

BIOPELÍCULA

Una nueva forma de resistencia bacteriana y su evolución

Un problema en la industria alimenticia, energética y farmacológica

BIOFILM

A new bacterial Resistance and its evolution
A problem in food, energy and farmacologic industries

Luis María Forte y Juan Ernesto Rebagliati

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad
Agroalimentaria (Senasa) / Universidad de
Buenos Aires (Argentina) / Universidad
Nacional de Coimbra (Portugal)

Resumen

Se describe la formación de una biopelícula, su crecimiento y su evolución, y la descripción de las etapas de su formación. Genes que intervienen en su generación y enzimas presentes.

Palabras clave: biopelícula, gen, enzimas, mucopolisacáridos

Abstract

A description of growth, evolution and steps of biofilm formation. Gens and enzymes involved in the process.

Key words: Biofilm, Gens, Enzymes, Mucopolysaccharides

Introducción al fenómeno biopelícula (BP)

Es bien sabido que el proceso de evolución biológica es constante. Así como las especies de animales superiores se fueron adaptando con el devenir de los tiempos, las bacterias también han realizado una adaptación a nuevas condiciones de vida. Antibióticos y desinfectantes pésimamente usados, nuevos materiales y sustancias para metabolizar y elementos ambientales incorporados por el desarrollo de la tecnología han provocado que los microorganismos busquen nuevas formas de subsistencia. La BP es una respuesta biológica de los microorganismos a esta evolución de su propio medio.

Últimamente, en muchos tratamientos médicos varias infecciones se han mostrado resistentes a la terapéutica normal, y fue necesario desarrollar nuevas pautas farmacológicas para combatirlos. En la industria de los alimentos, empezaron a ser frecuentes las contaminaciones residuales por microorganismos hasta ahora normalmente controlados por los métodos de higiene comunes y por los desinfectantes habituales.

La industria del petróleo empezó a notar que grandes cantidades de ese material eran degradadas por bacterias que hasta entonces no eran una preocupación comercial. Hasta

ciertas usinas nucleares comenzaron a detectar problemas de enfriamiento en los reactores a causa de esta evolución bacteriana.

Podríamos enumerar una enorme cantidad de campos de la vida humana que se ven interferidos, y no precisamente en forma positiva, por la evolución de los microorganismos.

Como decíamos al inicio, la BP es una de estas formas de adaptación de las bacterias. Pero ¿qué es? ¿Cómo se conforma? ¿Cómo evoluciona? ¿Cómo nos afecta? Y lo más importante: ¿cómo la combatimos?

Características de la biopelícula

En los párrafos siguientes, sobre la base de los estudios realizados por científicos modernos, intentaremos responder a estos interrogantes.

Una BP es una comunidad bacteriana con capacidades metabólicas superiores a las de cada uno de sus integrantes por separado. Puede usufructuar más y distintas rutas metabólicas, gracias a la interacción de sus integrantes.

Aquí ya estamos mostrando que es una comunidad bacteriana que posee varios integrantes, incluso de distinto género y especie, pero que en conjunto se comporta como un solo organismo cuya finalidad es la misma, preservar su especie, colonizar, vivir.

En este conjunto de microorganismos se pueden encontrar todas las interacciones bacterianas conocidas en cada una de las especies: comensalismo, cooperación, simbiosis proto-cooperación, sinergismo, competición, etcétera, pero biológicamente los resultados son mucho más graves para el organismo, superficie o elemento que le da soporte a esta nueva forma de vida bacteriana.

Este tipo de interacción fue corroborado entre *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre cepas de *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp., entre *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* y entre *Hyphomicrobium* sp. y *Pseudomonas putida*, entre varios de los estudios realizados.

En el área médica y biológica las primeras observaciones de su presencia fueron realizadas en odontología y posteriormente en clínica médica de vías respiratorias. Se enumeran a continuación una serie de afecciones en las que se ha identificado la presencia de BP como la responsable del mantenimiento de las patologías.

