

03021

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**El papel del oxígeno en la
formación de biofilms en
*Escherichia coli***

EJEMPLAR UNICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
MARITRINI COLÓN GONZÁLEZ



BIOMEDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Jorge Membrillo Hernández, en el Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Maritrini Colón González

Dr. Jorge Membrillo Hernández
Investigador Titular "B" de T. C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A MI FAMILIA

*Héctor Augusto Colón Guillén
María Trinidad González Salas
Miriam Citlalli Colón González
Héctor Augusto Colón González*

AGRADECIMIENTOS

La culminación de un trabajo significa el esfuerzo y colaboración de muchas personas, por lo que a través de estas líneas me gustaría agradecer a aquellos que de una u otra forma participaron para concluir este proyecto.

Al Doctor Jorge Membrillo Hernández, Director de esta Tesis, por preocuparse porque la educación recibida en el laboratorio no sólo sea cognoscitiva sino también una experiencia formativa.

A los miembros del laboratorio, los que están (David Zamorano Sánchez, Elizabeth Hernández Urzúa, Luis Delgado Olivares, Marcela Méndez Ortíz, Martha Contreras Zentella, Miguel Angel Esparza Cerón) y los que estuvieron mientras yo teñía las mesas de morado (y una que otra bata), gracias por hacer que los días en el laboratorio fueran agradables. Desde luego, a Don Miguel Páez Silva, por ser el responsable de que la mayoría de los experimentos sean reproducibles y por anotar en hielo las multas causadas por las faltas cometidas.

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, al Dr. Luis Padilla Noriega y los respectivos miembros de cada laboratorio (Ismael Ramírez Jiménez, Hugo Díaz Silvestre, Germán Bernal Fernández, Patricia Espinosa Cueto, Simón Guzmán León, Keili Vidal Zapata, Claudio Cabral Romero y Osvaldo Zarco Castro) por la paciencia brindada mientras aprendía a manejar una micropipeta, medir pH, o preparar y teñir geles; y porque no, por los buenos regaños y coscorriones, pero también, las palmaditas en la espalda y esos lazos afectivos inolvidables.

También me gustaría agradecer al Profesor Robert K. Poole por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio en la Universidad de Sheffield, Inglaterra. Asimismo, agradezco a los miembros de su laboratorio por el apoyo brindado.

A Brenda B. Garcia Iglesias, Karla I. Kat Ramos y Wendy Vargas Lozano, por aguantar conversaciones infinitas sobre lo que hago, aún cuando a veces no parezca

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tan interesante o sea inentendible, y desde luego, por seguir brindándome su amistad pese a que no devuelvo las llamadas y a que frecuentemente cambio una cita con ustedes por un matraz, mil gracias por el apoyo y por la compañía y las risas en las buenas, pero infinitamente gracias por estar ahí en las malas, por no dejarme desfallecer y por ayudarme a salir del "hoyo".

A Miguel Angel Esparza Cerón, por las múltiples y largas horas de espera y compañía mientras terminaba algún experimento, por alentarme a seguir aún cuando a veces el camino se tornaba pedregoso, por mostrarme los errores que cometía sin darme cuenta y por los regañíos cuando me percataba de ellos y permanecía sin hacer nada al respecto; pero sobre todo por tu amistad, cariño, paciencia, confianza y por enseñarme aquellas cosas que no se encuentran escritas en ningún libro.

Y casi por último, pero no menos importante, quiero tomarme estas líneas para agradecer a mi familia, Papá, Mamá, Héctor y Miriam, por apoyarme incondicionalmente en todo momento, por hacerme ver que los únicos problemas que existen son los que yo quiera que sean problemas, por sugerirme el camino a seguir sin forzarme a hacerlo, por preocuparse porque me sienta bien con lo que hago y lo que soy, por levantarme cuando tropiezo, pero no sin antes hacerme notar por qué he caído, y porque si no fuera por todo lo que mueven en mi seguramente no estaría aquí. Aunque mi nombre este en la portada, este trabajo es nuestro y lo que yo logre con él también es su mérito, gracias por todo.

Finalmente me gustaría agradecer a las instituciones que financiaron parcialmente este trabajo a través de presupuestos del proyecto J33369-N del CONACyT, IN205200 de PAPIIT UNAM, 00-419 RG/BIO/LA de TWAS. A la beca de Licenciatura de la DGAPA a través del donativo IN205200, y a la Academia Mexicana de Ciencias, Royal Society y Wellcome Trust por su apoyo para realizar una estancia de tres meses en el laboratorio del Profesor Robert K. Poole en el Instituto Hans Krebs de Investigación Biomolecular de la Universidad de Sheffield, Inglaterra.

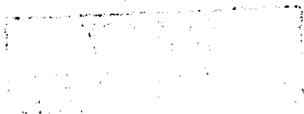


RESUMEN

El estilo de vida prevaeciente entre las bacterias es una estructura denominada biofilm o biocapa. La definición operacional de biofilm es el conjunto de comunidades de microorganismos adheridas a una superficie. La importancia del estudio de los biofilms, radica en el impacto que tienen en el área industrial y clínica, entre otras. El estudio del proceso de formación de biofilms en bacterias ha permitido la caracterización de moléculas importantes durante las diferentes etapas de este proceso. En *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* se ha demostrado que el biofilm se forma como un anillo en la interfase aire-medio o neustón (Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001), datos que han sugerido que el oxígeno juega un papel importante en este proceso. En el presente trabajo se estudia el papel del oxígeno en la formación de biofilms de *Escherichia coli*. Utilizando el método simple de tinción por cristal violeta demostramos que bajo nuestras condiciones experimentales *E. coli* K12 (cepa W3110) no es capaz de formar biofilm en condiciones anaeróbicas.

