorganismos responden a cambios en el pH tanto externo como interno, ajustando la actividad y síntesis de proteínas que se encuentran asociadas con diferentes procesos celulares (Olson, 1993). Diversos estudios han demostrado que un aumento gradual de la acidez da lugar a que la supervivencia bacteriana sea mayor en comparación a un aumento repentino por la rápida adición de Ácido clorhídrico (HCl) (Yung-Hua Li y col. 2001). Esto sugiere que los microorganismos poseen mecanismos establecidos que permiten a la población bacteriana adaptarse a pequeños cambios en el pH. Sin embargo, existen procesos celulares que no se adaptan tan fácilmente a las fluctuaciones en el pH como, por ejemplo, la

excreción de sustancias exopoliméricas (polisacáridos) donde el pH óptimo es alrededor de 7 para la mayoría de especies bacterianas (Oliveira, 1993).

Como ya sabemos, el desarrollo de un biofilm depende de las enzimas que controlan el crecimiento de las células, por lo tanto, las fluctuaciones en la temperatura producen cambios en las biopelículas ya que la velocidad de reacción de las enzimas depende de la temperatura. Por ende, una temperatura óptima produce un crecimiento saludable de las bacterias que conforman los biofilms, por el contrario, la temperatura alejada del óptimo reduce la eficacia en el crecimiento bacteriano; Esto es debido a una reducción en las tasas de reacción de las enzimas bacterianas.

Además de las enzimas, la temperatura ambiental afecta a las propiedades físicas de los compuestos tanto dentro como alrededor de las células bacterianas. Fletcher (1977) investigó sobre el efecto de la temperatura en la unión de células en la fase estacionaria y sus resultados mostraron que una disminución de la temperatura reduce las propiedades de adhesión en el caso de *Pseudomonas marino* (Fletcher, 1977). Sin embargo, Herald y Zottola observaron que la presencia de apéndices en la superficie bacteriana era dependiente de la temperatura y para ello, realizaron varios estudios donde observaron que a 35°C las bacterias tenían un solo flagelo, a 21°C tenían dos flagelos y a 10°C poseían varios, sugiriendo así que la interacción entre las células y el sustrato puede ser mayor con una disminución de la temperatura, aumentando la probabilidad de adherencia (Nisbet y col. 1984).

Todas estas características del medio acuoso pueden llegar a ser un factor decisivo en la adhesión bacteriana al sustrato. Numerosos estudios como los realizados por Fletcher (1991) reflejan la importancia de dichos factores. Éste observó como el incremento de cationes (calcio, hierro y sodio) afectan al proceso de adhesión de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* a superficies de vidrio, presumiblemente porque reduce las fuerzas repulsivas entre la carga negativa de las células bacterianas y la superficie del vidrio (Fletcher y col. 1991).

Por todo ello, la importancia del estudio de los “*biofilms microbianos*” radica en el impacto que éstos tienen sobre el área clínica, industrial o incluso sobre la naturaleza.

## BIOFILMS EN EL ÁREA CLÍNICA:

En los países desarrollados se tiende a pensar que las principales causas de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer en sus múltiples modalidades. Sin embargo, los datos en Europa resultan elocuentes; las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad (14,9 millones de muertes), después de las enfermedades cardiovasculares (16,9 millones de muertes) causando el doble de muertes que el cáncer (7,1 millones de muertes) (datos del World Health Organization, WHO, 2002). Como demuestran los datos obtenidos en el año 2008 en países como Estados Unidos con 99,000 muertes al año y 1.7 millones de procesos infecciosos asociados o como la Comunidad Europea con 50,000 muertes al año y 3 millones de pacientes con infecciones en las vías urinarias (32%), neumonías (15%) y septicemias (14%), entre otras (Tacconelli y col. 2009).

El Instituto Nacional de la Salud de E.E.U.U publicó recientemente que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biofilms, incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad en el diagnóstico, además del tratamiento de la enfermedad. Y es que los biofilms tienen una gran importancia en diversos aspectos de la salud pública.

Ejemplos de estas infecciones son las nosocomiales, otitis media, endocarditis de válvulas nativas, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata, osteomielitis y todas las infecciones relacionadas con implantes; Por ejemplo, las prótesis o los catéteres, ya que son superficies ideales para su formación. De igual manera, es preciso destacar, que los dos tipos de bacterias que habitualmente causan estas estructuras son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, encontrándose en 2/3 casos existentes.