Lista parcial de infecciones humanas relacionadas con biopelícula

Infección o enfermedad	Especies bacterianas comunes en BP
Caries dentales	Cocos Gram (+), por ej., estreptococos
Periodontitis	Anaeróbicos Gram (-)
Otitis media	Cepas sin tipificar de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones musculoesqueléticas	Cocos Gram (+), por ej., estafilococos
Infecciones del tracto biliar	Bacterias entéricas, por ej., <i>Escherichia coli</i>
Osteomielitis	Bacterias y hongos (mixto)
Prostatitis bacterianas	<i>Escherichia coli</i> y otras Gram (-)
Endocarditis valvular	Estreptococos
Neumonía quística fibrosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Infecciones hospitalarias	
Neumonías	Bacilos gram (-)
Suturas	<i>Staphylococcus epidermis</i> y <i>S. aureus</i>
Desviaciones artero-venosas	Ídem
Lentes de contacto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y cocos Gram (+)
Catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> y otros bacilos Gram (-)
Diálisis peritoneal	Bacterias y hongos
Tubos endotraqueales	Ídem
Catéteres Hickman	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Catéteres venosos	<i>Staphylococcus epidermis</i> y otros
Mecanismos valvulares	<i>Staphylococcus epidermis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram (+)
Dispositivos ortopédicos	<i>Staphylococcus epidermis</i> y <i>S. aureus</i>

Fuente: Costerton *et al.* (1999)

Formación de la biopelícula

Hemos explicitado entonces la idea de que la BP constituye un modo de protección y crecimiento que permite a las bacterias desarrollarse y sobrevivir en un ambiente hostil. Pero esta actividad no es realizada al azar. Las bacterias se agrupan en formaciones que poseen canales de circulación que les proveen los nutrientes requeridos y, a su vez, les posibilita eliminar los desechos metabólicos. Asimismo, en distintas regiones de la BP las bacterias muestran diferente expresión de su capacidad genética, lo que presume una especialización zonal de las bacterias.

Pero la pregunta es ahora ¿cómo comienza esta superpoblación de bacterias a desarrollarse? La respuesta más estudiada la puede dar una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Se comprobó que, en determinados medios hostiles, esta especie comienza a modificar su expresión genética.

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. Esta participa activamente en la síntesis de alginato, un exopolisacárido que favorecerá la protección y la adhesión de la bacteria.

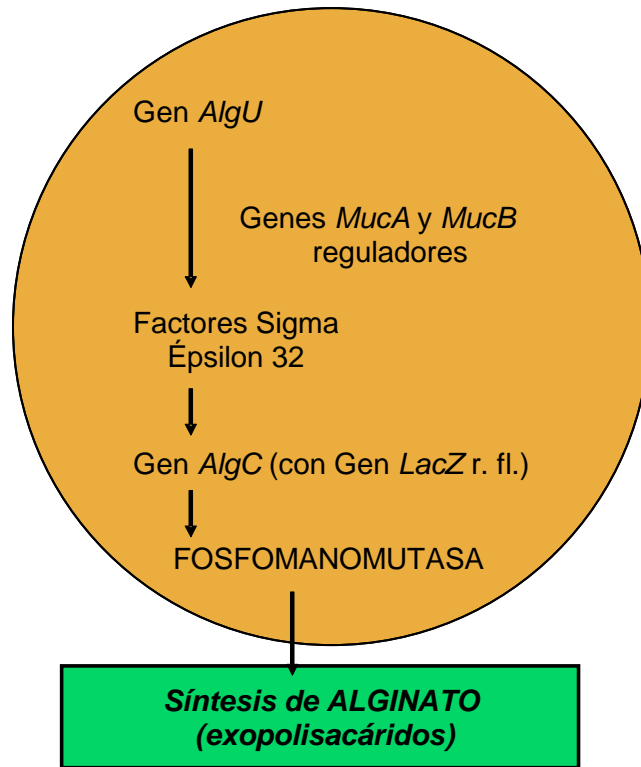
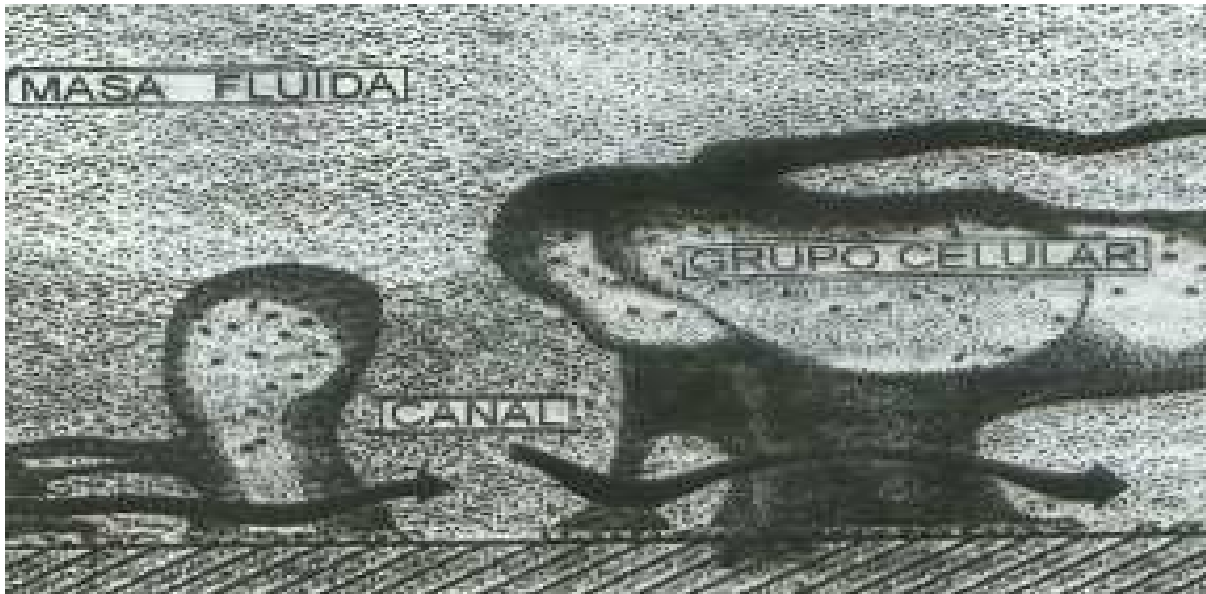