Nuestros resultados sugieren que la presencia de oxígeno es indispensable para la formación de biofilm y que además, la ausencia de oxígeno, actúa como una señal de disgregación del biofilm. Se observó que los compuestos ácidos liberados como productos secundarios durante el metabolismo fermentativo de *E. coli* (acetato, succinato, lactato y formiato) no inhiben la formación de biofilm y que al parecer no existen moléculas extracelulares inhibitorias involucradas con el proceso de adhesión inicial bajo condiciones anaeróbicas. Por otro lado, la motilidad no se ve afectada en ausencia de oxígeno. Finalmente, mutantes afectadas en genes que codifican para proteínas propuestas como posibles detectores de oxígeno, *fnr*, *arcA*, *aer* o *dpiB*, o en genes que codifican proteínas reguladoras como *hns*, *rpoS*, *csrA* o *fis*, no formaron biofilm en condiciones anaeróbicas. De igual forma, el estrés oxidativo no promovió la formación de biofilm anaeróbicamente. Después de analizar nuestros resultados, proponemos que i) el metabolismo anaeróbico de *E. coli* no contiene los elementos necesarios para la formación de biofilm, y que ii) el oxígeno es indispensable para este proceso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ABSTRACT

The prevailing bacteria lifestyle is a sessile structure called biofilm. Biofilms are communities of microorganisms attached to a surface. The importance of their study lies on the negative impact of biofilms on industrial, medical and environmental settings. The study of bacterial biofilms has led to the identification and characterization of different molecules required throughout the course of biofilm formation. In *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* cultures, it has been shown that biofilms are formed at the air-liquid interface. These data suggested that oxygen might be important in the process of biofilm formation. In this work, we focused on the role of oxygen in the formation of biofilms by *Escherichia coli*. Using the crystal violet staining method, we demonstrated that *E. coli* K12 (strain W3110) is not able to form biofilms under anaerobic conditions.

The presence of oxygen seems to be an essential requirement for biofilm formation. In addition, apparently the absence of oxygen is a detachment signal for the bacteria inside the biofilm. We demonstrated that fermentation products released to the medium such as lactate, formate or acetate do not play a negative role and that extracellular signals are probably not involved in the process of adhesion under anaerobic conditions. On the other hand, motility is not severely affected in absence of oxygen. Finally, genetic inactivation of several proteins involved in the redox switch such as Fnr, ArcA, Aer or DpiB, or in some regulatory proteins such as HN-S, RpoS, CsrA or Fis, biofilm formation under anaerobic conditions was not observed. Oxidative stress did not promote biofilm formation anaerobically. Our results led us to propose that either i) anaerobic metabolism in *E. coli* cannot support biofilm formation, or ii) oxygen plays a structural role in this process.

PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Parte del trabajo descrito en esta Tesis ha sido presentado en conferencias o en publicaciones científicas:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONGRESOS

1) Corona, F. P., Carreño, S., Colón, M., Hernández, E., Contreras, Cornejo, G., Medina, G., Méndez, M. M. and Membrillo-Hernández, J. Biofilm: A new view in Microbiology. XII Annual Meeting Frontiers of Science organizado por la Academia Nacional de Ciencias, U. S. A. Orange County, CA. U.S.A. 7 de Nov. del 2001.

2) Colón-González M., Aguirre-Ramírez M. y Membrillo-Hernández J. Exploración del papel del oxígeno y del estrés oxidativo en el metabolismo de formación de biofilm en *Escherichia coli*. VIII Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León". Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D. F. 25 de Julio del 2002.

3) Colón-González, M., Contreras-Zentella, M., Aguirre-Ramírez, M. and Membrillo-Hernández, J. Oxygen is essential for biofilm formation in *Escherichia coli*. Annual Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. U.S.A. 20-25 de Agosto del 2002.

4) Colón-González, M., Aguirre-Ramírez, M. and Membrillo-Hernández, J. Oxygen is an essential requirement for biofilm formation in *Escherichia coli*. BLAST VII Meeting. Cuernavaca, México. 19-24 de Enero del 2003.

PUBLICACIONES

1) Colón-González, M. and Membrillo-Hernández, J. (2003). Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. Artículo sometido a *FEMS Microbiology Letters*.

2) **Colón-González, M.** y Membrillo-Hernández, J. (2003). Comunicación entre bacterias. En **Microbios en línea** (2ª. ed.) Editado por Esperanza Martínez Romero. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM.

ABREVIATURAS

Todas las abreviaturas empleadas en este trabajo exceptuando las listadas a continuación, son las adoptadas por el *Journal of Bacteriology* e indicadas en el apartado de "Instrucciones a los autores".