Por el contrario, la presencia de ciertos biofilms pueden influir de manera positiva protegiendo al organismo, como:

- *Lactobacilos* presentes en la vagina, donde fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales al ser inducidas por los estrógenos, produciendo ácidos que disminuyen el pH vaginal y **previenen** de esa

manera la **colonización** por otros **microorganismos patógenos** (como *Gardnerella vaginalis* entre otros).

- Otro ejemplo de biofilms beneficiosos lo constituye los formados sobre la superficie de los dientes, que protegen frente a la colonización por otros patógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto en una persona por 20-30 especies bacterianas distintas, entre las que destacan *Streptococcus* y *Actinomyces spp.* Estos microorganismos de la placa dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes. Pero si éstas se alteran, por ejemplo, por el abuso de azúcares, favorecerá el desarrollo de especies bacterianas que fermentan los azúcares, desequilibrando la población bacteriana y favoreciendo el desarrollo de especies como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*, que producen ácidos que disuelven el esmalte protector de los dientes, produciendo así el desarrollo de las dos infecciones más prevalentes en el hombre, las **caries** y la **periodontitis**.

Tras esto, procedemos a describir las infecciones humanas más recurrentes:

<i>Enfermedad-infección</i>	<i>Microorganismo responsable</i>	<i>Referencias</i>
Fibrosis quística (neumonía)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i>	Hoiby 2002, <sup>22</sup> Lyczak 2002, <sup>23</sup> Moreau-Marquis 2008 <sup>24</sup>
Otitis media	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Bakaletz 2007, <sup>25</sup> Post 2007, <sup>26</sup> Feigin 1992 <sup>27</sup>
Periodontitis, caries dental, gingivitis	<i>Streptococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i>	Bryers 2006, <sup>28</sup> Offenbacher 2007, <sup>29</sup> Selwitz 2007 <sup>30</sup>
Prostatitis	Bacterias anaerobias gramnegativas <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> , <i>E. faecalis</i> . Bacterias gramnegativas	Domingue 1998, <sup>31</sup> Nickel, 1993 <sup>32</sup>
Endocarditis valvular	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> , <i>Streptococcus</i>	Wells 1995, <sup>33</sup> Tunkel 1992, <sup>34</sup> Donlan 2002 <sup>35</sup>
Fascitis necrotizante	Estreptococos del grupo A	Presterl 2005 <sup>36</sup>
Osteomielitis	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Wagner 2005, <sup>37</sup> Brady 2008, <sup>38</sup> Kandemir 2005 <sup>39</sup>
Infecciones nosocomiales	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>A. israelii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Donlan 2001, <sup>40</sup> Parsek 2004 <sup>41</sup>

**Figura 6.** Lista parcial de infecciones humanas donde están involucrados los biofilms microbianos.

### **Endocarditis de válvulas nativas**

La endocarditis de válvula nativa (EVN) es un proceso inflamatorio que aparece cuando la superficie del endocardio es colonizada por microorganismos, dando

lugar a un proceso infeccioso que compromete a dichas válvulas (Livornese y Korzeniowski, 1992). Cuando la infección involucra el endotelio de los grandes vasos recibe el nombre de endoarteritis.

Los microorganismos como *Streptococcus* o *Staphylococcus*, alcanzan el torrente sanguíneo desde la orofaringe, el tracto gastrointestinal o el tracto genitourinario, y cuando se produce una lesión en las válvulas estas bacterias se multiplican dando lugar al biofilm, lo que acentúa el daño y puede llegar a provocar embolias sépticas (Ferguson y col. 1986).

### **Otitis media**

La otitis media (OM) es una inflamación del oído medio que implica la inflamación de la mucosa mucoperióstica y generalmente está causada por bacterias. Consiste en la acumulación de líquido detrás del tímpano dando lugar a las condiciones idóneas para la formación de un biofilm por microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Feigin y col. 1992).

### **Prostatitis**

Consiste en una infección de la glándula prostática por la formación de un biofilm. Las bacterias que forman la biopelícula pueden ascender desde la uretra, por reflujo de orina contaminada o por la invasión de bacterias del recto a través de la extensión directa (Domingue y Hellstrom, 1998). Es preciso destacar que si este problema se trata en sus inicios puede ser erradicado mediante antibióticos, pero si las bacterias persisten puede dar lugar a infecciones crónicas (Níquel y col. 1994).

### **Implantes médicos**

En el caso de los implantes, el biofilm puede estar compuesto tanto de bacterias Gram positivas, Gram negativas o incluso por levaduras. Estos microorganismos proceden de la piel del propio paciente, del ambiente o del propio personal sanitario. Pueden estar formados por una única especie o por múltiples dependiendo del implante y de la duración de su uso en el paciente. Una vez asentado y madurado el biofilm, éste actúa como una fuente de infección, sobre todo, en aquellos pacientes inmunocomprometidos.