Figura 1: Desencadenamiento de la producción de BP en *Pseudomonas aeruginosa* por la acción de los genes intervinientes

Lo expresado anteriormente vale para esa especie de *Pseudomonas*, pero es altamente probable que otras especies posean un mecanismo similar de síntesis de alginato y otras variedades de exopolisacáridos.

Ahora bien, estos exopolisacáridos ¿cómo actúan en la formación de BP y qué papel cumplen? En realidad, diferentes bacterias en un medio hostil comienzan a segregar estos exopolisacáridos, material que sirve de sostén, protección y aislamiento del medio hostil, y, al mismo tiempo, proporciona la arquitectura y la posibilidad de progreso (colonización) a las distintas especies bacterianas que contiene.

Foto 1: Diagrama del modelo Tulipán o Champiñón (Winpenny y Colassanti, 1997)



Es válido destacar que las BP se desarrollan preferentemente en tejidos muertos o secuestros óseos y en general lo hacen de modo silencioso, sin indicios clínicos, e inducen a la respuesta inmune por parte del organismo, pero los anticuerpos están imposibilitados de alcanzar su objetivo biológico por la protección de los exopolisacáridos. Toda esta acción no hace más que incrementar la lesión de los tejidos circundantes.

En una superficie inerte y sin repuesta biológica (mesas de trabajo de alimentos, catéteres) la BP puede perpetuarse y mantener focos de contaminación e infección recurrentes.

Los mismos polisacáridos que engloban la BP la protegen también de antibióticos y desinfectantes, que no pueden alcanzar sus objetivos en la concentración adecuada, lo cual perpetúa la existencia de la BP. Pero este no es el único problema en su desarrollo.

Se ha estudiado un ciclo de crecimiento de varias BP. Lo vamos a explicar mediante lo hallado en una BP de una cepa de *Acinetobacter GJ12*.

Se emplearon dos medios de diferente composición: uno complejo o muy nutritivo, que, por lo tanto, aporta nutrientes en un alto nivel y brinda la posibilidad de crecimiento, y otro, denominado «medio mínimo», que solo cubre las necesidades de mantenimiento a fin de lograr la supervivencia de las células.

