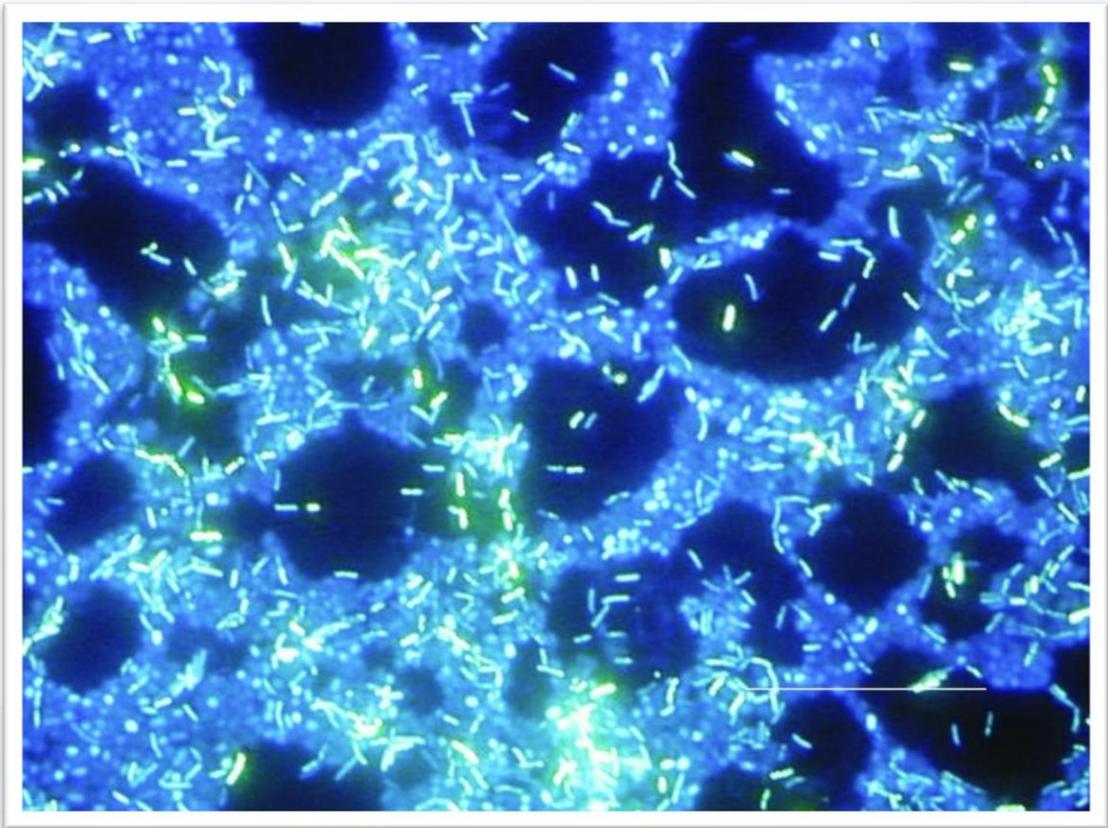




FORMACIÓN DE BIOFILMS POR BACTERIAS



TRABAJO DE FIN DE GRADO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

GRADO DE BIOLOGÍA

CRISTINA ANDREA ARAÚJO CUEVAS

ÍNDICE

➤ RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ETAPAS DE FORMACIÓN DEL BIOFILM.....	3
3. MATRIZ EXTRACELULAR DEL BIOFILM.....	5
3.1. Sustancias poliméricas extracelulares	6
3.1.1. Exopolisacáridos	6
3.1.1.1. Pel	7
3.1.1.2. Psl	7
3.1.1.3. Alginato	7
3.1.2. Proteínas.....	8
3.1.2.1. Proteínas estructurales	8
3.1.2.2. Proteínas enzimáticas.....	8
3.1.3. ADN.....	9
3.1.4. Lípidos	9
3.2. Apéndices	10
3.3. Agua	10
4. MECANISMOS DE UNIÓN A SUPERFICIES.....	11
5. MECANISMOS DE DISPERSIÓN DEL BIOFILM.....	12
6. REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM.....	14
6.1. Regulación independiente de los sistemas de detección de quórum.....	15
6.2. Regulación dependiente de los sistemas de detección de quórum.....	17
7. ENFERMEDADES HUMANAS RELACIONADAS CON BIOFILMS	19
7.1. Enfermedades relacionadas con dispositivos médicos	19
7.2. Enfermedades no relacionadas con dispositivos médicos.....	20
8. ESTRATEGIAS ANTI-BIOFILMS	21
9. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	24
10. BIBLIOGRAFÍA	24

Ilustración de la portada: Biofilm multiespecie cultivada en una superficie de acero inoxidable en un reactor de biofilm de agua potable durante 14 días (Donlan, 2002).

RESUMEN

Los biofilms son comunidades de microorganismos protegidos por una matriz extracelular que viven adheridos a una superficie. En las últimas décadas, el estudio de la formación de los biofilms ha acaparado mucha atención debido a su importancia médica, ambiental e industrial. Para progresar en la investigación microbiológica y mejorar la comprensión de esta forma de vida, esta revisión bibliográfica se centra en el estudio de las etapas de formación de los biofilms, de los componentes y su función dentro del biofilm. Se discuten además, los mecanismos de formación y dispersión de los biofilms y su regulación. Con respecto a la relación de los biofilms con las superficies bióticas, se explica su papel en las infecciones microbianas. Para finalizar, se comentan algunas estrategias para combatirlos.

1. INTRODUCCIÓN

Desde los principios de la microbiología, se consideraba las bacterias como microorganismos planctónicos de vida libre y a partir de esta creencia se han definido morfológica y fisiológicamente. Sin embargo, la realidad es muy distinta ya que los microorganismos, en la gran mayoría de los medios naturales donde crecen, viven asociados a superficies como una comunidad multicelular (Singh et al., 2006). En las últimas décadas, es un hecho que el estudio de la formación de los biofilms es uno de los temas más predominantes en la comunidad microbiológica (Lasa, 2005). Y es que las implicaciones de los biofilms en el día a día hace que tengamos la necesidad de saber más de ellos. Antes de adentrarnos en el tema, es imprescindible preguntarnos ¿qué son los biofilms? Tal y como el nombre indica “bio” significa materia viva y “film” traducido al español se refiere a película, definiéndose como capa fina de naturaleza viva (Karatan & Watnick, 2009). En otras palabras, los biofilms son ecosistemas microbianos (mono especie o multiespecie) protegidos por una matriz extracelular autoproducida compleja, adheridos de forma estable a las superficies bióticas o abióticas (O’Toole et al., 2000; Burmølle et al., 2014; Jamal et al., 2018). Al formarse los biofilms permiten a las bacterias crecer en un entorno protegido, y así, poder sobrevivir ante ambientes hostiles para después dispersarse hacia nichos más favorables (Wei & Ma, 2013). Su funcionalidad depende de las interacciones existentes entre los agregados celulares (Li & Tian, 2012).

Esta forma de vida bacteriana abunda en la naturaleza afectando directamente a nuestra sociedad en los ámbitos ambientales, industriales y biomédicos. Se ha observado que se

producen grandes diferencias fisiológicas y del comportamiento cuando las bacterias que están en estado planctónico pasan a formar biofilms, o viceversa. Entre estas diferencias, lo más relevante para los científicos en el ámbito médico ha sido la elevada resistencia a antimicrobianos, tanto químicos como biológicos, que presentan las bacterias productoras de biofilms (Heindl et al., 2014). Actualmente, se sabe que más del 80% de las infecciones microbianas y crónicas provocadas por patógenos son causadas por bacterias formadoras de biofilms, según estudios de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de Pakistán (Jamal et al., 2018). Además, se ha revelado que más del 65% de las infecciones nosocomiales mortales son también provocadas por bacterias formadoras de biofilms (Li & Tian, 2012). Hoy en día, el grupo de bacterias de mayor interés médico para su estudio son las llamadas ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp) debido a su alta patogenicidad (Rabin et al., 2015). Esto ha incitado a los científicos a explorar posibles estrategias anti-biofilms para hacerlos más susceptibles a los tratamientos antibióticos y así poder batallar contra estas infecciones (Jakobsen et al., 2017). Para progresar en la investigación microbiológica, es necesario estudiar detenidamente las etapas, composición, mecanismos y regulación de la formación de los biofilms que serán expuestos en los siguientes apartados.

2. ETAPAS DE FORMACIÓN DEL BIOFILM

El desarrollo óptimo de los biofilms depende de una serie de factores, como los recursos y nutrientes presentes, las condiciones ambientales, las propiedades y metabolismo de las bacterias, la comunicación celular y la regulación genética (Sadekuzzaman et al., 2015). De este modo, se puede afirmar que los biofilms formados en diferentes ambientes diferirán morfológicamente entre sí (Singh et al., 2006). Las etapas de formación de los biofilms son el contacto con la superficie (unión reversible, unión irreversible), formación de microcolonia, maduración del biofilm y dispersión final (Heindl et al., 2014) (véase Figura 1).

- **Contacto inicial:**

Para que unas bacterias pasen de una vida planctónica a formar biofilms, es necesario la presencia de una superficie a la que adherirse. Este es el paso crucial para iniciar la primera etapa, la fijación a la superficie (Rabin et al., 2015). A partir de este contacto es cuando ocurre la síntesis inicial de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Jamal et al., 2018).