## BIOFILMS EN LA INDUSTRIA:

A continuación, se procede a describir la importancia que toman las biopelículas en el área industrial y su papel en los distintos sectores como la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. La presencia de biocapas bacterianas en algunos de los productos procedentes de estos sectores podrían afectar negativamente a la salud pública (Chmielewsky y Frank, 2003).

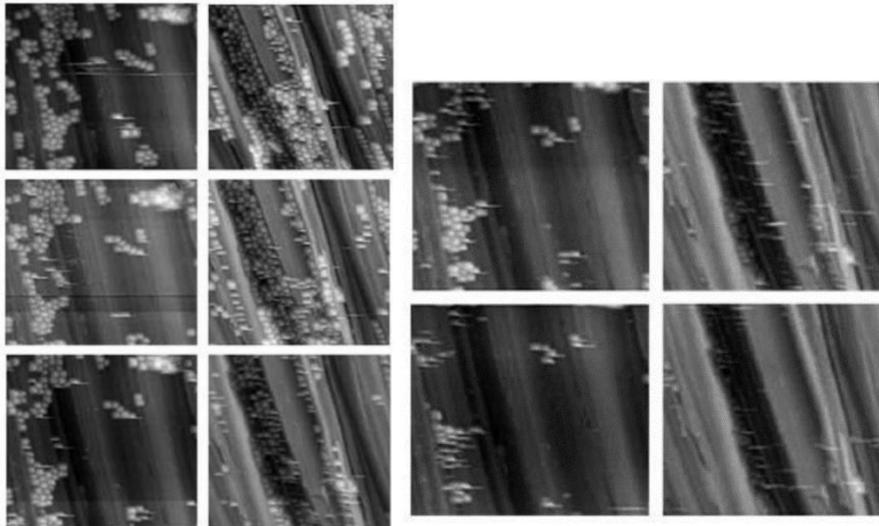
Uno de los principales problemas que presentan estas estructuras está relacionada con la firmeza de su adhesión, lo que dificulta su limpieza (Carpentier y Cerf, 1993; Fuster y Valls, 2006), además de la sensibilidad de estos microorganismos a los biocidas y antibióticos impidiendo una total desinfección e induciendo la aparición de resistencias.

Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de biofilms puede interferir en diferentes procesos y causar daños en los equipos (Kumar y Anand, 1998; Chmielewski y Frank, 2003). Esto puede ocurrir en sistemas de agua potable, donde estas formaciones pueden obstruir las cañerías, disminuyendo así la capacidad de transporte y su velocidad dando lugar a un incremento en el consumo energético; también en intercambiadores de calor y torres de refrigeración, donde reducen la transferencia de calor y, por tanto, la eficiencia del proceso. De igual manera, en superficies metálicas donde pueden causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de estas bacterias (Chmielewski y Frank, 2003).

En industrias como la láctea, al emplear sistemas de ultrafiltración y ósmosis inversa durante el fraccionamiento de la leche y otros líquidos, clarificación de zumos, ... Se precisa el uso de unos filtros y membranas que presentan unos poros de muy pequeño diámetro en continuo contacto con el alimento. La más mínima adsorción microbiana bloquearía estos poros provocando la colmatación del filtro, generando una reducción del flujo, pérdidas del rendimiento y del producto (Piera Serra, 2003).



**Figura 7.** Microscopía de epifluorescencia directa. Bacterias retenidas en los arañazos de una superficie de acero inoxidable que ha sufrido abrasión (Verran, 2002).



**Figura 8.** Células de *Staphylococcus aureus* adheridas sobre acero inoxidable, antes y después de un cepillado con agua y detergente. Imágenes AFM (Verran, 2008).

La diversidad bacteriana y las diferentes capacidades de éstas en la formación de biofilms pueden dar lugar a un aumento de los riegos por contaminación en

los casos donde actúan géneros bacterianos

como

*Pseudomonas*,  
*Flavobacterium*,  
*Staphylococcus*,  
*Enterobacter*,  
*Listeria*,  
*Alcaligenes*,

Lugar	Aislados de los biofilms (%)	Referencia
Planta de procesamiento de leche, líneas de pasteurización	<i>Bacillus cereus</i> (12) <i>Escherichia coli</i> (11) <i>Shigella</i> sp. (11) <i>Staphylococcus aureus</i> (8)	Sharma y Anand, 2002
Planta de helados, cinta transportadora o unidad de alimentación	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella</i>	Gunduz & Tuncel, 2006
Unidad procesadora de caviar	<i>Neisseriaceae</i> (25) <i>Pseudomonas</i> (6) <i>Vibrio</i> (10) <i>Listeria</i> (3)	Bagge-Ravn y col. 2003
Planta de procesamiento de gambas	<i>Pseudomonas</i> (66) <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>	Guobjornsdottir y col. 2005
Planta de procesamiento de pescado	<i>Enterobacteriaceae</i> (27) <i>Serratia liquefaciens</i>	Guobjornsdottir y col. 2005

**Figura 9.** Especies microbianas halladas en biofilms de diferentes industrias (Shi y Zhu, 2009).

*Bacillus* (Mattila Sandholm y Wirtanen, 1992; Lee Wong, 1998).