Amp ^R	Ampicilina resistente
Cam ^R	Cloramfenicol resistente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
EPS	Exopolisacáridos
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Kan ^R	Kanamicina resistente
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LPS	Lipopolisacáridos
MNNG	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
MOPS	3- <i>N</i> -morfolino propano sulfonato
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QS	<i>Quorum sensing</i> (Percepción del quórum)
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
seg	segundo(s)
TA	Temperatura Ambiente
Tet ^R	Tetraciclina resistente
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U.A.	Unidades Arbitrarias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FOR THE
AGRO-ECOM

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.1. Características microbiológicas.....	3
1.1.2. Características genéticas.....	3
1.2. Biofilms	4
1.2.1. Importancia.....	5
1.2.2. Ventajas ecológicas.....	7
1.2.3. Modelo de formación del biofilm.....	8
1.2.3.1. Adhesión inicial y formación de microcolonias.....	9
1.2.3.1.1. Papel del flagelo en la formación de biofilm.....	10
1.2.3.1.2. Papel de las fimbrias en la formación de biofilm.....	11
1.2.3.1.3. Papel de los lipopolisacáridos (LPS) en la formación de biofilm.....	12
1.2.3.2. Maduración del biofilm.....	13
1.2.3.3. Disgregación del biofilm.....	14
1.2.4. Propiedades Fisicoquímicas.....	16
1.2.4.1. Propiedades Morfológicas.....	17
1.2.4.2. Propiedades Reológicas.....	17
1.2.4.3. Propiedades de Conductividad Térmica.....	17
1.2.4.4. Difusión en el biofilm.....	18
1.2.5. Factores que afectan la formación del biofilm.....	19
1.2.5.1. Naturaleza de la superficie.....	19
1.2.5.2. Factores Hidrodinámicos.....	19
1.2.5.3. Temperatura.....	19
1.2.5.4. pH.....	20
1.2.5.5. Oxígeno.....	20
1.2.5.6. Interacciones entre microorganismos.....	20
1.2.5.7. <i>Quorum sensing</i> (Percepción del quórum).....	21
1.2.5.7.1. <i>Quorum sensing</i> en bacterias Gram-positivas.....	21
1.2.5.7.2. <i>Quorum sensing</i> en bacterias Gram-negativas.....	22
1.2.5.8. Factores genéticos.....	24
1.3. Perfil genómico de células en biofilm	25
1.4. Objetivo de este proyecto	29
CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
2.1. Cepas bacterianas	33
2.2. Métodos de cultivo.....	34
2.2.1. Medios de cultivo.....	34
2.2.2. Condiciones de cultivo.....	35
2.3. Métodos genéticos	36
2.3.1. Transformación.....	36

INTRODUCCIÓN

2.3.1.1.	Preparación de células competentes.....	36
2.3.1.2.	Transformación de células competentes.....	37
2.3.2.	Transducción generalizada mediante fago P _{1vir}	37
2.3.2.1.	Preparación de lisados.....	37
2.3.2.2.	Transducción al genoma.....	38
2.3.3.	Mutagénesis.....	38
2.3.3.1.	Mutagénesis por inserción de un elemento transponible.....	38
2.3.3.1.1.	Preparación del lisado con fago λ.....	39
2.3.3.1.2.	Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10.....	39
2.3.3.2.	Mutagénesis mediante agentes químicos.....	40
2.4.	Métodos bioquímicos	41
2.4.1.	Determinación de la actividad de β-galactosidasa.....	41
2.5.	Ensayos de formación de biofilm	43
2.5.1.	Condiciones de Crecimiento.....	43
2.5.2.	Detección y cuantificación del biofilm mediante tinción con cristal violeta.....	44
2.5.3.	Detección del biofilm por Microscopia confocal.....	44
2.5.4.	Obtención de células y sobrenadantes.....	45
2.5.4.1.	Mezclas de células y sobrenadantes.....	45
2.6.	Curvas de crecimiento	46
2.7.	Ensayos de nado	46
2.8.	Manipulación y análisis de DNA	46
2.8.1.	Obtención de DNA genómico.....	46
2.8.2.	Obtención de DNA plasmídico.....	48
2.8.3.	Manipulación enzimática del DNA.....	49
2.8.3.1.	Endonucleasas de restricción.....	49
2.8.3.2.	DNA Ligasa del bacteriófago T4.....	50
2.8.4.	Análisis de DNA por hibridación tipo <i>Southern</i>	50
2.8.4.1.	Procesamiento del gel de agarosa.....	50
2.8.4.2.	Transferencia de DNA a la membrana.....	51
2.8.4.3.	Marcado de la sonda.....	52
2.8.4.4.	Hibridación y lavado de la membrana.....	53
2.8.4.5.	Generación y detección de la señal luminosa.....	53
2.8.4.6.	Revelado de película autoradiográfica.....	54
2.8.5.	Secuenciación del DNA.....	54
2.8.6.	Resolución y purificación de fragmentos de DNA.....	55
2.8.6.1.	Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa.....	55
2.8.6.2.	Purificación de fragmentos de DNA en solución.....	56
2.8.6.3.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa.....	56
CAPÍTULO 3. RESULTADOS		59
3.1.	Crecimiento de la cepa W3110 bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas	61
3.1.1.	Cinética de formación de biofilm en aerobiosis o anaerobiosis.....	61
3.1.2.	Microscopia confocal.....	64
3.1.3.	La ausencia de oxígeno como señal de disgregación.....	65
3.1.4.	Formación de biofilm bajo una atmósfera con 10 ó 21.1 % de oxígeno.....	66