La adherencia puede diferir según bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las Gram-negativas suelen utilizar apéndices como los flagelos y fimbrias a modo de mecanismo de contacto. Sin embargo, las bacterias Gram-positivas inmóviles usan proteínas de superficie como punto de unión (Lasa, 2005). Además, también influyen las fuerzas físicas, como las fuerzas de Van der Waals o las interacciones electrostáticas. Un factor que favorece este contacto es el nivel de hidrofobicidad de la superficie, ya que a más hidrófoba y no polar, menos repulsión bacteriana con la superficie (Jamal et al., 2018). La velocidad de adhesión se verá más o menos favorecida dependiendo de las propiedades del sustrato y de la superficie celular (Donlan, 2001). En definitiva, las bacterias planctónicas inician la unión con la superficie mediante contactos fisicoquímicos o proteínas de la matriz creando una monocapa celular (Singh et al., 2006). Al iniciar el contacto esta unión es reversible, es decir, las bacterias pueden desasociarse y continuar con una vida planctónica cuando las condiciones para formar biofilm no sean las óptimas (Kostakioti et al., 2013) (Figura 1.a).



Figura 1: Ciclo de vida de los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. a) Interacción inicial reversible con la superficie, b) Adhesión irreversible a la superficie, c) División celular y producción de la matriz generando las microcolonias, d) Maduración del biofilm e) Dispersión celular para volver a empezar el ciclo. (Modificado de Wei & Ma, 2013).

- **Maduración:**

Una vez llegada a esta etapa surge una unión irreversible a la superficie, donde dará paso a la división celular, convirtiéndose la monocapa de células (Figura 1.b) en una microcolonia (Figura 1.c). La matriz extracelular comienza a producirse creando una comunidad más heterogénea. Al formarse el biofilm maduro, internamente existen comunicaciones genéticas que modifican la tasa de crecimiento y las expresiones génicas de las bacterias que forman los

biofilms. A diferencia de la vida planctónica, las bacterias de los biofilms crecen más lentamente debido a la limitación de recursos (Donlan, 2001) (Figura 1.d). Además, en esta etapa aparecen propiedades como la menor susceptibilidad a antibióticos (O'Toole et al., 2000).

- **Dispersión:**

Tras condiciones adversas como la inanición, el escape de la matriz puede ser la opción más favorable. Aquí podemos diferenciar dos tipos de dispersión: la dispersión pasiva, que se produce por fuerzas fisicoquímicas, o la dispersión activa, que se origina al detectar señales de estrés ambiental por la comunidad bacteriana. Estas señales pueden ser debidas a la concentración de nutrientes, oxígeno y productos tóxicos del medio (Kostakioti et al., 2013). En esta etapa ocurren procesos como la muerte celular, la degradación de la matriz por enzimas y la recuperación de la movilidad que permite esta dispersión (Karatan & Watnick, 2009) (Figura 1.e).

3. MATRIZ EXTRACELULAR DEL BIOFILM

Uno de los pasos esenciales para formalizar el biofilm es la autoproducción de la matriz extracelular por la comunidad bacteriana. Esto ocupa aproximadamente un 90% de la biomasa, siendo el 10% restante, el espacio habitado por las bacterias (Flemming & Wingender, 2010). La matriz está formada principalmente por agua, exopolisacáridos, proteínas y ADN (Lasa, 2005).

A través de la matriz se absorben moléculas y nutrientes de la fase acuosa o del sustrato, que son capturados por unas enzimas digestivas extracelulares excretadas por la comunidad bacteriana. Se podría decir que la matriz es un sistema digestivo externo con función social, ya que los recursos se difunden dentro del biofilm (Flemming et al., 2016).

Las matrices aportan propiedades a los biofilms, como la resistencia a la desecación, sirviendo como barrera contra la evaporación. Otra particularidad interesante es que los biofilms pueden sufrir una regeneración dinámica y continua ante cualquier condición ambiental adversa que se le presente (Flemming et al., 2016). Además, se ha demostrado que presentan características viscoelásticas, es decir, cuando alguna fuerza ejerce contra la matriz de SPE, el biofilm procesa una respuesta elástica hasta que supera un punto crítico, generando una deformación irreversible y comportándose como un fluido viscoso (Körstgens et al., 2001).

3.1. Sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares son un conjunto de biomoléculas localizadas extracelularmente (como los exopolisacáridos, proteínas, ADN y lípidos) que componen el esqueleto de los biofilms, a partir del cual, se formará su estructura tridimensional. Estas sustancias son las encargadas de la fijación a las superficies y de la cohesión de los biofilms (Flemming & Wingender, 2010). En la matriz, son los componentes que más abundan ocupando entre un 50 y el 90% de la materia orgánica (Donlan, 2002). Este porcentaje y su constitución varía según la especie bacteriana, la antigüedad de los biofilms y el medio ambiente (Mayer et al., 1999).

La organización arquitectónica de los biofilms depende de las interacciones entre los distintos componentes de las SPE, proporcionándole así, las propiedades mecánicas y fisiológicas de los biofilms (Flemming et al., 2016). En otras palabras, la estabilidad mecánica de la matriz se debe al entramado de SPE y a las fuerzas fisicoquímicas entre las moléculas. En concreto, las fuerzas que permiten esta estabilidad son las fuerzas electrostáticas, interacciones de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno (Flemming & Wingender, 2010). Se ha demostrado que cuando se ejerce una tensión contra los biofilms, estos emiten una respuesta estructural sintetizando más SPE para mantener su estabilidad (Shaw et al., 2004).

Las SPE influyen en la pegajosidad de la matriz ya que son capaces de capturar diferentes moléculas como cationes, aniones, elementos apolares y partículas del agua (Flemming & Wingender, 2010). Además de estas moléculas, los biofilms también pueden adoptar algunos componentes del hospedador, como el ADN, para favorecer la estabilidad estructural (Jakobsen et al., 2017). En algunos casos, además de interferir en la etapa de adhesión y agregación, reclutan agua e incluso sirven como fuente de alimentación (Flemming & Wingender, 2010).

3.1.1. Exopolisacáridos

Los exopolisacáridos son unas cadenas de carbohidratos lineales o ramificadas sintetizados por las bacterias, que están localizadas en la superficie celular formando un entramado complejo (Flemming & Wingender, 2010). Tal y como su nombre indica, son sintetizados extracelularmente o intracelularmente para posteriormente secretarlos al exterior (Rabin et al., 2015). Las SPE están compuestas entre un 1-2% de polisacáridos (Jamal et al., 2018). Es importante aclarar que no todas las bacterias que viven dentro de los biofilms producen exopolisacáridos (Flemming & Wingender, 2010).

En esta revisión bibliográfica nos centraremos en el ejemplo de *P. aeruginosa* para explicar los exopolisacáridos, ya que es uno de los modelos mejor estudiados hasta la fecha. Esta bacteria Gram-negativa presenta los exopolisacáridos Pel, Psl y alginato, cuya labor es aumentar la tolerancia a los antibióticos y la conservación de la arquitectura de la matriz (Ryder et al., 2007). Se ha descubierto que la producción de estos polisacáridos están coordinados por la enzima AlgC, que actúa como punto de control (Ma et al., 2012).

3.1.1.1. Pel

El polisacárido Pel producido por *P. aeruginosa* ayuda a la formación del biofilm, interviniendo en la adhesión, en la interacción intercelular y en el soporte de la estructura primaria, y por otro lado, se ha descubierto que también contribuye a la resistencia a los antibióticos aminoglucósidos (Flemming & Wingender, 2010; Colvin et al., 2011). Algunas investigaciones demuestran que en las cepas de *P. aeruginosa* que no presentan los pili tipo IV, el polisacárido Pel actúa como sustituyente, facilitando la adhesión (Vasseur et al., 2005).

3.1.1.2. Psl

El polisacárido Psl está localizado en la superficie celular favoreciendo las interacciones intercelulares, la etapa de contacto inicial con las superficies abióticas y bióticas, el mantenimiento de la organización arquitectónica del biofilm y la dispersión, dejando unos rastros de Psl durante el desplazamiento (Ma et al., 2006; Ma et al., 2009; Zhao et al., 2013). Además, se ha demostrado que también influye en la protección contra el sistema inmune del hospedador y los antibióticos (Wei & Ma, 2013). En las diferentes etapas de formación de los biofilms, el Psl se va acumulando en diferentes áreas. En las etapas iniciales, se sitúa en las superficies celulares para realizar las comunicaciones célula-célula. Posteriormente durante la maduración, se deposita en la periferia de las microcolonias, conformando un espacio sin Psl en el centro para facilitar la dispersión (Ma et al., 2009) (véase Figura 1.e).

3.1.1.3. Alginato

Este exopolisacárido es imprescindible para la nutrición de los biofilms, ya que interviene en la captación del agua y los nutrientes. Asimismo, el alginato presenta las mismas propiedades que Psl, en cuanto a la estabilidad estructural y la tolerancia al sistema inmunológico y a antibióticos (Leid et al., 2005; Wei & Ma, 2013). Además en algunos casos puede actuar como factor de virulencia (Pedersen et al., 1992). En investigaciones con cepas revertidas que no

producen alginato, se ha descubierto que las bacterias acaban formando el biofilm gracias a Psl y Pel pero los biofilms son más lisos y planos con respecto a la cepa silvestre, que son más heterogéneos (Flemming & Wingender, 2010).

3.1.2. Proteínas

Las proteínas representan más del 2% de las SPE (Jamal et al., 2018). Se pueden dividir en dos tipos: proteínas estructurales y proteínas enzimáticas.

3.1.2.1. Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales son las proteínas no enzimáticas, es decir, las proteínas asociadas a las SPE o a la superficie celular. Estas proteínas median la interacción entre la membrana celular con las SPE, la formación de los biofilms y su mantenimiento. Por ejemplo, la familia de proteínas *Bap* y las lecitinas están presentes en varias especies mostrando composiciones y funciones análogas, participando en la formación de los biofilms (Flemming & Wingender, 2010).

Por otro lado, existen los amiloides, que median la fijación abiótica o biótica con las células hospedadoras. En este último caso, los amiloides intervienen invadiéndolas o actuando como toxinas contra las células vegetales y bacterias (Flemming & Wingender, 2010).