Por ello, seguidamente, citaremos bacterias de especial importancia en la seguridad alimentaria (González Ribas, 2005).

### **Campylobacter jejuni**

Bacterias capaces de producir biopelículas tanto en ambientes acuáticos como sobre superficies de acero inoxidable y cristal. Igualmente, desarrollan biofilms más rápidamente bajo condiciones aeróbicas estresantes (20% O<sub>2</sub>) que en condiciones de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>), lo que demuestra la capacidad de este microorganismo para adaptarse a las condiciones en su beneficio, actuando como reservorio de células viables (Reuter y col. 2010) y aumentando así el riesgo de contaminación.

### **Listeria monocytogenes**

Las cepas de *Listeria* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes por medio de flagelos, pili y proteínas de membrana. En la industria láctea, esta bacteria puede encontrarse presente tanto en la leche líquida como en los productos elaborados, pudiendo estar asociada a la aparición de brotes clínicos; Esto es debido a que la presencia de residuos lácteos en las conducciones favorece la supervivencia del biofilm ya que supone una fuente de nutrientes para las bacterias (Lee Wong, 1998).

Además, estudios realizados sobre este patógeno han demostrado que también pueden llegar a formar biofilms en máquinas loncheadoras y en otros utensilios de acero (Keskinen y col. 2008).

### **Salmonella spp.**

Entre las zoonosis de etiología bacteriana más importantes, la salmonelosis ocupa un lugar destacado. Según datos de la European Food Safety Authority (EFSA), *Salmonella spp.* es el primer causante de brotes de toxiinfección alimentaria en la Unión Europea (UE) en los últimos años (EFSA, 2009).

Varios estudios han demostrado que *Salmonella* se puede adherir y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos y entre las que se incluyen plásticos, cemento y acero (Joseph y col, 2001; Chmielewsky y Frank, 2003). Esto se debe a que poseen estructuras de

superficie que le facilitan la adhesión, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (González Ribas, 2005).

### **Escherichia coli**

Para la formación de biofilms *E. coli* emplea flagelos, pili y proteínas de membrana para iniciar su adhesión al igual que *Listeria*. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (González Ribas, 2005; Houdt y Michiels, 2005).

Además, cabe destacar que la formación de biofilms les proporciona una mayor resistencia cuando éstas se exponen a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Wilks y col. 2005; Ryu y Beuchat, 2005) provocando así graves problemas en el sector industrial.

### **Pseudomonas spp.**

Estas bacterias se encuentran en ambientes de procesado de alimentos incluidos desagües, suelos, superficie de carnes, frutas, verduras y productos lácteos de baja acidez (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas, 2005).

*P. aeruginosa* es el modelo bacteriano en el que se han realizado la mayoría de los estudios de formación de biofilms y regulación mediante “quorum sensing” (Golovlev, 2002). Produce una gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares lo que le permite unirse a superficies de materiales inorgánicos, como el acero inoxidable. Dentro de las biopelículas puede coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos formando biofilms multi-específicos mucho más estables y resistentes (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas, 2005).

### **Bacillus spp.**

Son capaces de sobrevivir durante procesos que utilizan calor y acumularse en las tuberías en forma de biofilms incluso si los fluidos calientes están continuamente fluyendo sobre estas superficies durante más de 16 horas (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas, 2005) provocando así graves problemas en el sector.

Por todo ello, la presencia de biofilms en la Industria alimentaria, farmacéutica o en la cosmética puede suponer un importante problema tanto tecnológico como

de Salud Pública. Por lo que se ha optado en que la prevención sea, una vez más, la estrategia de elección a la hora de controlar este problema.

En pocas palabras, con una mejora en la limpieza/desinfección y con un avance en las líneas de investigación en fisiología microbiana, ecología microbiana, microbiología alimentaria o sostenibilidad se podría llegar a controlar o incluso erradicar estas formas de vida en la industria y así terminar definitivamente con la problemática de hoy en día.