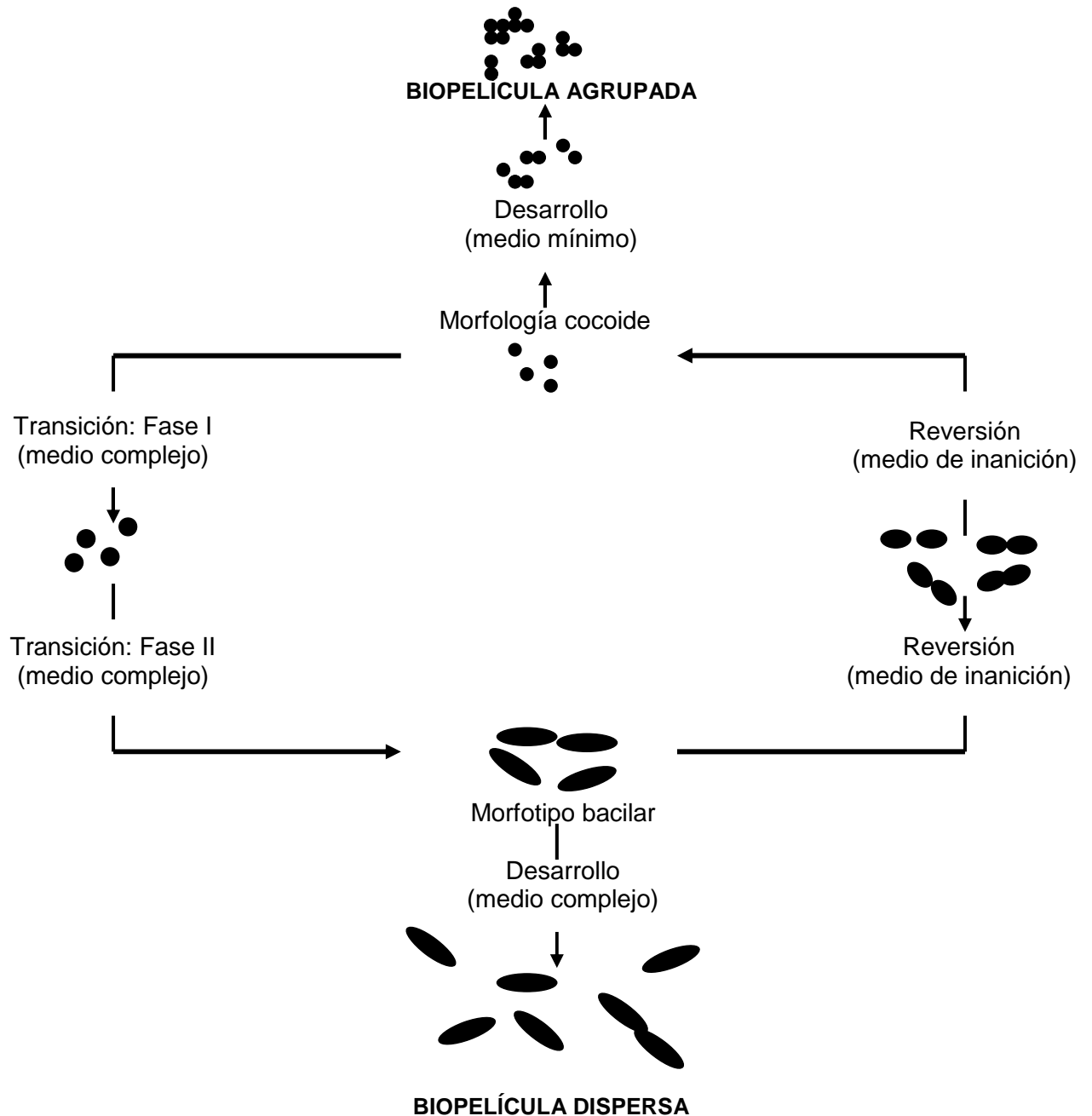
Acinetobacter GJ12

Medio complejo

Triptosa de soja al 10 %
Glicerol
Solución búfer

Medio mínimo

Agua bidestilada
Fosfato de sodio
Sulfato de magnesio
Sulfato férrico
Etanol



El esquema muestra que existen dos formas conocidas de BP: dispersa y agregada. Cualquiera de los dos puede revertir su forma a la que más convenga al desarrollo de las especies dominantes.