Otros componentes proteicos son los autotransportadores, que son proteínas que pueden secretarse a la superficie extracelular sin utilizar ningún método de transporte. Estas proteínas intervienen en la comunicación intercelular y la conglomeración celular (Karatan & Watnick, 2009). Sin embargo, la presencia de apéndices proteicos de adhesión como las fimbrias desfavorece esta interacción proteínica, siendo antagonistas (Hasman et al., 1999).

3.1.2.2. Proteínas enzimáticas

Las proteínas enzimáticas están implicadas en el sistema digestivo externo, en la virulencia al infectar al hospedador y en la degradación de la matriz de SPE para realizar la dispersión. Los sustratos de estas proteínas son los elementos atrapados en los biofilms, como polímeros hidrófilos o hidrófobos y partículas orgánicas. La presencia de estas enzimas supone un reservorio de actividad enzimática próximo a las bacterias, favoreciendo así, la difusión directa de los productos degradados. (Flemming & Wingender, 2010). La interacción de algunos componentes de la matriz con algunas enzimas potencia la termoestabilidad de estas enzimas,

así como, su resistencia a la proteólisis (Skillman et al., 1999). Una de las estrategias que emplean los biofilms ante un periodo de inanición es la catálisis de las SPE, proporcionándole así, recursos energéticos (Zhang & Bishop, 2003).

3.1.3. ADN

El ADN representa menos de un 1% dentro de las SPE (Jamal et al., 2018). Se sabe que el ADN extracelular (ADNe) no solo surge de las células lisadas sino que también es sintetizado activamente por los biofilms, integrándolo en la matriz extracelular (Hamilton et al., 2005; Flemming & Wingender, 2010). El ADNe presenta más o menos semejanzas al ADN genómico dependiendo de la especie. Estas diferencias evidencian que el ADNe no tiene por qué proceder de las células lisadas (Böckelmann et al., 2006).

Una de las propiedades del ADNe es facilitar la formación del biofilm, interviniendo concretamente, en la etapa inicial de adhesión al contactar con los receptores de las superficies cuando están próximos a estas (Das et al., 2010). Además, se ha comprobado que el ADNe también interfiere en la unión célula-célula (Singh et al., 2006). Por otro lado, el ADNe proporciona actividad antibacteriana a los biofilms. Esto se produce al aumentar la concentración de ADN, que debido a su carga negativa, queela los cationes que contienen los lipopolisacáridos y la membrana bacteriana externa provocando la lisis celular, que libera entre otros componentes, ADN (Mulcahy et al., 2008). Se ha demostrado que los biofilms durante una infección también pueden capturar ADNe de las células lisadas del sistema inmune del hospedador (Walker et al., 2005).

Curiosamente en el caso de *P. aeruginosa*, el ADNe interviene en otros procesos, como la aportación de nutrientes cuando el biofilm está en estado de inanición, o facilitar la dispersión de las bacterias de los biofilms al mantener unas alineaciones celulares a lo largo de una red de senderos que establecen (Finkel & Kolter, 2001; Gloag et al., 2013).

3.1.4. Lípidos

Todas las SPE mencionadas anteriormente son hidrofílicas pero también existen SPE con propiedades hidrofóbicas, como los lípidos. Esto favorece la posibilidad de la fijación con superficies cerosas, como por ejemplo la cepa *Rhodococcus* sp. 33 que al no presentar apéndices realiza la unión a través de los lípidos hidrofóbicos (Neu et al., 1992).

Por otro lado, en el caso *P. aeruginosa* presentan unos surfactantes llamados ramnolípidos,

que intervienen en la lisis celular del sistema inmunológico del hospedador, en el transporte y dispersión, en la arquitectónica de los biofilms y, además, proporcionan tolerancia antibacteriana (Jakobsen et al., 2017). Se ha sugerido que los ramnolípidos sintetizados por las células que forman la base del biofilm, facilitan que otras bacterias trepen hacia las partes superiores del biofilm (Lequette & Greenberg, 2005).

3.2. Apéndices

Los apéndices proteicos como las fimbrias, flagelos y pili, además de la comunicación intercelular y la motilidad bacteriana, presentan funciones mecanosensoriales en la fijación a las superficies (Wei & Ma, 2013). Estos al igual que las proteínas, también interactúan con las SPE (Flemming & Wingender, 2010).

Los apéndices como los pili tipo IV de *P. aeruginosa* median en la formación del biofilm, concretamente, en la etapa de adhesión a las superficies y proporcionan sostenibilidad estructural (Wei & Ma, 2013). Las condiciones ambientales y los desplazamientos realizados mediante estos pili son importantes para desempeñar la formación de los biofilms (Branda et al., 2005). Por otro lado, *Escherichia coli* interactúa con un pelo conjugativo, que también media la adhesión y la formación de los biofilms pero de manera no específica, es decir, no necesita receptores específicos con las células hospedadoras o la superficie (Ghigo, 2001).

3.3. Agua

El agua es el elemento más abundante de la matriz, ocupando hasta un 97%. Aquí es donde permanecen las demás estructuras descritas anteriormente (Flemming et al., 2016). Para que exista comunicación intercelular se crean poros y canales para trasladar los nutrientes, aire y agua. (Zhang et al., 1998). Este sistema de canales permite una distribución favorable de los nutrientes por todo el biofilm cuando hay alta competencia, es decir, cuando la densidad celular es alta (Singh et al., 2006). Al crear un hábitat muy hidratado permite que la deshidratación sea más lenta que el exterior. La captación del agua no solo se produce a través de los canales o poros sino que hay SPE que retienen agua, provocando desacoplamiento hidráulico a las actividades internas de la comunidad. Se ha descubierto que ante condiciones de deshidratación, como estrategia de resistencia, los biofilms aumentan la producción de SPE y se agrupan para disminuir su volumen (Flemming & Wingender, 2010).

4. MECANISMOS DE UNIÓN A SUPERFICIES

Existe una gran variedad de bacterias que tienen la capacidad de localizar las superficies y adaptarse fisiológicamente. Parece ser que estas superficies inducen un estímulo físico a las bacterias que al entrar en contacto responden con señales que estimulan la formación de los biofilms (Wozniak & Parsek, 2014).

Las interacciones iniciales entre las bacterias y las superficies son clave ya que, dependiendo de la naturaleza de las superficies, las bacterias responderán con un mecanismo u otro para formar los biofilms. Cuando el contacto es con **superficies abióticas**, el grado de hidrofobicidad y la composición orgánica y de SPE del biofilm interviene en la fijación. Sin embargo, si la adhesión es a **superficies bióticas**, está mediada por las interacciones entre las adhesinas bacterianas con los receptores específicos del hospedador e influenciado por la respuesta inmune que emita el hospedador (Rendueles & Ghigo, 2012). Además de esta especificidad con la naturaleza de las superficies, también depende de las condiciones del medio (O'Toole et al., 2000).

Las estructuras que intervienen en el contacto inicial con las superficies pueden ser estructuras predesarrolladas o estructuras sintetizadas. Como **estructuras ya formadas** podemos identificar a los apéndices proteicos. En cuanto a las **estructuras sintetizadas**, distinguimos entre estructuras que estabilizan la unión irreversible o adhesinas específicas según la superficie (Karatan & Watnick, 2009). Por ejemplo, *P. aeruginosa* sintetiza una adhesina llamada SadB, que coordina la unión irreversible además de intervenir en la formación de los biofilms y en la motilidad flagelar (Caiazza & O'Toole, 2004). Por otro lado, la invasina es una proteína específica que es producida por *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*, y se fija concretamente a las integrinas β_1 de las células hospedadoras de estos patógenos (Karatan & Watnick, 2009).

Tal y como se ha comentado anteriormente, los **apéndices proteicos** son mecanosensores que inducen la formación de los biofilms al establecer el contacto con una superficie. Esto es debido a la interrupción de la movilidad flagelar y su síntesis, combinado con la expresión de polímeros y otros componentes que facilitan la adhesión y la producción de los biofilms (Belas, 2014). En definitiva, la motilidad y la formación de la matriz de los biofilms son antagónicos (Karatan & Watnick, 2009). Como ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* detecta la superficie mediante flagelos y pili. Al realizar el contacto se perturba la rotación flagelar, provocando una

síntesis rápida de una adhesina, que es un polisacárido unipolar (PUP), y de fibras de celulosa, que intervienen en la unión irreversible (Li et al., 2012; Xu et al., 2013). Esta síntesis de PUP y celulosa se debe al aumento de la concentración de un segundo mensajero, llamado diguanilato monofosfato cíclico (c-di-GMP), que está regulado por la enzima diguanilato ciclasa (DGC) (Xu et al., 2013) (véase la parte inferior de la figura 3).

La molécula **c-di-GMP** mencionada anteriormente, es un regulador activador involucrado en la formación de biofilms, motilidad, síntesis de exopolisacáridos de la matriz y la virulencia (Branda et al., 2005; Rabin et al., 2015). Cuando las concentraciones de esta molécula son altas, induce la adhesión y la generación de la matriz extracelular. Sin embargo, cuando los niveles son bajos, potencia la dispersión de las células (Jakobsen et al., 2017). El mecanismo regulador de la concentración de c-di-GMP depende de dos enzimas: diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE). DGC induce la síntesis de c-di-GMP a partir de 2 moléculas de guanósín trifosfato (GTP), sin embargo, PDE degrada el c-di-GMP generando un dinucleótido lineal llamado 5'-fosfoguanilil-guanosina (pGpG) (Christen et al., 2005) (Figura 2). La regulación es producida mediante proteínas efectoras que contactan con este segundo mensajero. Esto causa diferentes efectos dependiendo de la ubicación de la proteína en la superficie celular, la interacción proteína-proteína, transcripción y la adhesión al ADN (Rabin et al., 2015). Por ejemplo, en *P. aeruginosa* se ha comprobado que el c-di-GMP influye en la regulación de la producción de los polisacáridos Psl, Pel y alginato (Jakobsen et al., 2017).