3.2.	Papel de aceptores de electrones alternos	67
3.3.	Papel de los productos de fermentación en la formación de biofilm	68
3.4.	Participación de moléculas extracelulares en la formación del biofilm ...	70
3.5.	Papel de la motilidad en la formación de biofilm	72
3.6.	Estrés oxidativo y formación de biofilm	73
3.7.	Participación de posibles detectores de oxígeno y otros reguladores en la formación de biofilm	74
3.8.	El papel de CsrA en la disgregación del biofilm	75
3.9.	Búsqueda de una mutante capaz de formar biofilm anaeróbicamente	77
3.9.1.	Mutagénesis usando mini-transposones.....	77
3.9.1.1.	Mutantes afectadas en formación de biofilm aeróbicamente	78
3.9.1.2.	Ensayo de nado de las mutantes afectadas en la formación de biofilm aeróbicamente	78
3.9.1.3.	Mapeo de la inserción y secuenciación.....	79
3.9.2.	Mutagénesis con NSG	80
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN		81
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA		89
CAPÍTULO 6. APÉNDICE		99
6.1.	Artículo sometido "Anaerobic growth does not support biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> K12"	101
6.2.	Capítulo "Comunicación entre bacterias" en Microbios on line	124

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Genes cuyos productos estan involucrados en la formación de biofilm.....24
 Tabla 2.1. Cepas de *Escherichia coli*, bacteriófagos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....33

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Micrografía electrónica de *Escherichia coli*.....3
 Fig. 1.2. Impacto de los biofilms.....6
 Fig. 1.3. Modelo de formación de biofilm.9
 Fig. 1.4. Sistemas de *quorum sensing* en *Vibrio harveyi*.23
 Fig. 2.1. Transferencia de DNA a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad.52
 Fig. 3.1. Formación de biofilm en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.62
 Fig. 3.2. Curva de crecimiento de la cepa W3110.63
 Fig. 3.3. Detección de biofilm por microscopia confocal65
 Fig. 3.4. Disgregación del biofilm en ausencia de oxígeno66
 Fig. 3.5. Formación de biofilm bajo diferentes tensiones de oxígeno.66
 Fig. 3.6. Papel de la cadena de transporte de electrones en la formación de biofilm.67
 Fig. 3.7. Efecto de productos de fermentación en la formación de biofilm de *Escherichia coli* W3110.68
 Fig. 3.8. Formación de biofilm de cepas deficientes en producción de acetato69
 Fig. 3.9. Papel de señales extracelulares en la formación del biofilm71
 Fig. 3.10. Ensayo de motilidad mediada por nado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....72
 Fig. 3.11. Expresión de CsrA bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas76
 Fig. 3.12. Ensayo de motilidad mediada por nado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....78
 Fig. 3.13. Organización de los genes que participan en biosíntesis de fimbria tipo I en *Escherichia coli*.....80

PAGINACIÓN DISCONTINUA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Escherichia coli*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1.1. Características microbiológicas

Escherichia coli es un bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia de las enterobacterias (Fig. 1.1.). Este microorganismo es parte de la flora bacteriana, aunque también tiene la capacidad de vivir fuera del hospedero.

E. coli ha sido el modelo experimental por excelencia desde hace muchos años, en ella se han descrito diversos procesos metabólicos y fisiológicos bacterianos, asimismo el establecimiento de muchas de las bases de la genética ha sido posible gracias al fácil manejo de esta bacteria en el laboratorio. Además de la fácil manipulación de este organismo en condiciones de laboratorio, existen muchas herramientas genéticas y se dispone de la secuencia completa del genoma de dicha enterobacteria.



Fig. 1.1. Micrografía electrónica de *Escherichia coli*. Tomadas de <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/photobiologie/images/kap7/abb.7.2.html>.

1.1.2. Características genéticas

La secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12 MG1655 fue reportada en septiembre de 1997 por Blattner y colaboradores (Blattner *et al.*, 1997). Su genoma consiste en una doble cadena de DNA circular que contiene aproximadamente 4.6 Mpb,

a lo largo del cual se distribuyen 4401 genes que codifican 116 RNAs no traducidos y 4285 proteínas, de las cuales sólo se han caracterizado alrededor del 50% y aproximadamente un 20% de ellas no tiene función asignada (Serres *et al.*, 2001). Cabe mencionar que un grupo de Investigadores japoneses también determinó la secuencia de diferentes minutos del genoma de *E. coli* K12 cepa W3110 (Yura *et al.*, 1992; Fujita *et al.*, 1994; Aiba *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1996; Oshima *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997).

1.2. Biofilms

La concepción de las bacterias como microorganismos unicelulares ha provocado que los análisis de su metabolismo y fisiología estén basados en el estudio de cultivos líquidos puros (de una sólo especie en cultivos líquidos). Este estilo de vida libre o crecimiento planctónico no es, sin embargo, el estilo prevaeciente de vida entre las bacterias bajo condiciones naturales, en las cuales las bacterias se agrupan en comunidades sésiles o biofilms que desarrollan una conducta coordinada y que pueden alternar entre la existencia como células individuales (planctónicas) o como parte funcional de estructuras definidas (biofilms; Costerton *et al.*, 1995). Otro ejemplo del tipo de conducta bacteriana coordinada es el caso de *Myxococcus xanthus*, que forma estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos que contienen esporas resistentes a diversos tipos de estrés ambiental. Esta diferenciación celular es disparada por la falta de nutrimentos (Dworkin, 1996).