## **BIOFILMS EN LA NATURALEZA:**

Las comunidades bacterianas juegan un papel clave en la producción y degradación de materia orgánica, en la degradación de contaminantes del medio ambiente, y en el ciclo del nitrógeno, azufre y metales. La mayoría de estos procesos naturales requieren el esfuerzo común de bacterias con diferentes capacidades metabólicas, siendo probable que los microorganismos que residen dentro de los biofilms intervengan en estos complejos procesos. El uso de microorganismos para eliminar los contaminantes, por ejemplo, metales y núclidos de radio (Barkay y Schaefer, 2001), derrames de petróleo (Radwan y col. 2002), compuestos de nitrógeno (Li y col. 2003) y purificación de aguas residuales industriales (Sekoulov y Brinke-Seiferth, 1999) provocan grandes problemas debido a la formación de estas estructuras, ya que suponen una amenaza potencial para todos y cada superficie.

Los estudios en biorreactores y cultivos de enriquecimiento han demostrado lo comentado anteriormente, que las biopelículas están implicadas en el procesamiento de aguas residuales, en el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con productos de petróleo e incluso en la nitrificación.

Estas estructuras también se forman en numerosos ambientes extremos, como en el drenaje ácido de minas (AMD) a un pH 0, en manantiales termales donde producen tapetes microbianos de cianobacterias, entre los más destacados. Recientemente, los investigadores han comenzado a estudiar las formaciones de biopelículas en la cubierta de hielo del lago "desértico" en la Antártida. Dónde se han encontrado comunidades complejamente estructuradas para llevar a

cabo una variedad de procesos biológicos, tales como la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis y la fermentación.

## ELIMINACIÓN Y CONTROL DEL BIOFILM

La limitación de nutrientes y agua, el diseño del equipo y el control de la temperatura son factores importantes en el control del biofilm. Desafortunadamente, existen casos donde no es posible reducir la disponibilidad de agua, mejorar el diseño del equipo o reducir las temperaturas de operación, de modo que el control de biofilms suele enfocarse en la limpieza efectiva de zonas con tendencia al crecimiento de estos microbios (Frank, 2000). Las biopelículas eventualmente se forman en áreas húmedas incluso con nutrientes mínimos. Una vez que un biofilm se forme, la limpieza de la superficie se hace más difícil debido a la presencia de (EPS) adherente.

La mayoría de los regímenes de limpieza incluyen la eliminación con agua tibia o caliente seguido de la aplicación de agentes químicos, enjuague y saneamiento (Frank, 2000). La limpieza se puede lograr mediante el uso de productos químicos o la combinación de fuerza química y física (turbulencia de agua o fregado).

### Limpieza:

La mayoría de los agentes químicos de limpieza utilizados en la industria son compuestos alcalinos que actúan como detergentes para la grasa y las proteínas. Pueden usarse en combinación con agentes secuestrantes o quelantes y agentes humectantes aniónicos (compatibles con los compuestos ácidos o alcalinos). En muchas situaciones se requiere del uso ocasional de limpiadores ácidos para superficies con minerales precipitados o que tienen un alto contenido de residuos como, la piedra de leche.

Los agentes humectantes no iónicos se usan en algunas formulaciones ya que controlan la formación de espuma. Los agentes secuestrantes (derivados de fosfato sódico) se utilizan a menudo para quelar minerales dependiendo de la dureza del agua. Los compuestos de limpieza deben formularse con cuidado, ya que muchos componentes son incompatibles o más eficaces si se aplican por separado (Flemming y col. 2000; Lewis, 1980).

El proceso de limpieza puede eliminar el 90% o más de los microorganismos asociados a la superficie, pero se debe tener en cuenta que tras la limpieza las bacterias pueden volver a depositarse en otras localizaciones y donde con el tiempo, el agua y los nutrientes pueden formar un nuevo biofilm. Por lo tanto, el saneamiento además de la limpieza debe ser implementado (Gibson y col. 1999).

### Desinfección:

El cloro se aplica comúnmente como desinfectante debido a su poder oxidante y desinfectante (DeBeer y col. 1994). Aunque existen numerosas investigaciones que avalan que este compuesto no es del todo efectivo cuando se trata de biofilms:

- El saneamiento con 150 partes por millón (ppm) de cloro no fue suficiente para eliminar una matriz de biopelícula de *Salmonella* en acero inoxidable, aunque las células aparentaban estar muertas (Schwach y Zottola, 1984).
- El cloro no pudo penetrar completamente un biofilm de *Pseudomonas klebsiella* (400 µm de espesor) después de 1 hora de exposición (De Beer y col. 1994).
- El cloro y los distintos desinfectantes aniónicos presentaban una mayor capacidad para eliminar el material (EPS) de *Listeria* y *Salmonella* del acero inoxidable que el compuesto de amonio cuaternario (QAC) y el yodo (Ronner y Wong, 1993).
- Los (QAC) son desinfectantes que se aplican en forma de espuma en superficies tales como tuberías, paredes y techos aunque con tiempos de contacto y reacción más largos. Son efectivos contra bacterias gram +, gram -, hongos y levaduras (Carsberg, 1996). Además, no son corrosivos, no irritantes y su actividad no está afectada por la carga orgánica.