5. MECANISMOS DE DISPERSIÓN DEL BIOFILM

Como ya se ha mencionado anteriormente, la dispersión del biofilm puede ser pasiva o activa. Estas dispersiones se pueden realizar mediante erosión, desprendimiento o dispersión de la cavidad central. La **erosión** es una pérdida continua de bacterias individuales o en

pequeños grupos durante la formación del biofilm. El **desprendimiento**, sin embargo, es algo más puntual, y son grandes conjuntos de células que se dispersan de forma repentina. Esto suele ocurrir en las últimas etapas de formación de los biofilms. Por último, la **dispersión de la cavidad central** es una liberación activa de grandes cantidades de bacterias individuales o pequeñas masas de células de la cavidad central del biofilm, creando un hueco vacío en el interior de la colonia (véase Figura 1.e). Estas bacterias en estado planctónico son liberadas tras una fisura de la matriz del biofilm. Se considera que la erosión y el desprendimiento pueden realizarse tanto en la dispersión activa como la pasiva. Sin embargo, la dispersión de la cavidad central se produce solo cuando la dispersión es activa (Kaplan, 2010).

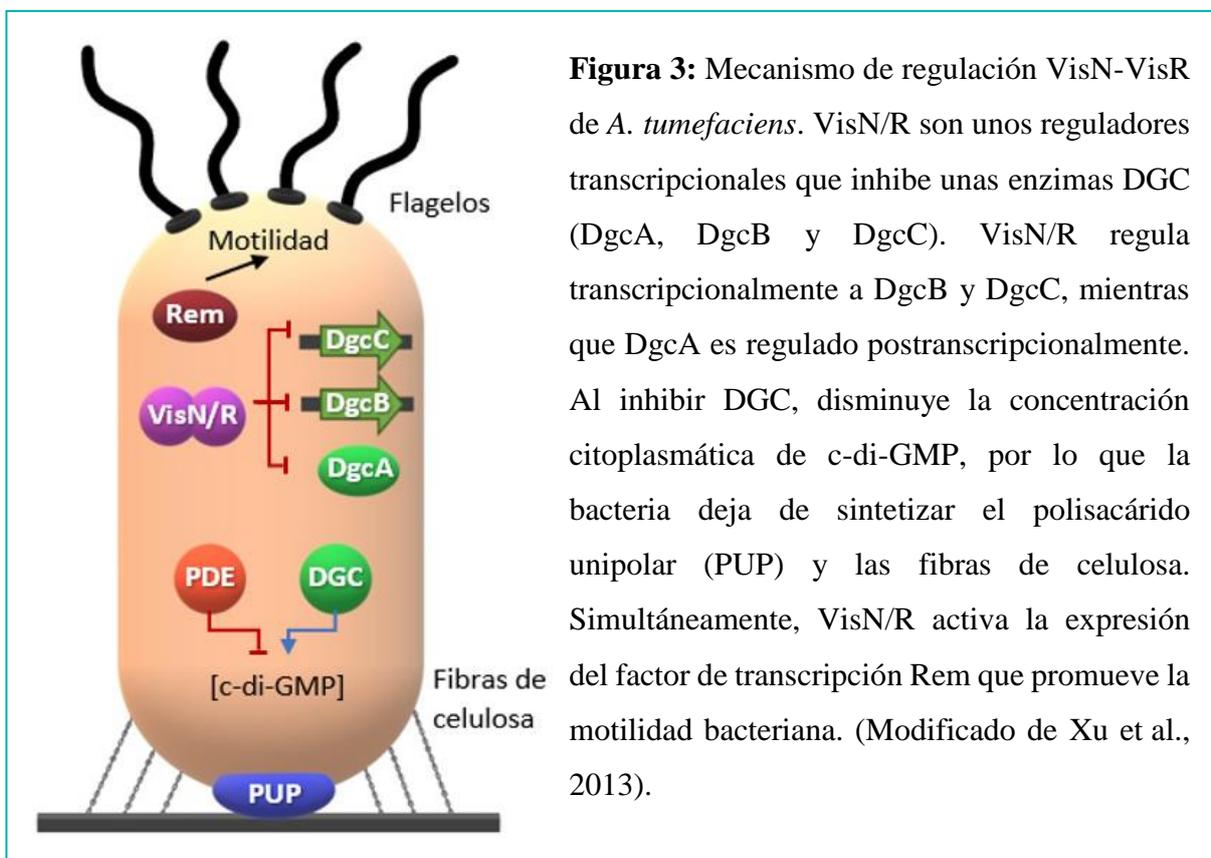
Comúnmente, las bacterias de los biofilms suelen responder ante condiciones adversas, como la inanición, con la síntesis de **enzimas degradativas** (O'Toole et al., 2000; Kaplan, 2010). Estas enzimas destruyen los componentes de la matriz que median la adhesión con las superficies o directamente, el sustrato donde se desarrollan, estimulando así, la dispersión celular (Kaplan, 2010). Por ejemplo, *P. aeruginosa* sintetiza alginato liasa, que degrada el alginato presente en la matriz extracelular, provocando finalmente, el desprendimiento de las bacterias del biofilm (Boyd & Chakrabarty, 1994).

La **división celular** se podría considerar como otro mecanismo de dispersión. Cuando las bacterias más superficiales inician la división celular, las células hijas se pueden posicionar a una distancia lo suficientemente lejos como para que no estén influidas por las fuerzas atractivas de la matriz, y por lo tanto, se liberan (Kaplan, 2010).

Varias investigaciones han demostrado que el **óxido nítrico (NO)** influye en la dispersión del biofilm de *P. aeruginosa*. Este compuesto es sintetizado por las bacterias anaeróbicas situadas en las capas menos superficiales de la colonia (Rendueles & Ghigo, 2012). El mecanismo regulador consiste en que al bajar las concentraciones de NO, afecta a la expresión de c-di-GMP provocando la dispersión (Barraud et al., 2009; Rendueles & Ghigo, 2012).

Por otro lado, se ha observado que los **D-aminoácidos** también inducen la dispersión bacteriana. Estos son generados una vez que el biofilm está desarrollado y las bacterias están ya en la fase estacionaria. En el caso de *Bacillus subtilis*, los D-aminoácidos reemplazan a sus isoformas L, que están localizadas en la pared celular. Esto causa la inhibición de la fibra amiloide de la matriz, TasA, que media la fijación célula-célula. Por lo tanto se interrumpe la formación del biofilm, promoviendo así la dispersión (Kolodkin-Gal et al., 2010).

En el caso de *A. tumefaciens*, regula la motilidad mediante unos reguladores transcripcionales denominados **VisN-VisR**, que inactiva la síntesis del PUP y de la celulosa. Esto lo produce al inhibir unas enzimas DGC, llamadas DgcA, DgcB y DgcC. DgcA es regulada postranscripcionalmente por VisN-VisR, mientras que DgcB y DgcC son reguladas transcripcionalmente por VisN-VisR. Al inhibir estas enzimas, disminuye la concentración de c-di-GMP intracelular, por lo que la bacteria deja de sintetizar PUP y celulosa. Simultáneamente, los reguladores VisN-VisR activan la expresión de un factor de transcripción llamado regulador del crecimiento exponencial de la motilidad (Rem), que desencadena la función flagelar y, por lo tanto, la motilidad bacteriana (Xu et al., 2013) (Figura 3).



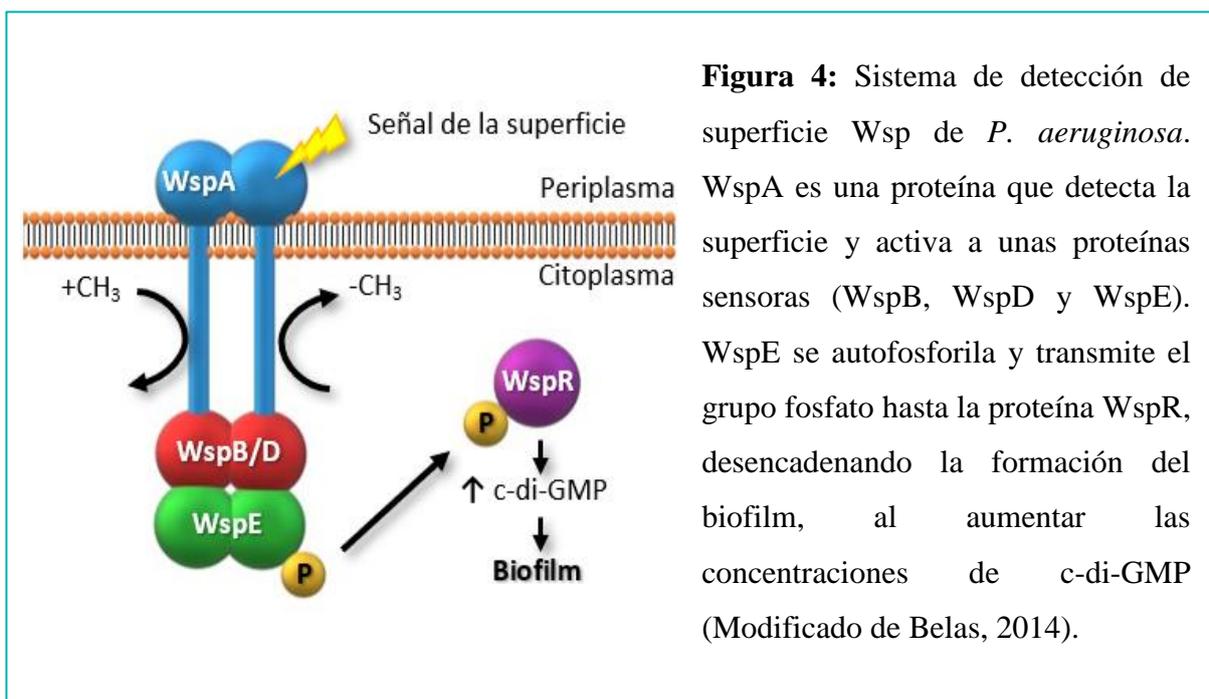
6. REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM

Generalmente, la formación de los biofilms está estimulada por señales nutricionales, mensajeros secundarios, señales procedentes del hospedador o por pequeñas concentraciones de antibióticos (Wei & Ma, 2013). Aquí se discutirá la regulación independiente y dependiente de los sistemas de detección de quórum (QS).