Las primeras observaciones del estilo de vida en biofilm, fueron realizadas por Antonie van Leeuwenhoek, quien observó la presencia de microorganismos en superficies y en agua, sin embargo, el estudio molecular de comunidades bacterianas inició hace dos o tres décadas. Un biofilm es la acumulación de microorganismos en una interfase, principalmente sólido-líquido, caracterizada, además, por la producción de una matriz polimérica producida por los organismos constituyentes y en la cual se encuentran embebidos (Characklis y Marshall, 1990; Allison *et al.*, 2000).

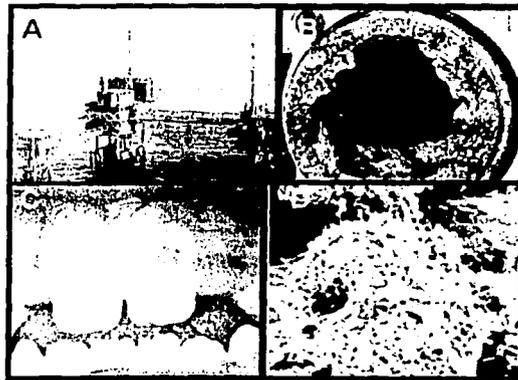
1.2.1. Importancia

El impacto de los biofilms bacterianos en diferentes procesos ambientales involucra el empleo de comunidades sésiles de bacterias en la biorremediación de suelos contaminados por desechos industriales u otros materiales peligrosos. En el tratamiento de aguas residuales el uso de biofilms aumenta la eficiencia de degradación de desechos orgánicos e inorgánicos además facilitan la remoción de partículas contaminantes disueltas en fuentes acuáticas naturales, etc. (Characklis y Marshall, 1990).

Sin embargo, el impacto de los biofilms en otras actividades humanas también tiene efectos negativos. La acumulación de biofilms en sistemas de distribución de agua potable disminuye la calidad del agua y aumenta el riesgo de infecciones. De igual forma, la acumulación de biofilms en oleoductos y otros conductos y tuberías utilizadas en procesos industriales, ocasiona biodeterioración, corrosión, disminución de la eficiencia de trabajo, pérdida de energía, bloquea tuberías impidiendo o reduciendo el paso de fluidos, entre otras (Characklis y Marshall, 1990; Mittelman, 1998).

Quizá el impacto más negativo que se ha atribuido a los biofilms, se debe a la gran variedad de infecciones en el hombre que han sido asociadas a estas comunidades sésiles (Allison *et al.*, 2000). Se ha observado que una gran variedad de microorganismos, dentro de los cuales podemos mencionar a *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sanguis* y *Staphylococcus aureus*, quienes son capaces de formar biocapas bacterianas en implantes médicos y algunos de ellos como el patógeno oportunista *P. aeruginosa* coloniza los pulmones de pacientes con fibrosis quística en forma de biofilm (Singh *et al.*, 2000), además de ocasionar una gran variedad de infecciones en el hombre (Costerton *et al.*, 1995; Hyde *et al.*, 1998). Las infecciones causadas por biofilms, generalmente derivan en infecciones persistentes debido a un aumento de incluso 1000 veces en la resistencia al tratamiento con antibióticos que presentan las células del biofilm respecto a las células planctónicas (Gilbert *et al.*, 1997). Existen estudios en los cuales se ha observado que el efecto de los antibióticos

en las células que constituyen al biofilm únicamente es eficiente cuando se trata al biofilm simultáneamente con un campo eléctrico (Khoury *et al.*, 1992). El establecimiento de biofilms en el humano es un proceso lento que generalmente no produce síntomas. Una vez que el biofilm se ha establecido, las bacterias que lo constituyen liberan antígenos que estimulan la respuesta inmune, sin embargo ésta falla en eliminar las bacterias constituyentes del biofilm, pero ocasiona daño en el tejido que rodea al sitio de infección como en el caso de la endocarditis bacteriana (Ward *et al.*, 1992), además las bacterias que son liberadas del biofilm pueden diseminarse y causar infecciones adicionales.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1.2. Impacto de los biofilms. A) Aplicación en biorremediación de fuentes acuiferas contaminadas, B) obstrucción de oleoductos, C) placa dentobacteriana y D) biofilms formados por *P. aeruginosa* en pulmones de pacientes con fibrosis quística.

Dado el amplio espectro de implicaciones que los biofilms bacterianos tienen en el área ambiental, industrial y clínica, el conocer la fisiología, estructura y mecanismos moleculares de estas comunidades de microorganismos, permitirá crear nuevas estrategias que guíen a mejorar y ampliar las aplicaciones de dichas comunidades sésiles tanto en el área ambiental, como industrial. Además, proporcionará las bases para el desarrollo de mecanismos de control de biocapas bacterianas involucradas en infecciones de una manera más eficiente. Es por ello que el descifrar las causas que llevan a las células en estado planctónico a constituir parte de una comunidad sésil, es un aspecto fundamental en el estudio de biocapas bacterianas.

1.2.2. Ventajas ecológicas

Posiblemente las bacterias prefieren el estilo de vida en biofilm por las ventajas ecológicas que este nicho les proporciona, como protección del ambiente, mayor resistencia a diferentes tipos de estrés y cooperación metabólica.

