

Biofilms bacterianos

Íñigo Lasa Uzcudun

Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria.
Universidad Pública de Navarra.

E-mail: ilasa@unavarra.es

Ahora mismo, si se consultase a la comunidad de microbiólogos sobre cuál es el ámbito de la microbiología más influyente en el inicio del nuevo milenio, al margen de preferencias individuales, existiría un amplio consenso en uno de estos dos temas: el análisis de los genomas bacterianos y el proceso de formación de biofilms. No cabe duda que la disponibilidad de la secuencia completa de cientos de genomas microbianos está influyendo enormemente sobre todos los aspectos de estudio de la microbiología. Sin embargo, no es menos cierto que el convencimiento general, sorprendentemente reciente, de que las bacterias en su medio natural se desarrollan formando comunidades de microorganismos afecta a nuestro concepto de las bacterias como seres unicelulares individuales y justifica el desarrollo de una nueva disciplina dedicada a estudiar cómo se forman estas comunidades y qué nuevos fenotipos diferenciales presenta la comunidad con respecto a cada bacteria individual.

Definición

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Figura 1). La primera reflexión que surge respecto a los biofilms es por qué han pasado desapercibidos durante tanto tiempo para las excelentes generaciones de microbiólogos que hemos tenido. Alguno de los lectores quizás este pensando que probablemente los biofilms se encuentran en ambientes muy reducidos que hasta ahora no han llamado demasiado la atención del mundo científico. Nada más lejos de la verdad. La presencia de biofilms es ubicua en la naturaleza, convivimos cotidianamente con ellos, tanto que quizás sea precisamente su ubicuidad la que les ha restado protagonismo. Quién no ha observado el material mucoso que recubre un jarrón en el que hemos tenido depositadas flores, el material resbaladizo que recubre las piedras de los lechos de los ríos, los cascos de los barcos o la superficie interna de una tubería. Otro ejemplo cotidiano de biofilm lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microor-

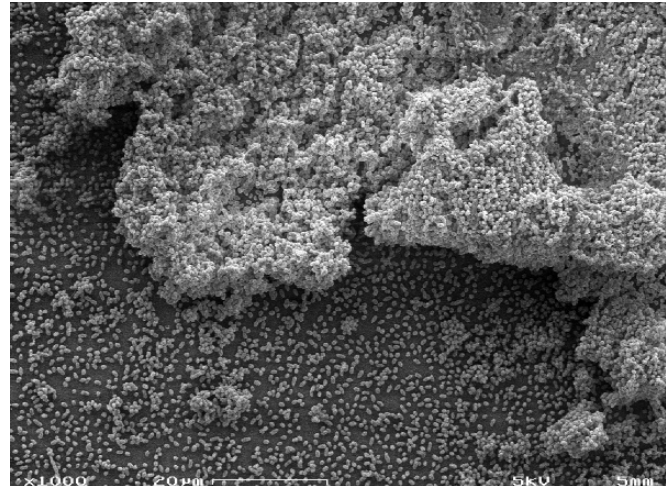


Figura 1. Fotografía de microscopia de barrido de un biofilm de *Salmonella enteritidis*.

ganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias.

En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior del biofilm podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes

en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio.

Biofilms bacterianos e infección

Las enfermedades infecciosas agudas que han ocupado la atención de los microbiólogos durante el siglo pasado estaban causadas por bacterias patógenas especializadas con mecanismos específicos de patogenicidad, como la difteria, la tuberculosis, el cólera o la tos-ferina. Los antibióticos y vacunas desarrollados frente a estas bacterias han tenido una eficacia remarcable en su control. En la actualidad, el primer plano que ocupaban estas bacterias patógenas especializadas ha sido usurpado por bacterias ubicuas, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante

inmunización. Ejemplos de estas infecciones son las relacionadas con los implantes médicos y otras infecciones crónicas como otitis media, neumonía en pacientes con fibrosis quística, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata y osteomielitis (Tabla 1). El análisis directo de los implantes y tejidos de estas infecciones muestra claramente que la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre el tejido o el implante produciendo biofilms. Dentro del biofilm, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos.

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el

Tabla 1. Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos (Costerton *et al.*, 1999)

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos gram-positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodonitis	Bacterias anaeróbicas orales gram-negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos gram-positivos (ej. <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias gram-negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo "viridans"
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones nosocomiales:	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos gram-positivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos gram-positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros microorganismos
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres hickman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos gram-positivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

implante. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido. ¿Cuáles son las razones de esta mayor resistencia a los antibióticos? Entre los mecanismos responsables de la resistencia se incluyen: (i) la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos; (ii) el crecimiento ralentizado de las bacterias del biofilm debido a la limitación de nutrientes; (iii) la existencia de microambientes que antagonizan con la acción del antibiótico; y (iv) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico del biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Mah y O'Toole, 2001). Por otro lado, hay que tener en cuenta que los antibióticos que utilizamos rutinariamente han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas. Así mismo, los ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos (antibiogramas) que se realizan rutinariamente en la clínica están diseñados para medir la susceptibilidad frente al antimicrobiano de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de un biofilm. Parece urgente que se introduzcan nuevos métodos de selección de antimicrobianos y se desarrollen protocolos sencillos diseñados para medir la susceptibilidad de una bacteria en biofilm a los antimicrobianos.

Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biofilm

Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o crecer de forma planctónica nadando libremente en el medio líquido. Con un mismo genotipo, la bacteria expresa un distinto patrón de genes y presenta un distinto fenotipo. En los últimos cinco años muchos grupos de investigación han orientado sus esfuerzos a identificar tanto los genes responsables de la transición biofilm↔planctónica como de los genes necesarios para mantener la estructura del biofilm. Para la identificación de estos genes, casi todos los grupos han utilizado un ensayo de biofilm en placa de ELISA inicialmente descrito por el grupo de Christensen, pero que fue popularizado por el grupo de Roberto Kolter (O'Toole y Kolter, 1998). En este ensayo se produce una colección de mutantes en una cepa formadora de biofilm de la

Íñigo Lasa Uzcudun fue premio extraordinario de la licenciatura en Biología por la Universidad de Navarra. Realizó su trabajo de Tesis doctoral en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid desarrollando herramientas de manipulación genética para bacterias termófilas. Ha realizado estancias postdoctorales en el Instituto Max-Planck de Colonia y el Instituto Pasteur de Paris, donde realizó un estudio sobre el proceso de movilidad intracelular mediado por actina de *Listeria monocytogenes*. Desde 1998, es Profesor Titular de Microbiología y realiza su actividad investigadora en el Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales (UPNA-CSIC) sobre el análisis genético del proceso de formación de biofilms bacterianos.

especie que se este estudiando y se identifican los mutantes que han perdido la capacidad de producir biofilm sobre los pocillos de una placa de ELISA. El ensayo se puede automatizar de forma muy fácil y permite el análisis de un gran número de mutantes de una forma rápida y sencilla. Más recientemente, el desarrollo de la genómica y proteómica ha hecho que muchos grupos estén utilizando técnicas de *microarrays* o proteómica para identificar los genes que se expresan de forma diferente en condiciones planctónicas o de biofilm. Alternativamente, otros grupos han optado por utilizar nuevos métodos de selección de mutantes deficientes en la formación de biofilm como son las placas de calcofluor, la morfología colonial en placas con rojo congo, etc. (Solano *et al.*, 2002). Aunque existe una variación considerable entre los distintos ensayos, estos estudios muestran que hasta el 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre una bacteria crecida en condiciones planctónicas o de biofilm. Entre estos genes, de forma reiterada se encuentra una gran proporción de genes cuya función es desconocida, lo que indica que hay genes específicos del estilo de vida en biofilm, cuyo fenotipo hasta ahora no había podido ser visualizado.

La adherencia primaria y el desarrollo del biofilm

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie. En bacterias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los *curli* son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad pare-

ce que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias gram-positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias gram-positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria (Cucarella *et al.*, 2001; Toledo-Arana *et al.*, 2001). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poli-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir, además de alginato, un polisacárido rico en glucosa que forma un película en la interfase medio aire, al que se ha denominado "*pellican*".

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. En el caso de *S. aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón (*icaADBC*) responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de 10^{-6} y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto de la secuencia de inserción desde el

operón *ica* provocará una nueva variación de fase. Otra alternativa descrita en *S. aureus*, consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para este proceso de biosíntesis (Ubeda *et al.*, 2003). Algunos autores sostienen que en algunas bacterias el proceso de liberación desde el biofilm se produce gracias a la producción de enzimas que degradan de forma específica el exopolisacárido del biofilm. La presencia en distintos genomas de genes codificantes de hipotéticas proteínas (endoglucanasas) que podrían ser responsables de esta función avala esta hipótesis, pero es necesario confirmarla experimentalmente en el laboratorio.

Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Entre ellos, un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de "*quorum sensing*" o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias gram-positivas el autoinductor son péptidos. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. En relación con el *quorum sensing*, se ha identificado una molécula denominada "furanona", producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acilhomoserina lactonas. Estas moléculas en lugar de inducir la respuesta, bloquean el sistema de *quorum sensing* y la consiguiente formación de biofilm. En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación del biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que inhibe un sistema de *quorum sensing* y el proceso de formación del biofilm.

Aparte del *quorum sensing*, se ha demostrado que otros reguladores globales, como CsrA en *E. coli* y CytR en *V. cholerae*, son también determinantes importantes para el desarrollo de biofilm

de estas bacterias. En *S. aureus*, nuestro grupo ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm de esta bacteria. Este trabajo encuentra por primera vez un nexo de unión entre la virulencia de la bacteria y el proceso de formación del biofilm (Valle *et al.*, 2003).

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm. Así, la activación de la síntesis de celulosa en *S. typhimurium* se produce por el activador alostérico c-diGMP. La concentración de este activador depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL. En *S. typhimurium* existen al menos 18 proteínas que contiene estos dominios, y se desconoce si todas estas proteínas afectan a la regulación del proceso de síntesis de celulosa en distintas condiciones ambientales o si son responsables de otras funciones.

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos componentes que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental.

Cuestiones abiertas para el futuro

A pesar de lo mucho que hemos aprendido sobre los biofilms bacterianos en los últimos años, todavía es necesario definir con precisión cuál es el fenotipo "Biofilm". Sólo en ese momento se podrá determinar cuales son los cambios fisiológicos que tienen lugar en el mismo y cuáles son los requerimientos genéticos y los mecanismos de regulación de dicho proceso. Además, esto permitirá unificar los resultados experimentales obtenidos, porque en la actualidad parte de la confusión

existente puede deberse a que estamos incluyendo dentro del paraguas "Biofilm" distintos fenotipos que probablemente no en todos los casos, se ajustan exactamente a la misma definición de biofilm.

Bibliografía

- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I.I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183: 2888-2896.
- Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-39.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43: 793-808.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., and Lasa, I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4538-4545.
- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49: 193-210.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penades, J.R., and Lasa, I. (2003) SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48: 1075-1087.