6.1. Regulación independiente de los sistemas de detección de quórum

Las bacterias pueden reaccionar ante metabolitos secundarios, como los **antibióticos** e inducir la formación de biofilms. Esto ocurre cuando las concentraciones de los antibióticos son lo suficientemente bajas como para no matar a las bacterias, respondiendo estas, con modificaciones en su expresión génica. En *S. aureus*, la formación de los biofilm es inhibida cuando se activa el QS. Por lo tanto, cuando en el medio hay antibióticos que actúan contra el QS, se estimula la formación de los biofilms. (López et al., 2010).

Por otro lado, hay evidencias de que la **quimiotaxis** también influye en la adhesión a las superficies (Kostakioti et al., 2013). La quimiotaxis es el desplazamiento que realizan las bacterias según los gradientes de nutrientes o químicos del medio, favoreciendo así, la búsqueda de las localizaciones óptimas para su desarrollo y supervivencia (Singh et al., 2006). Por ejemplo, *P. aeruginosa* además de utilizar los apéndices como mecanismo de unión, dispone de otro sistema llamado circuito regulador Wsp. Este sistema, dispone de proteínas que son homólogas a las implicadas en la quimiotaxis. En la membrana celular se localiza un quimiorreceptor llamado WspA, que detecta una señal de la superficie y activa a unas proteínas sensoras (WspB, WspD y WspE). WspE se autofosforila, transfiriéndole un grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta, WspR, que presenta el dominio activador de la enzima DGC para sintetizar c-di-GMP, dando lugar finalmente a la producción de los biofilms (Hickman et al., 2005) (Figura 4).



Otro mecanismo de regulación comúnmente utilizado son los **sistemas de dos componentes** que participan en la formación de los biofilms. Su función es la detección de la información del medio ambiente mediante transferencias de grupos fosforilos. Básicamente, es un sensor histidina quinasa situado en la superficie celular que percibe una señal directa o indirectamente. Esta señal es transmitida a un regulador de respuesta mediante una fosforilación, generando finalmente, una respuesta fisiológica (Karatan & Watnick, 2009). Por ejemplo, *P. aeruginosa* utiliza el sistema GacS / GacA / RsmZ. GacS es el sensor histidina quinasa que, ante una señal del ambiente, transmite un grupo fosfato a una proteína reguladora llamada GacA. Esta, al recibir la información sensora, activa la transcripción de RsmZ y RsmY, que son unos pequeños ARN no codificantes. Estos se unen a RsmA, que es una proteína reguladora postranscripcional, que suprime la formación de los biofilms e incita la virulencia. Por lo tanto, al producirse esta unión, estos ARN inhiben el efecto negativo de RsmA, permitiendo la síntesis de las SPE y la formación de los biofilms (Kay et al., 2006; Jakobsen et al., 2017) (Figura 5).

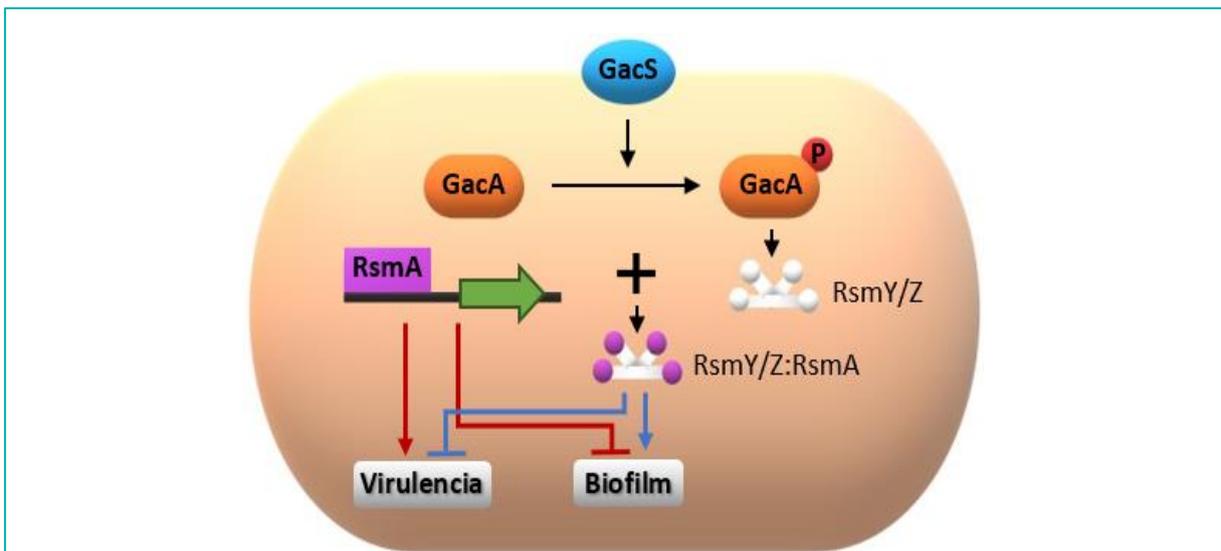


Figura 5: Sistema de dos componentes GacS / GacA / RsmZ de *P. aeruginosa*. GacS es una quinasa sensora de la membrana que, ante una señal ambiental, fosforila a una proteína reguladora llamada GacA. Esta proteína provoca la transcripción de pequeños ARN no codificantes (RsmY/Z), que se unen a una proteína reguladora (RsmA), encargada de inhibir la formación del biofilm y favorecer la virulencia (líneas rojas). Esta unión reprime RsmA, favoreciendo la formación de los biofilms y suprimiendo la virulencia (líneas azules). (Modificado de Wei & Ma, 2013).

6.2. Regulación dependiente de los sistemas de detección de quórum

Las bacterias necesitan coordinar su expresión genética para poder producir los biofilms, y esto, lo realizan gracias a los sistemas de detección de quórum (Rabin et al., 2015). Este sistema es un mecanismo que utilizan varias especies bacterianas para comunicarse, regular la densidad celular y coordinar los comportamientos de la comunidad. El QS regula varios procesos como la bioluminiscencia, producción de biofilms, dispersión, tolerancia a antibióticos, la segregación de factores virulentos y la generación de canales o poros (Singh et al., 2006; Rabin et al., 2015; Whiteley et al., 2017). Para sincronizar la expresión génica, las bacterias utilizan autoinductores, que son pequeñas moléculas que se emplean como señal intra o intercelular, actuando como vía de comunicación (Rabin et al., 2015). Es decir, las bacterias detectan la presencia de otras al sintetizar, localizar y responder a los autoinductores (Li & Tian, 2012).

Los sistemas QS actualmente se clasifican según las clases de bacterias, es decir, si son Gram-negativas o Gram-positivas. Los autoinductores son detectados por QS y sistemas reguladores específicos (Li & Tian, 2012). Es importante saber que las concentraciones de los autoinductores van a ser proporcionales con respecto a las densidades celulares de los biofilms. Es decir, conforme van aumentando las densidades, las concentraciones del autoinductor del medio van incrementándose hasta superar un umbral, que es cuando se producen las interacciones autoinductor-proteína reguladora (Rabin et al., 2015). Algunos estudios determinan que la actividad de los autoinductores depende de factores como la concentración, la forma de difusión, la accesibilidad de los receptores, la síntesis y la degradación de estas señales (Li & Tian, 2012).

En las **bacterias Gram-negativas**, el sistema de detección de quórum es de tipo LuxI/LuxR, cuyo autoinductor es una acil-homoserina lactona (AHL). La proteína LuxI, que es una autoinductasa sintasa, media la producción de un autoinductor AHL específico, que se difunde al exterior fácilmente por la membrana celular. Solo cuando las concentraciones de AHL en el medio extracelular son grandes debido a la alta densidad celular, es cuando la AHL puede introducirse en las bacterias y ser reconocidas por unas proteínas tipo LuxR. Una vez que han establecido contacto, LuxR interactúa como un activador transcripcional y se une a unos elementos específicos del promotor de unos genes diana (véase Figura 6). Es importante aclarar que cada especie bacteriana sintetiza sus propios autoinductores, por lo tanto, la comunicación es intraespecífica (Li & Tian, 2012).