Uno de los componentes principales del biofilm es la matriz exopolimérica en la cual se encuentran embebidas las células, dicha matriz extracelular se conforma por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y principalmente (75-89%) por exopolisacáridos (EPS), los cuales juegan un papel muy importante durante el proceso de adhesión inicial a un sustrato y en la determinación de la estructura tridimensional del biofilm (Danese *et al.*, 2000b; Hentzer *et al.*, 2001; Tsuneda *et al.*, 2003). La protección proporcionada a las células constituyentes del biofilm a través de esta matriz, puede deberse a que ésta actúa como una barrera física que limita la difusión de sustancias tóxicas como antibióticos (Stewart, 2003) y además proporciona protección ante ciertos tipos de estrés ambiental, como irradiación por luz ultravioleta (Elasri y Miller, 1999).

Dado que los biofilms pueden estar formados por múltiples especies, pueden desarrollarse relaciones de cooperación metabólica entre los microorganismos que lo constituyen. En este tipo de relaciones o asociaciones sintróficas dos tipos de bacterias con metabolismos diferentes dependen la una de la otra para utilizar un cierto sustrato. Un ejemplo de este tipo de asociaciones lo constituye la degradación del metano (Schink, 1997), en la cual las bacterias de metabolismo fermentativo producen ácidos y alcoholes que son utilizados como sustrato por bacterias acetogénicas y los productos de estas últimas sirven de sustrato a otra especie bacteriana para producir metano.

La transferencia genética horizontal es un proceso que permite que secuencias de DNA sean diseminadas en poblaciones microbianas naturales, lo cual permite la evolución y diversidad genética de las mismas. Uno de los ejemplos de transferencia horizontal más estudiados es la propagación de genes con resistencia a antibióticos entre las poblaciones microbianas. Se ha observado que las células que constituyen el

biofilm también pueden adquirir nuevo material genético a través de la transferencia horizontal, lo cual representa otra ventaja para ellas.

Dada la heterogeneidad de las especies que pueden convivir en un biofilm y la cercanía de las células que lo integran, la transferencia genética horizontal puede representar un mecanismo a través del cual las células adquieran nuevas rutas metabólicas que favorezcan a la comunidad o la obtención de genes de resistencia a diversos antibióticos.

1.2.3. Modelo de formación del biofilm

La transición de células en estado planctónico a un estilo de vida en el cual se agrupan comunidades sésiles absorbidas en una matriz extracelular ocurre a través de una serie de procesos altamente organizados. Las etapas que se pueden distinguir dentro de este proceso son: i) adhesión inicial y formación de microcolonias, ii) maduración y iii) disgregación del biofilm.

Como se describirá en detalle más adelante en el proceso de adhesión inicial las células planctónicas son transportadas hacia una superficie haciendo uso de la motilidad mediada por flagelo. Una vez en las cercanías del sustrato se desarrollan interacciones célula-superficie a través de pili, curli, fimbrias o adhesinas. Una vez adheridas las células forman microcolonias y posteriormente forman el biofilm maduro, una estructura en la cual las células están embebidas en una matriz de exopolisacáridos, en esta etapa la producción de EPS tiene un papel crucial. Finalmente las células que constituyen el biofilm maduro pueden dispersarse y regresar a su estado planctónico, la disgregación del biofilm puede deberse a estrés físico o a la acción de algunas polisacárido liasas (Fig. 1.3.). Más adelante se describirán algunos de los genes reportados cuya expresión ha sido involucrada con algunas etapas del proceso de formación del biofilm.

Para el estudio de los mecanismos necesarios para el proceso de formación del biofilm se ha hecho uso de la genética bacteriana, utilizando una gran variedad de mutantes afectadas en diferentes etapas del proceso de formación de biofilm. La detección de estas mutantes se ha llevado a cabo utilizando técnicas de tinción que permiten la visualización del biofilm o mediante ensayos de microscopia confocal (Genevaux *et al.*, 1996; Pratt y Kolter, 1998; O'Toole y Kolter, 1998b).

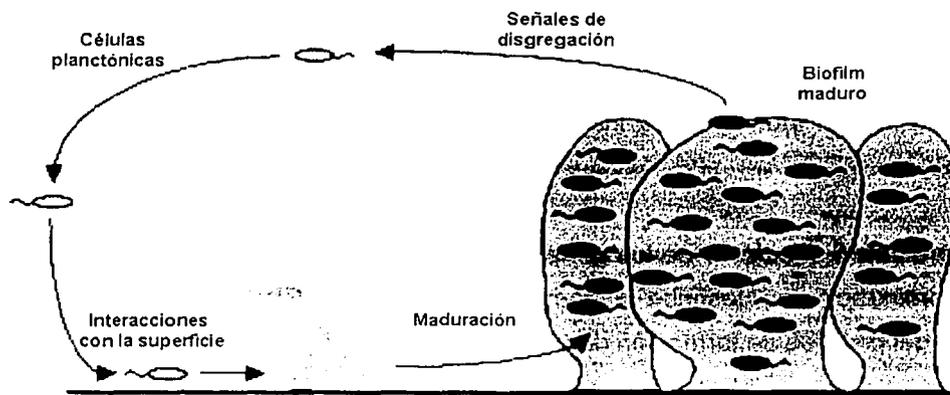


Fig. 1.3. Modelo de formación de biofilm. Tomado de O'Toole *et al.* 2000.