Los compuestos de amonio cuaternario se recomiendan a menudo para pisos, paredes y recipientes de almacenamiento, superficies que se pueden desinfectar durante periodos de contacto prolongados y para superficies que no requieren lavado antes de la producción (superficies de contacto no alimentarias) (Giese, 1991).

El dióxido de cloro y las cloraminas también se usan como desinfectantes en la industria alimentaria (LeChevallier y col. 1988; Samrakandi y col. 1997), encontraron que la monocloramina era capaz de penetrar el biofilm bacteriano más fácilmente que el cloro, pero éstas requieren un tiempo de contacto mayor para su efectividad.

Por ende, la selección del desinfectante debe basarse en la probabilidad de existencia de un biofilm y en la carga orgánica asociada a éste.

## TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO Y LA OBSERVACIÓN

**Ensayos ELISA** “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”, para anti-adhesinas de superficie, que son altamente expresadas en células en biopelículas. Con el objetivo de monitorear la formación de biofilms. Por ejemplo, *Staphylococcus* en pacientes con injertos vasculares sintéticos (Chen y Wen, 2011).

**Biopelículas artificiales** donde se permite la visualización de los patrones de adhesión de las células a la superficie. Esta técnica permite medir la absorbancia en intervalos de tiempo determinados para obtener ensayos semicuantitativos de la formación de la biopelícula (Labrie y col. 2010).

**La hibridación fluorescente in situ (FISH)** acoplada a microscopía, se utiliza para analizar la composición y la localización de especies microbianas específicas en la biopelícula. Detecta secuencias de ácidos nucleicos por un oligonucleótido altamente específico para cada bacteria, que hibrida concretamente a su secuencia blanco complementaria en la célula. Estas células se vuelven fluorescentes y son visualizadas a través de microscopía confocal (Yang y col. 2011).

Existen otras técnicas tales como el método de **electroforesis en geles desnaturilizantes en gradiente (DGGE)** para describir la diversidad microbiana e identificar especies individuales en biopelículas y la **microscopía electrónica** para observar la estructura de la biopelícula de forma directa (Yang y col. 2011).

## VENTAJAS VS DESVENTAJAS

El desarrollo de estas biopelículas puede ser beneficioso o perjudicial dependiendo del entorno en el que se forman y el uso que se hacen de ellas.

En cuanto a los beneficios generados por estas estructuras, es necesario resaltar el uso por parte del hombre de las biopelículas, utilizándolos para:

Biodegradación; Biobarreras protectoras; Biorremediación de zonas contaminadas como:

- Eliminación de patógenos y reducción de materia orgánica en aguas de sistemas sépticos asociados a hogares privados.
- Eliminación de contaminantes en plantas de tratamientos de aguas residuales.
- Etc.

Estas estructuras favorecen el crecimiento, reproducción, estabilidad estructural, difusión de sustancias y reserva de energía (Bowen y Koo, 2011). Asimismo, también existen biofilms naturales con funciones protectoras en nuestro organismo, como *Lactobacilos* o los biofilms formados sobre la superficie de los dientes.

Con respecto a los impactos negativos, cabe destacar que los microorganismos que componen los biofilms presentan una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos como antibióticos, desinfectantes, germicidas o incluso a la respuesta inmunológica del hospedador, además tienen la capacidad de ayudar a otras bacterias a resistir el ataque de antibióticos produciendo inhibidores como el caso de las Beta-lactamasas. De esta forma, pueden provocar importantes problemas en la salud pública y ambiental (Hall-Stoodley y col. 2004). Además, el crecimiento bacteriano en la industria puede causar numerosos problemas técnicos en los procesos productivos, la maquinaria e incluso para la salud de los propios empleados, produciendo pérdidas económicas para las industrias.

Por todo ello, es necesario ser consecuentes en la práctica con biopelículas y realizar limpiezas exhaustivas debido a que son muy difíciles de erradicar y pueden generar resistencias sin necesidad de mutar, solo con su capacidad de estar adheridas a una estructura en forma de biofilm (García-Ojalvo, 2015).