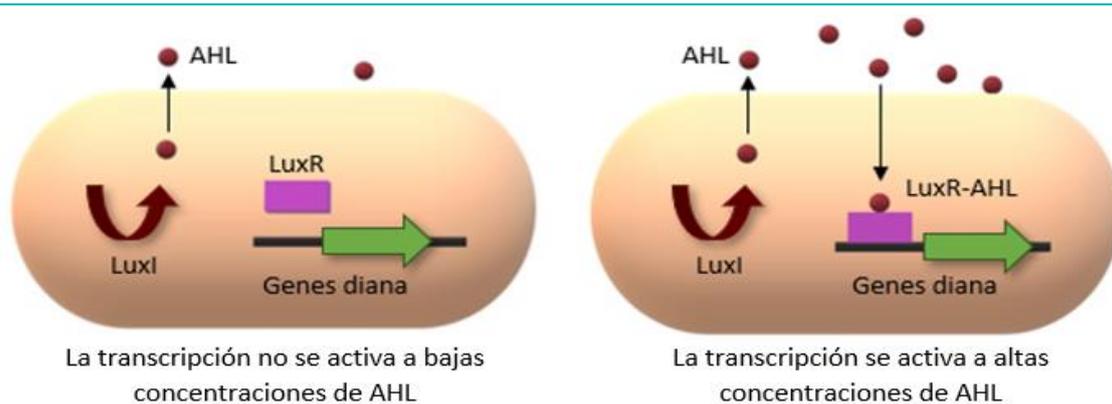


Figura 6: Sistema de detección de quórum tipo LuxI/LuxR en bacterias Gram-negativas. La proteína LuxI cataliza un autoinductor AHL específico que se difunde al exterior a través de la membrana celular. La figura de la izquierda representa este proceso cuando las densidades celulares y la concentración de AHL del medio son bajas. La figura de la derecha simboliza cuando las concentraciones de AHL son altas, al aumentar las densidades celulares. Solo en este último caso, es cuando la proteína tipo LuxR reconocerá la AHL, que es interiorizada por difusión y se une a unos genes diana, activando su transcripción. (Modificado de Li & Tian, 2012).

En las **bacterias Gram-positivas**, el sistema de detección de quórum es de dos componentes, que utilizan como autoinductor pequeños oligopéptidos modificados. En un principio, las señales se sintetizan internamente como péptidos precursores, y posteriormente, se modifican mediante un transportador de oligopéptidos para secretarse al exterior como un autoinductor. En la membrana celular hay un sensor histidina quinasa (SHK), que es una proteína de transducción de señales de dos componentes. Cuando esta proteína intercepta a los autoinductores extracelulares, se autofosforila, y se transmite el grupo fosfato hasta una proteína reguladora transcripcional. Esta proteína al fosforilarse se une a unos genes diana sensibles al quórum y activa su transcripción (Henke & Bassler, 2004) (Figura 7).

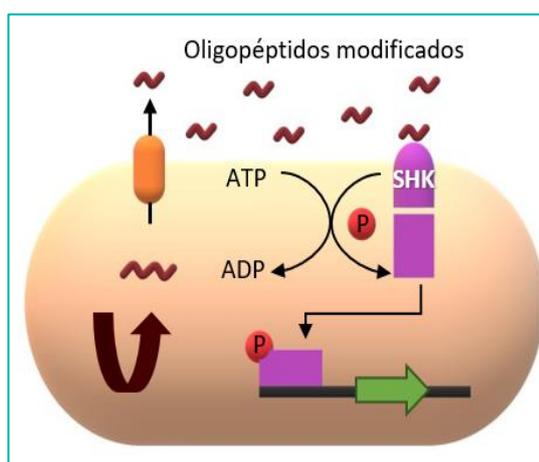


Figura 7: Sistema de detección de quórum en bacterias Gram-positivas. Se sintetiza un péptido precursor que es procesado y secretado al exterior. Este autoinductor es reconocido por un sensor histidina quinasa (SHK), que desencadena una serie de fosforilaciones, que activan a un regulador transcripcional de unos genes diana sensibles al quórum. (Modificado de Henke & Bassler, 2004).

Por último, el sistema de detección de quórum híbrido utilizado tanto en bacterias **Gram-positivas** como **Gram-negativa** es de tipo *luxS*, mediado por Al-2. Este sistema se utiliza para facilitar las comunicaciones interespecie de la comunidad, a diferencia de los sistemas QS descritos anteriormente (Li & Tian, 2012). En este caso, las moléculas señal son AHL como en las Gram-negativas, pero las bacterias presentan un sistema de detección sensor histidina quinasa de dos componentes en la superficie celular. Además del AHL, también sintetiza otro autoinductor llamado Al-2, que es el que permite la comunicación interespecie (Karatan & Watnick, 2009).

7. ENFERMEDADES HUMANAS RELACIONADAS CON BIOFILMS

Las infecciones relacionadas con los biofilms que son debidas a daños tisulares o por la implantación de algún cuerpo extraño en el hospedador, presentan una serie de características comunes (Lasa et al., 2005):

- En primer lugar, las superficies son colonizadas por las bacterias formadoras de los biofilms.
- Para producir una infección es necesaria la presencia de algún biomaterial, cuerpo extraño o tejido dañado.
- La infección comienza con pequeñas inoculaciones bacterianas.
- Resistencia de los biofilms ante el sistema inmune del hospedador y terapia antibiótica.
- Las infecciones más frecuentes son por *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, y por *P. aeruginosa*.
- Las infecciones son persistentes debido a esta resistencia antibacteriana.
- Presencia de inflamación, daño tisular y necrosis en la interfase tejido-implante.
- Perturbación de la respuesta inmune del hospedador por los biofilms.

Las enfermedades humanas producidas por bacterias formadoras de biofilms son de dos tipos, infecciones relacionadas con dispositivos y las no relacionadas con dispositivos médicos.

7.1. Enfermedades relacionadas con dispositivos médicos

Los implantes médicos son una de las fuentes más frecuentes de infección por biofilms. Esto es debido a contaminaciones bacterianas procedente de la piel del paciente, del personal sanitario o del ambiente. La adhesión del biofilm puede ser directamente al implante o indirectamente mediante biomoléculas. Esta fijación depende del flujo del líquido donde está

suspendido el implante, la concentración de bacterias y las características fisicoquímicas del implante. Por ejemplo, en las sondas urinarias, la contaminación procede de la bolsa recolectora y entra en el lumen del catéter, causando **infecciones urinarias**. En este caso, las bacterias se adhieren de forma directa al catéter. Una vez fijadas las bacterias pueden producir endotoxinas, que se pueden distribuir por el torrente sanguíneo y provocar la enfermedad (Lasa et al., 2005). Las bacterias formadoras de biofilms que suelen contaminar este dispositivo son, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y otras bacterias Gram-negativas (Jamal et al., 2018).

Otra infección causada por dispositivos médicos puede ser debido a la implantación de los **catéteres venosos centrales**. Aquí, al contrario que las sondas urinarias, la adhesión es indirecta. Las bacterias se adhieren a las proteínas del plasma y otras proteínas de los tejidos que están recubriendo el catéter. Estas bacterias pueden ser *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, especies de *Enterobacter* y de *Klebsiella* (Jamal et al., 2018). La forma más eficaz de contrarrestar estas infecciones relacionadas con los implantes médicos es su extracción (Jakobsen et al., 2017).

7.2. Enfermedades no relacionadas con dispositivos médicos

Por otro lado, tenemos las infecciones que no están relacionadas con dispositivos médicos, como la **endocarditis de válvulas nativas (EVN)**. Es una inflamación provocada por la interacción de bacterias con el endotelio vascular y las válvulas pulmonares del corazón. Las bacterias culpables de esta enfermedad son los estreptococos, estafilococos y bacterias Gram-negativas. Estas acceden al corazón y al torrente sanguíneo desde el tracto gastrointestinal, el tracto urinario o desde la orofaringe. Las bacterias llegan al endotelio de la válvula y se adhieren a él, causando una lesión (Jamal et al., 2018). Las células endoteliales responden secretando fibronectina, que favorece más aún la adhesión de las bacterias ya que se unen a estas moléculas mediante adhesinas específicas. Finalmente, las bacterias se multiplican, produce el biofilm y se reproduce una enfermedad difícil de combatir con antibióticos (Lasa et al., 2005). Curiosamente, cuando se implanta una válvula cardíaca protésica también puede conllevar a una infección, originando una endocarditis de la válvula protésica (Rabin et al., 2015).

La placa dental es una composición de biofilms mixtos. Generalmente, esta composición es beneficiosa para nuestra flora bucal pero cuando las condiciones del entorno oral cambian, se originan las enfermedades. Por ejemplo, cuando hay condiciones ácidas en la boca, las bacterias

inocuas no las toleran, y sin embargo, las patógenas son resistentes causando enfermedades como caries, periodontitis, gingivitis, etc (Rabin et al., 2015). La **periodontitis** es una infección de las encías que causa lesiones en los tejidos blandos y en los huesos de la mandíbula. Las bacterias acceden por una mala higiene bucal, y son capaces de formar biofilms tanto en los dientes como en las mucosas. Estas, alteran el flujo de calcio en las células epiteliales y dispersan endotoxinas. Finalmente, tras 2 o 3 semanas, se desarrolla una placa dental, que al mineralizarse con calcio e iones fosfatos, acaba generando el sarro. Las bacterias causantes de esto son *Pseudomonas aerobicus* y *Fusobacterium nucleatum* (Jamal et al., 2018).

Una de las enfermedades que despierta más interés a los investigadores médicos es la **fibrosis quística (FQ)**. Se trata de una enfermedad hereditaria del pulmón, donde se genera un moco espeso y pegajoso que bloquea las vías aéreas, perturbando así la respiración (Rabin et al., 2015). El patógeno oportunista *P. aeruginosa* es el responsable de provocar infecciones crónicas a los pacientes con FQ (Ma et al., 2009). Esta enfermedad provoca un gran deterioro pulmonar, afectando gravemente a la salud y pudiendo causar la muerte de los pacientes (Rabin et al., 2015). Diversos estudios han demostrado que *P. aeruginosa* forma los biofilms en los pulmones cuando las concentraciones de hierro del medio son bajas (Yang et al., 2007). Por otro lado, Pedersen y sus colaboradores detectaron que el alginato de las matrices celulares de *P. aeruginosa* actúa como factor de virulencia, ocasionando el daño pulmonar (Pedersen et al., 1992).

Tras esto, es importante aclarar que los biofilms bacterianos no solo están relacionados con los procesos infecciosos, sino que también pueden tener función protectora. Por ejemplo, los biofilms inocuos que se forman en la superficie dental evitan la colonización de bacterias patógenas (Lasa et al., 2005).