La morfología bacilar de las bacterias sometidas a un medio rico en nutrientes da a la BP la posibilidad de crecer y de colonizar; así, extenderse por los tejidos o superficies circundantes. En este paso del ciclo, las células están turgentes, con una enorme actividad metabólica y reproductiva: estamos en presencia de la BP dispersa.

En caso de que la misma BP esté inmersa en un medio de mantenimiento, es decir con pocos nutrientes, hará una reversión a la morfología cocoide y dará origen a una BP agregada.

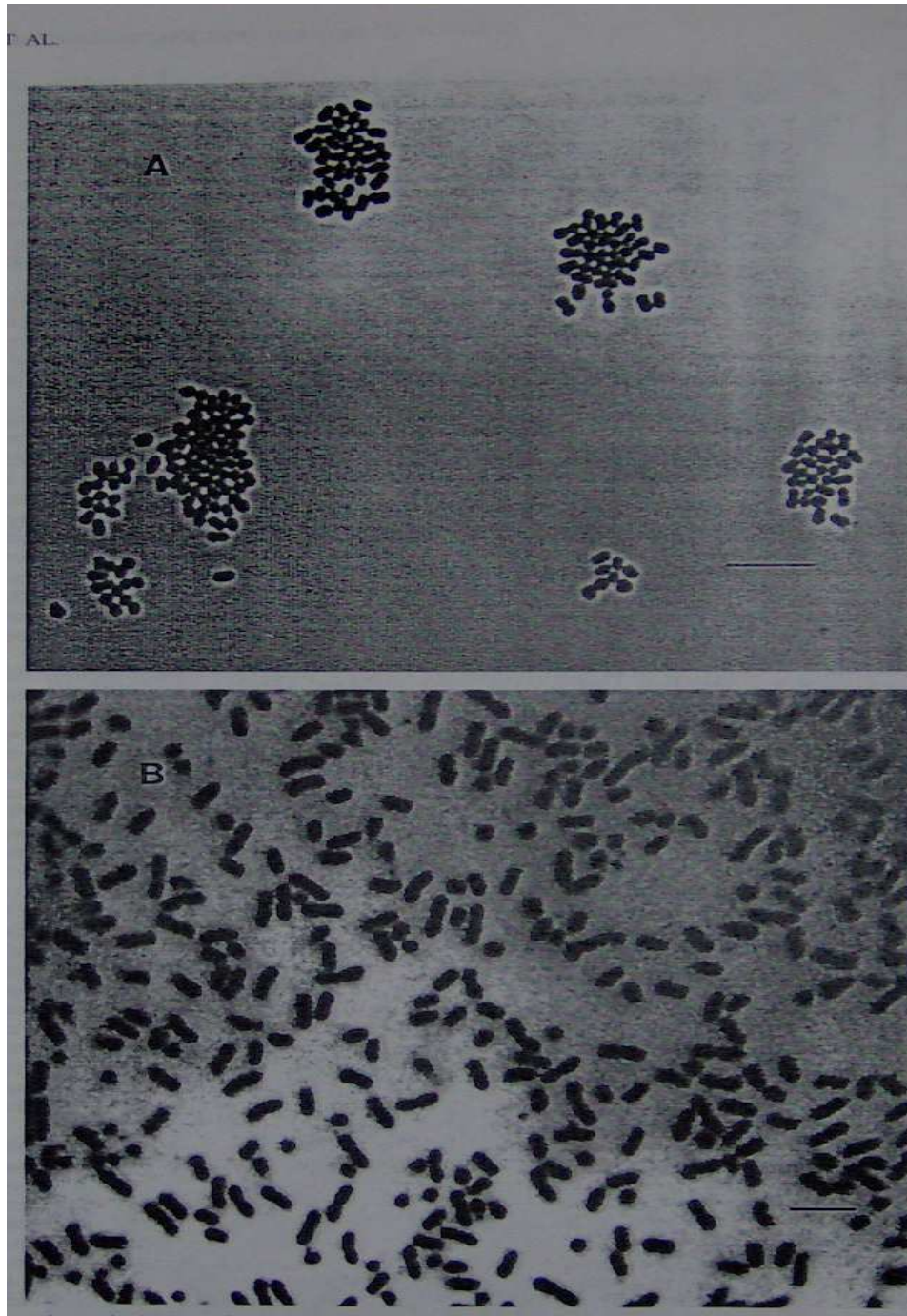
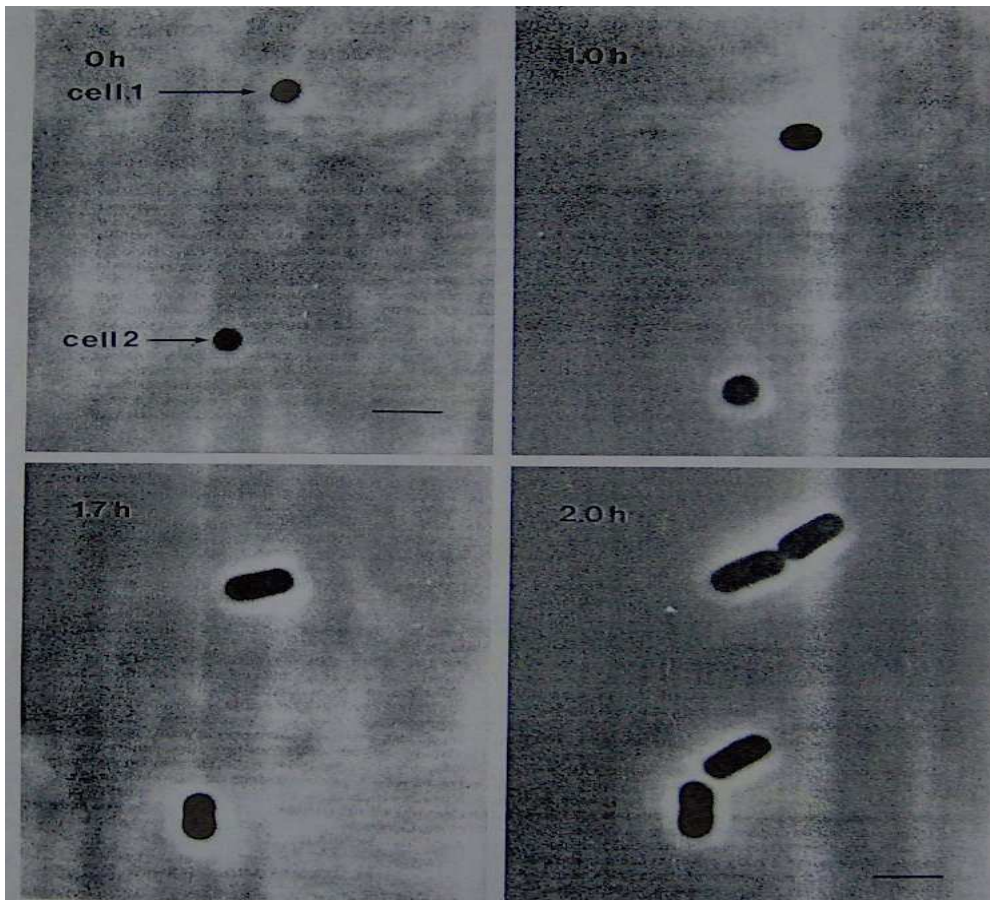