1.2.3.1. Adhesión inicial y formación de microcolonias

Durante la primera etapa del proceso de formación de biofilm las células se aproximan al substrato o superficie, para lo cual, en algunos casos, hacen uso de la motilidad mediada por flagelo. Una vez que las células han hecho contacto con la superficie inicia una serie de interacciones célula-superficie las cuales permiten estabilizar el complejo, durante esta fase se requiere la participación de fimbrias, curli y pili. Finalmente, además de las interacciones de las células con la superficie, se desarrollan interacciones intercelulares, a través de fimbrias, curli y algunas adhesinas que permiten el establecimiento de microcolonias.

Antes de continuar, es necesario hacer un paréntesis para definir los conceptos de fimbria, curli y pili. Aunque en muchos casos el término pili ha sido usado

indistintamente al término fimbria, es necesario distinguirlos del pili sexual o F, que juega un papel importante en la transferencia de DNA entre bacterias. Las fimbrias o pili común son apéndices proteináceos de las células procarióticas, menores en diámetro y longitud (de 2 a 8 nm) que los flagelos y formados por subunidades denominadas fimbrinas o pilinas. Existen diferentes familias de fimbrias, una de ellas la conforman los curlis, estructuras denominadas así por su forma rizada. A diferencia del flagelo, las fimbrias (pili común y curli) no están involucradas en motilidad, excepto la fimbria o pili tipo IV de *P. aeruginosa*, que participa en un tipo de motilidad basada en la propulsión de la célula sobre una superficie o "twitching motility" (Bradley, 1980). El pili tipo IV ha sido involucrado en interacciones intercelulares y adhesión a superficies (O'Toole y Kolter, 1998a).

Regresando al estudio de los genes requeridos durante el proceso de adhesión inicial, a continuación se describe brevemente el papel que algunos de ellos juegan en esta etapa del proceso de formación de biofilm.

1.2.3.1.1. Papel del flagelo en la formación de biofilm

En *P. aeruginosa* se han aislado mutantes afectadas en la adhesión a una superficie abiótica o mutantes *sad*, denominadas así por las iniciales del fenotipo en inglés: surface attachment defective (O'Toole y Kolter, 1998a), una clase de estas mutantes esta afectada en síntesis de flagelo. De manera similar, mutantes afectadas en síntesis de flagelo en *E. coli* presentan deficiencias en adhesión y formación de biofilm (Pratt y Kolter, 1998). Posiblemente, durante este proceso, el flagelo esta involucrado en alguna de las siguientes funciones: i) Quimiotaxis mediada por el flagelo que permite a las células planctónicas nadar hacia una superficie en la cual se encuentran nutrientes disponibles o hacia una superficie abiótica en respuesta a las señales generadas por células previamente adheridas; ii) Motilidad mediada por flagelo que proporciona a las células la capacidad de contrarrestar las fuerzas repulsivas en la superficie; iii) Motilidad mediada por flagelo que podría permitir a las células ya adheridas que se encuentren dividiendo, dispersarse a lo largo de la superficie y por

último, iv) existe la posibilidad de que el flagelo participe directamente en la adhesión a la superficie (Pratt y Kolter, 1998). Sin embargo, el papel del flagelo en el proceso de formación de biofilm no ha sido claramente definido, ya que en *E. coli*, mutantes en flagelo que sobreproducen curli no presentan ningún defecto en la formación de biofilm (Prigent-Combaret *et al.*, 2000), resultados similares se obtuvieron al usar mutantes en flagelo en *P. aeruginosa* incubadas en cámaras de flujo en presencia de citrato (Klausen *et al.*, 2003). Estos resultados indican que los mecanismos utilizados para el inicio de formación de biofilm dependen también de condiciones ambientales.

1.2.3.1.2. Papel de las fimbrias en la formación de biofilm

Las fimbrias (fimbrias, curli y pili común) participan en la adhesión inicial de las células a una superficie y median interacciones intercelulares. La importancia de la producción de fimbrias en el proceso de formación de biofilm es diferente en *P. aeruginosa* y en *E. coli*.

En *P. aeruginosa* el pili tipo IV participa en la propulsión de la célula sobre la superficie o "twitching motility" (Bradley, 1980), que permite el reclutamiento de células para la formación de microcolonias. Mutantes afectadas en biogénesis de pili tipo IV son capaces de adherirse al substrato, pero forman una monocapa sin agregados celulares (O'Toole y Kolter, 1998a). Se ha observado que en *P. aeruginosa*, el regulador catabólico Crc, además, de reprimir el metabolismo de azúcares en presencia de ácidos orgánicos está involucrado en la regulación de los genes *pilA* y *pilB*, que codifican pilinas o subunidades estructurales del pili tipo IV (Wolff *et al.*, 1991; O'Toole *et al.*, 2000), por lo que posiblemente Crc es parte de un sistema de transducción de señales que responde a nutrimentos en el medio y probablemente juega un papel importante en la transición de células planctónicas a células en biofilm (O'Toole *et al.*, 2000).