8. ESTRATEGIAS ANTI-BIOFILMS

Como se ha comentado, los biofilms son muy resistentes a los agentes antimicrobianos tradicionales, por lo que hay que buscar otras alternativas para poder erradicarlos. Actualmente, no existen medicamentos para el tratamiento concreto de los biofilms (Rabin et al., 2015). Básicamente, las estrategias anti-biofilms van dirigidas a la inhibición de la síntesis de la matriz y sus mecanismos reguladores (Wei & Ma, 2013).

Se ha descubierto que diferentes **extractos de plantas** producen un efecto inhibitorio contra la formación de los biofilms (Sadekuzzaman et al., 2015). Por ejemplo, los extractos de corteza

de *Melia dubia* revelaron una fuerte inhibición de la hemólisis, hidrofobicidad, la motilidad y formación de los biofilms de *E. coli* uropatógena (Ravichandiran et al., 2012).

Otra estrategia anti-biofilm es el empleo de **bacteriófagos**, que se puede usar como una alternativa potencial o combinado con antibióticos. Estos fagos tienen que traspasar la matriz de SPE para poder alcanzar los receptores de las bacterias. Para ello, utilizan unas enzimas procedentes de los fagos que degradan la matriz o pueden penetrar directamente mediante difusión. Este método es ventajoso debido a que tiene una afinidad altamente específica con el hospedador, no afecta a la microbiota normal y su producción es rápida, simple y barata. Sin embargo, es posible que los bacteriófagos generen endotoxinas o que disminuya su eficacia debido al sistema inmune del hospedador (Sadekuzzaman et al., 2015). Por ejemplo, el fago T4 infecta y se multiplica dentro de los biofilms de *E. coli*, causando la alteración de la matriz al lisar las bacterias (Meng et al., 2011).

Ya se ha comentado que el QS interviene en la formación del biofilm. Por esto, muchas estrategias van encaminadas a su extinción. Los **inhibidores de QS (QSI)** se utilizan para inhibir la producción de señales, impedir la transferencia de los autoinductores, bloquear los receptores que detectan la señal y reprimir la respuesta de señalización. La mayoría de los QSI son obtenidos de la naturaleza. Principalmente, se emplean análogos de AHL o de los péptidos señal para inhibir el QS en algunas bacterias (Li & Tian, 2012). Por otro lado, también se usan enzimas que degradan el AHL. Actualmente, estas enzimas se clasifican como, acilasa de AHL, lactonasas de AHL y oxidorreductasas. Como punto a favor, los QSI bloquean la síntesis de los factores de virulencia de los biofilms sin provocar la muerte celular. No obstante, se ha comprobado que esto potencia la sensibilidad de los biofilms a los antibióticos, por lo tanto, para un efecto más eficaz, debe emplearse en combinación con antibióticos (Sadekuzzaman et al., 2015). Un ejemplo de QSI son las furanonas halogenadas naturales producidas por la macroalga marina *Delisea pulchra*, que forma un complejo inestable con la proteína LuxR anteriormente mencionada y la degrada, inhibiendo así, el QS (Manefield et al., 2002). Además, se ha demostrado que son efectivas contra las invasiones de *P. aeruginosa* en los pulmones de ratones con infección pulmonar (Hentzer et al., 2003).

Como se ha comentado anteriormente, el **óxido nítrico (NO)** contribuye a la dispersión de los biofilms de *P. aeruginosa* cuando las concentraciones de este compuesto son bajas. Esto es debido a que se estimula la actividad de la enzima PDE, que degrada la formación de c-di-GMP, y por tanto, favorece la dispersión de los biofilms. Así pues, el NO se puede aplicar como una

estrategia anti-biofilm (Barraud et al., 2009).

Otro enfoque podría ser la utilización de **nuevas superficies** en los ámbitos médicos, alimentarios y marinos para prevenir la formación de los biofilms, como nuevos materiales, modificaciones de la superficie o nuevos recubrimientos y pintura (Sadekuzzaman et al., 2015). Por ejemplo, algunos dispositivos médicos se han recubierto con un péptido inhibidor de ARN III (RIP), que evita la formación de los biofilms de *S. aureus* (Balaban et al., 2003).

El uso de **enzimas** que degradan la matriz también es una buena estrategia anti-biofilm. Estas enzimas pueden ser desoxirribonucleasas, glicosidasas o proteasas, que intervienen en la dispersión de los biofilms maduros (Kaplan, 2010). Por ejemplo, la dispersina B producida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es una enzima que degrada la poli-N-acetilglucosamina (PNAG), que es uno de los polisacáridos principales de las matrices extracelulares encargados de la adhesión intercelular, por lo que inhibe la formación de los biofilms (Kaplan et al., 2004). Como ventaja, el uso de estas enzimas no mata a las bacterias ni inhiben su crecimiento sino que solo degradan la matriz. Esto es favorable ya que evita las posibles resistencias evolutivas de las bacterias (Kaplan, 2010).

Los **biosurfactantes o tensioactivos microbianos (BS)** son unos compuestos anfipáticos localizados en las superficies celulares o secretados extracelularmente por las bacterias. Se consideran agentes anti-biofilms ya que provocan una fuerte dispersión bacteriana, alteran la superficie celular y perturban la adhesión. En algunos casos también interfieren en el desarrollo de los biofilms y en la comunicación intercelular. Cuando se añade BS a una superficie se altera su hidrofobicidad, lo que afecta a la adherencia y la absorción bacteriana a dicha superficie (Sadekuzzaman et al., 2015). Por ejemplo, se ha usado la surfactina en catéteres uretrales para inhibir la formación de los biofilms de *B. subtilis*, *E. coli*, *P. mirabilis* y *Salmonella enterica* (Mireles et al., 2001).

Las **bacteriocinas** son unos péptidos o proteínas antibacterianas de espectro estrecho que son sintetizadas por procariotas y actúan contra especies estrechamente relacionadas. Estas moléculas se usan para evitar la adhesión y la formación de los biofilms. Esta estrategia se suele emplear para la conservación de los alimentos y en el ámbito médico. Por ejemplo, una de las bacteriocinas más relevantes en el ámbito alimentario es la nisina producida por *Lactococcus lactis*, que es un péptido que tiene actividad antibacteriana hacia otras bacterias Gram-positivas, como *B. subtilis* (López et al., 2009; Sadekuzzaman et al., 2015).

Se ha comprobado que las nucleasas como la **ADNasa** y la **ARNasa** son capaces de degradar los ácidos nucleicos presentes en la matriz extracelular (Whitchurch et al., 2002; Rendueles & Ghigo, 2012). Whitchurch y sus colaboradores hallaron que la inhalación de ADNasa I humana por pacientes con fibrosis quística les previene de la infección por *P. aeruginosa*, ya que inhibe la formación del biofilm (Whitchurch et al., 2002).

En definitiva, se ha demostrado que para realizar un tratamiento más efectivo contra las enfermedades infecciosas relacionadas con los biofilms, es recomendable utilizar estas estrategias combinadas (Jakobsen et al., 2017).

9. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El biofilm es una estrategia de vida que las bacterias llevan utilizando desde hace millones de años, siendo de hecho, su estilo de vida dominante. Sin embargo, los científicos solo llevan estudiando esta forma de vida un par de décadas. Vivimos en una guerra constante entre la ciencia y el enemigo invisible, los microorganismos. Es evidente que las bacterias evolucionan hacia un estilo de vida más exitoso, como los biofilms. El problema es que para avanzar, la investigación microbiológica necesita ir por delante en esta carrera contra la evolución bacteriana. Hoy en día, aún queda mucho camino que recorrer para comprender en su totalidad como se forman los biofilms, su expresión génica y sus mecanismos de regulación. Todo este conocimiento favorecerá el desarrollo de nuevas terapias anti-biofilms y estrategias de control, evitando así, enfermedades infecciosas. No es solo progresar en el estudio de los biofilms, sino en tecnologías que permitan una mejor identificación de moléculas o estrategias anti-biofilm. Por ejemplo, actualmente se están empleando medios para fabricar implantes inteligentes que detecten las infecciones por patógenos formadores de biofilms y que puedan combatirlos automáticamente *in situ* (Lasa et al., 2005). En definitiva, tal y como decía Francis Bacon en el año 1597 “*scientia est potentia*” que traducido del latín significa “conocimiento es poder”.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Balaban, N., Gov, Y., Bitler, A., & Boelaert, JR. **2003**. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney International* 63 (1): 340-345. [doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00733.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00733.x).
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, JS., et al. **2009**. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of Bacteriology* 191 (23): 7333-7342.

[doi:10.1128/JB.00975-09](https://doi.org/10.1128/JB.00975-09).

- Belas, R. **2014**. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22 (9): 517-527. [doi:10.1016/j.tim.2014.05.002](https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002).
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, TR., et al. **2006**. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 262 (1): 31-38. [doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00361.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00361.x).
- Boyd, A., & Chakrabarty, AM. **1994**. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7): 2355-2359. <https://aem.asm.org/content/60/7/2355>.
- Branda, SS., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. **2005**. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1): 20-26. [doi:10.1016/j.tim.2004.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006).
- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, SJ. **2014**. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology*, 22 (2): 84-91. [doi:10.1016/j.tim.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004).
- Caiazza, NC., & O'Toole, GA. **2004**. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 186 (14): 4476-4485. [doi:10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004).
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., et al. **2005**. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (35): 30829-30837. [doi:10.1074/jbc.M504429200](https://doi.org/10.1074/jbc.M504429200).
- Colvin, KM., Gordon, VD., Murakami, K., Borlee, BR., et al. **2011**. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7 (1): e1001264. [doi:10.1371/journal.ppat.1001264](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264).
- Das, T., Sharma, PK., Busscher, HJ., Mei, HC., et al. **2010**. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (10): 3405-3408. [doi:10.1128/AEM.03119-09](https://doi.org/10.1128/AEM.03119-09).
- Donlan, RM. **2001**. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (8): 1387-1392. [doi:10.1086/322972](https://doi.org/10.1086/322972).
- Donlan, RM. **2002**. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 881-890. [doi:10.3201/eid0809.020063](https://doi.org/10.3201/eid0809.020063).
- Finkel, SE., & Kolter, R. **2001**. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183 (21): 6288-6293. [doi:10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001).