Imagen A: BP agrupada en formas cocoides en medio mínimo (inanición)

Imagen B: BP dispersa con formas bacilares en medio complejo

NSF Engineering Research Center.University- Bozeman



Imágenes de la transformación celular en el tiempo, como consecuencia del enriquecimiento del medio. Wilson. Center of biofilm engineering.

Las células tienen una morfología cocoide y este paso del ciclo es interpretado por algunos autores como una forma de mantenimiento y resistencia, pero desde ningún punto de vista como una forma de inactividad metabólica.

Estas mismas modificaciones morfológicas observadas en la cepa de *Acinetobacter* sp. GJ12 fueron también verificadas en distintas cepas de *Arthrobacter* sp.

Un aspecto interesante de observar en el comportamiento metabólico de una BP es la determinación de su capacidad y su actividad metabólica.

En experiencias realizadas en laboratorio, se colocaron microelectrodos en la biomasa de varias BP a fin de determinar la capacidad de consumo de oxígeno, tomando este parámetro como índice de actividad metabólica

Obtenidos los datos se confeccionaron las isobaras de la presión parcial de oxígeno a distintas profundidades de la BP. Se observó claramente que, a mayor cercanía del fondo de la biomasa, menor es la concentración de oxígeno encontrado, lo que sugiere una mayor concentración celular y una actividad metabólica superior.

Consecuencias de la formación de la biopelícula

Los problemas que ocasiona la BP no se circunscriben a la resultante biológica. En algunas industrias existe un gran número de situaciones desencadenadas por este fenómeno. En la alimentaria, por ejemplo, favorece la corrosión en materiales de trabajo, incluso en superficies tan comunes como el acero inoxidable, AISI 304 o 319 L, donde más se ha estudiado. También los sistemas de circulación de agua en una fábrica, en una vivienda, en una ciudad, se ven afectados.

Los polímeros extracelulares producidos por las bacterias son de naturaleza ácida y su combinación con iones del metal dispara la corrosión. Los complejos Ca-alginato son los responsables de esta labor

En el caso de los aceros inoxidables, se ha podido comprobar que los iones O_2 transportados desde el líquido intersticial de la BP comienzan a desarrollar efectos corrosivos sobre la superficie.

En determinaciones analíticas se logró establecer que, incluso debido a este proceso originado en el metabolismo de la BP, existen disminución de la concentración de iones Fe (hasta un 8 %) y fluctuaciones de los niveles de Ni (en el orden del 0,2 %) e incrementos del nivel relativo de Cr en la superficie. Todos estos elementos son constituyentes de la aleación que conforma un acero inoxidable. Estos valores alterados demuestran que una superficie inerte, como el acero inoxidable, también es atacada por los efectos metabólicos de la BP.

Otro aspecto importante de una BP es que se comporta, en algunas situaciones, como un organismo vivo pluricelular. Da muestras metabólicas y fisiológicas de comportarse como un todo, como un organismo compuesto por diferentes grupos celulares especializados en funciones determinadas, distintas de otros grupos celulares que están dentro de la misma BP, pero que tienen otra actividad metabólica distinta y cada grupo celular está aplicado a la supervivencia del conjunto.

Trabajos recientes han demostrado que existe una verdadera comunicación entre las células que la componen. Hay sustancias, sintetizadas por algunas especies celulares, que ejercen su acción sobre otros componentes celulares de la BP, que realizan una verdadera acción de tipo hormonal a distancia en otro órgano blanco.

Este fenómeno clave en la formación de BP se denomina *quorum sensing* o de autoinducción y explica el comportamiento de una bacteria aislada que, cuando se adhiere a una superficie, emite sustancias químicas para informar de su presencia a otras. Esta comunicación a distancia propicia la agregación que dará forma a la BP.

Esto ha sido bien estudiado en ciertas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Myxococcus* sp. Aquí se comprobaron dos sistemas de comunicación intercelular, regidos por distintos grupos de genes.

Lo que se detalla a continuación es solo un ejemplo, dado que se han encontrado muchas interacciones distintas entre diversas especies.

Los sistemas encontrados en las especies mencionadas anteriormente son dos: uno integrado por dos genes, *lasR-lasI*, y otro conformado por los genes denominados *rkIR-rhII*. El gen *lasI* es

el encargado de la síntesis de sustancias de difusión extracelular (N-3 oxododecanoil-L-homoserina lactona). El *lasR* requiere de suficientes niveles de esta lactona para su actividad y es el encargado de activar un número de genes virulentos, incluyendo el *lasI*, y el complejo *rhlR-rhlI*.

Se ha comprobado, además, que estas sustancias son capaces de influir sobre el sistema inmunológico de los huéspedes afectados y disminuir su capacidad de respuesta ante las infecciones.

Tratamiento de la biopelícula

La importancia de la BP en la industria de los alimentos como potencial fuente de su contaminación con patógenos obliga a plantearse nuevos procedimientos de limpieza y desinfección, que la consideren en toda su dimensión como un problema para la inocuidad.