## CONCLUSIONS:

The formation of a biofilm is an adaptive strategy that increases the survival capacity of bacteria by providing supplies, protective shield, transfer of genetic material ... All of this, causes problems in the industrial area or medicine, among the most outstanding cases.

The importance of biofilms as a source of infection is reflected in the statistics, where the estimated data reflect that infectious diseases are the second cause of mortality, mainly due to the establishment of these structures.

Also, biofilms developed in the industrial environment are an obstacle because their development can cause technical problems in production processes, machinery, food poisoning by contamination of the product, etc. In short, it could cause losses in this sector.

Therefore, there are currently different lines of research to acquire increasingly detailed knowledge on how biofilms are formed and dispersed in nature and thus to design more prevention strategies where we can avoid microbial contamination to our benefit.

## CONCLUSIONES:

La formación de un biofilm es una estrategia adaptativa que incrementa la capacidad de supervivencia de las bacterias proporcionándoles suministros, escudo protector, transferencia de material genético... Todo ello, provoca que se originen problemas en el área industrial o la medicina, entre los casos más destacados.

La importancia de las biopelículas como fuente de infecciones se manifiesta en las estadísticas, donde los datos estimados reflejan que las enfermedades infecciosas suponen la segunda causa de mortalidad debido en su mayoría al establecimiento de estas estructuras.

Asimismo, los biofilms desarrollados en el ámbito industrial suponen un obstáculo debido a que su desarrollo puede provocar problemas técnicos en los procesos productivos, en la maquinaria, toxiinfección alimentaria por

contaminación del producto, etc. En definitiva, podría causar pérdidas en dicho sector.

Por todo ello, actualmente existen diferentes líneas de investigación para adquirir conocimientos cada vez más detallados sobre cómo se forman y se dispersan los biofilms en la naturaleza y así poder diseñar más estrategias de prevención donde podamos evitar la contaminación microbiana en nuestro beneficio.

## REFERENCIAS

### PÁGINAS WEB

<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/35307/4/bonillacastro.pdf> [Consultado: 05/02/2017].

<http://docplayer.es/212180-Estudio-del-biofilm-formacion-y-consecuencias.html> [Consultado: 15/12/2016].

[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000300002](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002)[Consultado: 15/12/2016].

[http://www.avideter.com/ftp\\_public/A1070308.pdf](http://www.avideter.com/ftp_public/A1070308.pdf) [Consultado: 15/05/2016].

[http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Formacion\\_de\\_Biofilms\\_0913.pdf](http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Formacion_de_Biofilms_0913.pdf)[Consultado: 13/01/2017].

[http://www.betelgeux.es/images/files/Externos/Los\\_biofilms\\_como\\_reto\\_para\\_la\\_industria\\_alimentaria.pdf](http://www.betelgeux.es/images/files/Externos/Los_biofilms_como_reto_para_la_industria_alimentaria.pdf) [Consultado: 13/01/2017].

<http://www.biofilm.montana.edu/node/2930> [Consultado: 29/12/2016].

<http://www.cun.es/investigacion/publicaciones-cientificas/biofilms-bacterianos-infeccion>[Consultado: 22/02/2017].

<http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir143b.pdf> [Consultado: 03/04/2017].

<http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista54/Articulo%207.pdf>[Consultado: 05/04/2017].

[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/art\\_revi2\\_2.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/art_revi2_2.pdf)[Consultado: 5/02/2017].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2208/> [Consultado: 04/04/2017].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025405/> [Consultado: 28/01/2017].

[www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM37\\_14.pdf](http://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM37_14.pdf) [Consultado: 13/02/2017].

[www.tdx.cat/bitstream/10803/5664/1/fgr1de1.pdf](http://www.tdx.cat/bitstream/10803/5664/1/fgr1de1.pdf) [Consultado: 29/05/2017].

<http://www.betelgeux.es/blog/2015/03/10/componentes-y-funciones-de-la-matriz-de-los-biofilms-bacterianos/>[Consultado: 21/04/2017].

[http://eprints.ucm.es/22535/1/Eva\\_Fern%C3%A1ndez\\_VidalFormaci%C3%B3n\\_de\\_biofilms\\_bacterianos\\_sobre\\_distintas\\_superficies\\_de\\_Implantes.pdf](http://eprints.ucm.es/22535/1/Eva_Fern%C3%A1ndez_VidalFormaci%C3%B3n_de_biofilms_bacterianos_sobre_distintas_superficies_de_Implantes.pdf) [Consultado: 15/02/2017].