- Flemming, H-C., & Wingender, J. **2010**. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9): 623-633. [doi:10.1038/nrmicro2415](https://doi.org/10.1038/nrmicro2415).
- Flemming, H-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., et al. **2016**. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9): 563-575. [doi:10.1038/nrmicro.2016.94](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94).
- Ghigo, J-M. **2001**. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412 (6845): 442-445. [doi:10.1038/35086581](https://doi.org/10.1038/35086581).
- Gloag, ES., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., et al. **2013**. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (28): 11541-11546. [doi:10.1073/pnas.1218898110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218898110).
- Hamilton, HL., Domínguez, NM., Schwartz, KJ., Hackett, KT., et al. **2005**. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 55 (6): 1704-1721. [doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x).
- Hasman, H., Chakraborty, T., & Klemm, P. **1999**. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *Journal of Bacteriology*, 181 (16): 4834-4841. <https://jbs.asm.org/content/181/16/4834>.
- Heindl, JE., Wang, Y., Heckel, BC., Mohari, B., et al. **2014**. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Frontiers in Plant Science*, 5 (176): 1-21. [doi:10.3389/fpls.2014.00176](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00176).
- Henke, JM., & Bassler, BL. **2004**. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14 (11): 648-656. [doi:10.1016/j.tcb.2004.09.012](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012).
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, JB., Riedel, K., et al. **2003**. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22 (15): 3803-3815. [doi:10.1093/emboj/cdg366](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366).
- Hickman, JW., Tifrea, DF., & Harwood, CS. **2005**. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (40): 14422-14427. [doi:10.1073/pnas.0507170102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507170102).
- Jakobsen, TH., Tolker-Nielsen, T., & Givskov, M. **2017**. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (9): 1970. [doi:10.3390/ijms18091970](https://doi.org/10.3390/ijms18091970).
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., et al. **2018**. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81 (1): 7-11. [doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012).
- Kaplan, JB. **2010**. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential

- therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89 (3): 205-218. [doi:10.1177/0022034509359403](https://doi.org/10.1177/0022034509359403).
- Kaplan, JB., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, DH., et al. **2004**. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (7): 2633-2636. [doi:10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004).
- Karatan, E., & Watnick, P. **2009**. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73 (2): 310-347. [doi:10.1128/MMBR.00041-08](https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08).
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., et al. **2006**. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188 (16): 6026-6033. [doi:10.1128/JB.00409-06](https://doi.org/10.1128/JB.00409-06).
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., et al. **2010**. D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 328 (5978): 627-629. [doi:10.1126/science.1188628](https://doi.org/10.1126/science.1188628).
- Körstgens, V., Flemming, H-C., Wingender, J., & Borchard, W. **2001**. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Science and Technology*, 43 (6): 49-57. [doi:10.2166/wst.2001.0338](https://doi.org/10.2166/wst.2001.0338).
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, SJ. **2013**. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3 (4): a010306. [doi:10.1101/cshperspect.a010306](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306).
- Lasa, I. **2005**. Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM*, 37: 14-18. https://www.sem microbiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/37/articulos/SEM37_14.pdf.
- Lasa, I., Pozo, JL., Penadés, JR., & Leiva, J. **2005**. Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sistema Sanitario Navarra*, 28 (2): 163-175. [doi:10.4321/S1137-66272005000300002](https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300002).
- Leid, JG., Willson, CJ., Shirtliff, ME., Hassett, DJ., et al. **2005**. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *Journal of Immunology*, 175 (11): 7512-7518. [doi:10.4049/jimmunol.175.11.7512](https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512).
- Lequette, Y., & Greenberg, EP. **2005**. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187 (1): 37-44. [doi:10.1128/JB.187.1.37-44.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.1.37-44.2005).
- Li, G., Brown, PJB., Tang, JX., Xu, J., et al. **2012**. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular Microbiology*, 83 (1): 41-51. [doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07909.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07909.x).

- Li, Y-H., & Tian, X. **2012**. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12 (3): 2519-2538. [doi:10.3390/s120302519](https://doi.org/10.3390/s120302519).
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. **2010**. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (7): a000398. [doi:10.1101/cshperspect.a000398](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398).
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. **2009**. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 74 (3): 609-618. [doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x).
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, MR., et al. **2009**. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5 (3): e1000354. [doi:10.1371/journal.ppat.1000354](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354).
- Ma, L., Jackson, KD., Landry, RM., Parsek, MR., et al. **2006**. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188 (23): 8213-8221. [doi:10.1128/JB.01202-06](https://doi.org/10.1128/JB.01202-06).
- Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, EM., et al. **2012**. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental Microbiology*, 14 (8): 1995-2005. [doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x).
- Manefield, M., Rasmussen, TB., Henzter, M., Andersen, JB., et al. **2002**. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148 (4): 1119-1127. [doi:10.1099/00221287-148-4-1119](https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1119).
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., et al. **1999**. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26 (1): 3-16. [doi:10.1016/S0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00057-4).
- Meng, X., Shi, Y., Ji, W., Meng, X., et al. **2011**. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (23): 8272-8279. [doi:10.1128/aem.05151-11](https://doi.org/10.1128/aem.05151-11).
- Mireles, JR II., Toguchi, A., & Harshey, R. **2001**. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183 (20): 5848-5854. [doi:10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001).
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. **2008**. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4 (11): e1000213. [doi:10.1371/journal.ppat.1000213](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213).
- Neu, TR., Dengler, T., Jann, B., & Poralla, K. **1992**. Structural studies of an emulsion-

- stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Journal of General Microbiology*, 138 (12): 2531-2537. [doi:10.1099/00221287-138-12-2531](https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2531).
- O'Toole, G., Kaplan, HB., & Kolter, R. **2000**. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54 (1): 49-79. [doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49).
- Pedersen, S., Hoiby, N., Espersen, F., & Koch, C. **1992**. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 47 (1): 6-13. [doi:10.1136 / thx.47.1.6](https://doi.org/10.1136/thx.47.1.6).
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., et al. **2015**. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7 (4): 493-512. [doi:10.4155 / fmc.15.6](https://doi.org/10.4155 / fmc.15.6).
- Ravichandiran, V., Shanmugam, K., Anupama, K., Thomas, S., et al. **2012**. Structure-based virtual screening for plant-derived SdiA-selective ligands as potential antivirulent agents against uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 48: 200-205. [doi:10.1016/j.ejmech.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.12.015).
- Rendueles, O., & Ghigo, J-M. **2012**. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (5): 972-989. [doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x).
- Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, DJ. **2007**. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10 (6): 644-648. [doi:10.1016/j.mib.2007.09.010](https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010).
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, MFR., & Ha, SD. **2015**. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (4): 491-509. [doi:10.1111/1541-4337.12144](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12144).
- Shaw, T., Winston, M., Rupp, CJ., Klapper, I., et al. **2004**. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Physical Review Letters*, 93 (9): 098102. [doi:10.1103/PhysRevLett.93.098102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.098102).
- Singh, R., Paul, D., & Jain, RK. **2006**. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14 (9): 389-397. [doi:10.1016/j.tim.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001).
- Skillman, LC., Sutherland, IW., & Jones, MV. **1999**. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (S1): 13S-18S. [doi:10.1111/j.1365-2672.1998.tb05278.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05278.x).
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., et al. **2005**. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*, 151 (3): 985-997. [doi:10.1099/mic.0.27410-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27410-0).

- Walker, TS., Tomlin, KL., Worthen, GS., Poch, KR., et al. **2005**. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infection and Immunity*, 73 (6): 3693-3701. [doi:10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005).
- Wei, Q., & Ma, LZ. **2013**. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10): 20983-21005. [doi:10.3390/ijms141020983](https://doi.org/10.3390/ijms141020983).
- Whitchurch, CB., Tolker-Nielsen, T., Ragas, PC., & Mattick, JS. **2002**. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295 (5559): 1487. [doi:10.1126/science.295.5559.1487](https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487).
- Whiteley, M., Diggle, SP., & Greenberg, EP. **2017**. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551 (7680): 313-320. [doi:10.1038/nature24624](https://doi.org/10.1038/nature24624).
- Wozniak, DJ., & Parsek, MR. **2014**. Surface-associated microbes continue to surprise us in their sophisticated strategies for assembling biofilm communities. *F1000Prime Reports*, 6 (26): 1-7. [doi:10.12703/P6-26](https://doi.org/10.12703/P6-26).
- Xu, J., Kim, J., Koestler, BJ., Choi, JH., et al. **2013**. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch. *Molecular Microbiology*, 89 (5): 929-948. [doi:10.1111/mmi.12321](https://doi.org/10.1111/mmi.12321).
- Yang, L., Barken, KB., Skindersoe, ME., Christensen, AB., et al. **2007**. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153 (5): 1318-1328. [doi:10.1099/mic.0.2006/004911-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004911-0).
- Zhang, X., & Bishop, PL. **2003**. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, 50 (1): 63-69. [doi:10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3).
- Zhang, X., Bishop, PL., & Kupferle, MJ. **1998**. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology*, 37 (4-5): 345-348. [doi:10.1016/S0273-1223\(98\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00127-9).
- Zhao, K., Tseng, BS., Beckerman, B., Jin, F., et al. **2013**. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 497 (7449): 388-391. [doi:10.1038/nature12155](https://doi.org/10.1038/nature12155).