Algunos de los desinfectantes tradicionales, como el cloro, tienen una baja tasa de penetración del entramado defensivo de polisacáridos de la estructura de la BP. Otros, como los amonios cuaternarios, tienen la capacidad de desagregar la BP. El ácido peracético y el peróxido de hidrógeno logran acción efectiva para el desarmado de la estructura de la BP, pero presentan dificultades para su uso rutinario.

Sin dudas, la acción mecánica sobre las superficies, como el cepillado o el uso de abrasivos, son un complemento adecuado para favorecer la ruptura de la BP y permitir la acción de los desinfectantes.

Por último, una buena práctica de combate de las BP consiste en utilizar alternadamente desinfectantes de pH opuestos, pasando de uno ácido un día a otro alcalino al siguiente, de manera tal de someter al complejo bacteriano arquitectónico a un estrés de adaptación sostenido que acabe con la amenaza de su persistencia.

Bibliografía

- Anderl, J. N.; Franklin, M. J. y P. S. Stewart (2000), Rol of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobiol. Agent chemoter.* 44, pp. 1818-1824.
- Assmus B.; Hausner D. y A. Hartman (1997), «Direct examination of subgingival plaque from disease periodontal site using laser scanning», *New Microbiology* 20, pp. 155-159.
- Beyenal, H. y W. Lewandoski (2002), «Internal and external mass transfer in biofilm grow at various flow velocities», *Biotechnolog. Prog.* 18, pp. 55-61.
- Camper A. K.; Jones, W. L. y J. T. Hayes (1996), Effect of growth conditions and substratum compositum on the persistence of coliforms in mixed-population biofilm. *Applied and environmental microbiology*, pp. 4014-4018.
- Costerton, J. W. (1995), «Overview of microbial biofilms», *Journal of Bacteriology*, pp. 907-915.
- Costerton, J. W. (1995), «Phenotypic transformation and cell-cell communication in biofilms. Microbiological Biofilm», *Ann Rev. Microbiol* 49, pp. 711-745.

- Costerton, J. W., Fux C., Stoodley P. (2003), Bacterial biofilm, a diagnostic and therapeutic challenge, *Expert Rev. Anti-infect* 1 (4), pp. 667-683.
- Davies, D. G. *et al.* (1998), «The involvement of cell to cell signals in the develop of bacterial biofilms», *Science* Vol. 280.
- De Beer D. y P. Stoodley (1995), «Relation between the structure of an aerobic biofilm and mass transport», *Water Sci Technol* 32, pp. 11-18.
- Dunny, G. M. y G. A. Leonad (1997), «Cell-cell communication in gram positive bacteria», *Ann. Rev. Microbiology* 51, pp. 527-564.
- Forte, L. y E. Rebagliati (2000), «Control Bacteriológico en plantas de alimento. Fenómeno de Biopelícula», *Eurocarne* N.º88, Madrid.
- Geesey, G. G. y R. C. Cooksey (1996), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, pp. 2012-2014.
- Geiser, M; Avci, R. y Z. Lewandoski (2001), «Pit initiation on 316L stainless steel in the presence of *Leptotrix discophora*», *Corrosion papers* 1257.
- Le Blanc D. J.; Lantz, M. S. y L. M. Switalski, Proceeding of the 2.nd Annual Indiana Conference. Indiana University School.
- Lewandowski, Z.; de Beer D. y F. Roe (1994), «Heterogeneity in Biofilm structures», *Biotech Bioeng* 43, pp. 1131-1138.
- Sutherland, I. (2001), «Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework», *Microbiology* 147, pp. 3-9.
- Pasmore, M. y J. Costerton (2003), «Biofilms, bacterial signaling and their ties to marine biology», *Society of Industrial Microbiology* 30, pp. 407-413.
- Wimpenny J., Colasanti R. (1997), «A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models», *FEMS Microbiology Reviews* (22), pp. 1-16.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. (2000), Quantifying biofilm structure using image analysis, *J Micribiol, Methods*, 39, pp. 109-119.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. (2000), Evaluation of biofilm image theresholding methods, *Water Res.* 35, pp. 1149-1.