<http://digital.csic.es/bitstream/10261/2151/1/biofilms.pdf> [Consultado: 02/03/2017].

## ARTÍCULOS

- Bowen WH. y Koo H.** 2011. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research*. **45**: 69-86.
- Busscher HJ. y Van Der Mei.** 1997. Phisico-chemical interactions in initial microbial adhesión and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*. **11**: 24-32.
- Carpentier B. y Cerf O.** 1993. Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 499-511.
- Chen L. y Wen Y.** 2011. The role of bacterial biofilms in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*. **3**: 66-73.
- Chmielewski RAN. y Frank JF.** 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**: 22-32.
- Costerton JW. y Zbigniew Lewandoski.** 1997. The biofilm lifestyle. *Advances in Dental Research*. **11(2)**: 192-5.
- Costerton JW., Montanaro L., y Arciola CR.** 2005. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *The International journal of Artificial Organs*. **28 (11)**: 1062-8.
- Costerton JW., Stewart PS., y Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**: 1318-22.
- Costerton JW., Zlewandoski ED., Caldwell DR., Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*. **49**: 711-45.
- Davey ME. y O'toole GA.** 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64(4)**: 1092-2172.
- De Beer D., Stoodley P. y Roe F.** 1994. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering Journal*. **43**: 1131-8.
- Domingue GJ. y Hellstrom WJ.** 1998. Prostatitis. *Clinical Microbiology Reviews*. **11 (4)**: 604-13.
- Donlan, RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **9**:881-90.
- Donlan, RM. y Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15 (2)**: 167-93.
- EFSA.** 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *Scientific Report of EFSA*. Pág. **1-350**.
- Flemming HC. y Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews*. **8**: 623-633.
- Golovlev EL.** 2002. The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. *Microbiology*. **71 (3)**: 249-254.
- Hall-Stoodley L., Costerton JW. y Stoodley P.** 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. **2**: 95-108.
- Houdt RV. y Michiels CW.** 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*. **156**: 626-633.
- Joseph B., Otta SK., Karunasagar I. y Karunasagar I.** 2001. Biofilm formation by Salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 367-372.
- Kumar CG. y Anand SK.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. **42**: 9-27.

- Labrie J., Pelletier-Jacques G. y Deslandes V.** 2010. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*. **41(3)**.
- Lasa I. y Penadés JR.** 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*. **157**: 99-107.
- Lasa I., Del Pozo JL., Penadés JR., y Leiva J.** 2005. Bacterial biofilms and infection. *Anales del Sist. Sanitario Navarra*. **28 (2)**: 163-175.
- Lee Wong AC.** 1998. Biofilms in Food Processing Enviroments. *Journal of Dairy Science*. **81**: 2765-2770.
- Liu J., Prindle A., Humphries J., Gabalda-Sagarra M., Asally M., Lee DY., Ly S., Garcia-Ojalvo J. y Süel GM.** 2015. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature*. **523(7562)**: 550-4.
- Livornese LL. y Korzeniowski OM.** 1992. Pathogenesis of infective endocarditis. New York, Raven Press. Pág. **19**.
- Mattila Sandholm T. y Wirtanen G.** 1992. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*. **8 (4)**: 573-603.
- Níquel JC., Costerton JW., McLean RJ., y Olson M.** 1994. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **33**: 31-41.
- Olson ER.** 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiology*. **8**: 5-14.
- Radwan SS., Hasan RH. y Alamah S.** 2002. Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **50**: 55-59.
- Rodney MD. y Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival machanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15(2)**: 167-93.
- Sekoulov I. y Brinke-Seiferth S.** 1999. Application of biofiltration in the crude oil processing industry. *Water Science and Technology's*. **39**: 71-76.
- Stoodley P., Sauer K., Davies DG., Costerton JW.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review Microbiology*. **56**:187-209.
- Sutherland IW.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. **147**: 3-9.
- Whitchurch CB., Tolker-Nielsen T., Ragas PS. y Mattick JS.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science Journals*. **295**: 1487.
- Wolfaardt GM., Lawrence JR., Robarts RD., y Caldwell SJ.** 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm Community. *Applied and Environmental Microbiology*. **60 (2)**: 434-46.
- Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S. y Song Z.** 2001. Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*. **74-81**.
- Yung-Hua L., Hanna MN., Svensäter G., Ellen RP. y Cvitkovitch DG.** 2001. Cell Density Modulates Acid Adaptation in *Streptococcus mutans*: Implications for Survival in Biofilms. *Journal Bacteriology*. **183(23)**: 6875–6884.
- Zhang XQ., Obispo PL. y Kupferle MJ.** 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology's*. **37**: 345-348.