Por otro lado, a diferencia de *P. aeruginosa*, mutantes de *E. coli* afectadas en síntesis de pili tipo I están también afectadas en adhesión (Pratt y Kolter, 1998), adicionalmente, en este mismo estudio fue observado que el ácido colánico (un

componente de la matriz de exopolisacáridos) no es indispensable para la adhesión, formación y maduración de biofilm en mutantes de *E. coli* sobreproductoras de curli, posiblemente, aparte de participar en las interacciones de la célula con el substrato, las fimbrias celulares también están involucradas en el arreglo espacial de las células dentro del biofilm (Prigent-Combaret *et al.*, 2000).

Resultados similares han sido reportados para *E. coli* enteroagregativa (EAEC), la cual requiere de la fimbria de adherencia agregativa AAF/II para mediar adhesión a la mucosa intestinal en el hombre (Czeczulin *et al.*, 1997) y a superficies inertes como plástico y vidrio. Además, se ha observado que la expresión de AAF/II es regulada por un activador codificado por *aggR* y que éste a su vez podría ser regulado por la proteína Fis, resultados acordes con el hecho de que mutantes en el gen *fis* están afectadas en la formación de biofilm (Sheikh *et al.*, 2001). En el mismo estudio se observó que la expresión de AAF/II depende del producto del gen *yafK*, cuya función es desconocida, mutantes en *yafK* al igual que en *fis*, están afectadas en la formación de biofilm (Sheikh *et al.*, 2001).

Estos resultados son consistentes en *Salmonella enteritidis* y *Streptococcus parasanguis* en los cuales mutantes en la biogénesis de fimbrias agregativas (*thin aggregative fimbriae*, SEF17) o genes involucrados en biogénesis de fimbrias (*fap1*), respectivamente, muestran defectos en cuanto adhesión inicial y en la progresión de la cinética de formación del biofilm, lo cual indica que las fimbrias son importantes para la formación de biofilm en superficies inertes, posiblemente al estabilizar el contacto intracelular permitiendo la agregación de las células (Austin *et al.*, 1998; Froeliger y Fives-Taylor, 2001).

1.2.3.1.3. Papel de los lipopolisacáridos (LPS) en la formación de biofilm

Se ha observado que algunos lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa participan en el proceso de adhesión inicial a una superficie (Tsuneda *et al.*, 2003). En *E. coli* se ha observado que mutantes en genes que participan en síntesis de

LPS (*rfaG*, *rfaP* y *galU*) presentan defectos en adhesión, sin embargo, la pérdida de adhesión a una superficie de poliestireno en estas mutantes puede deberse al efecto negativo de estas mutaciones en la producción de fimbria tipo I (Genevaux *et al.*, 1999b).

1.2.3.2. Maduración del biofilm

La maduración del biofilm es un proceso a través del cual las bacterias constituyentes de éste forman estructuras tridimensionales complejas, es decir, se organizan en pilares o columnas formados por múltiples capas de bacterias embebidas en una matriz de exopolímeros a través de la cual corren canales acuosos (Costerton *et al.*, 1995). Esta etapa se ha asociado con una intensa producción de exopolisacáridos, como el ácido colánico en *E. coli* o el alginato en *P. aeruginosa* (Danese *et al.*, 2000b; Hentzer *et al.*, 2001) cuya síntesis es controlada por señales involucradas en el fenómeno de comunicación intercelular (Davies *et al.*, 1998).

Uno de los mecanismos de comunicación intercelular entre bacterias es el "detector de quórum" (*quorum sensing*, QS), que controla la producción de luz o bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri* a través de la producción de señales moleculares como pueden ser las homoserina lactonas (HSL) que se acumulan en el medio de cultivo de manera dependiente a la densidad celular. Este tipo de comunicación también ha sido observado en diversas especies de microorganismos y se explicará más detalladamente el apartado 1.2.5.7. de este trabajo.

Estudios previos han demostrado que en los biofilms existe producción de HSL (McLean *et al.*, 1997; Stickler *et al.*, 1998) y el papel del QS ha sido analizado en algunos reportes (Kjelleberg y Molin, 2002). En *P. aeruginosa* se ha observado que mutantes en *lasI*, el cual activa la síntesis de *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona, son incapaces de desarrollar biofilms maduros y son más sensibles a la adición de SDS que la cepa silvestre; además, la adición exógena de esta HSL permite la maduración del biofilm (Davies *et al.*, 1998).

Consistentemente con estas observaciones se ha reportado que el alga australiana *Delisea pulchra* produce una furanona halogenada que interfiere con el QS mediado por acil homoserina lactonas, posiblemente al competir por el sitio de unión de la homoserina en la proteína receptora; además los biofilms tratados con dicha furanona son incapaces de madurar (Hentzer *et al.*, 2002).

Resultados similares se han observado en la bacteria *Burkholderia cepacia*, un patógeno que generalmente coloniza los pulmones de pacientes con fibrosis quística ya infectados por *P. aeruginosa*. El sistema de QS en *B. cepacia* está constituido por las proteínas CepI/CepR. Mutantes en *cepR* que codifica la proteína receptora desarrollan biofilms de menor grosor y cubren una menor área de la superficie a la que se adhieren, es decir, son biofilms que son incapaces de madurar (Huber *et al.*, 2001).

Como se describió anteriormente, la producción de EPS es necesaria para la maduración del biofilm, en *P. aeruginosa* la producción de alginato está regulada por *algT*. El sistema de QS LasI/LasR regula al sistema de QS RhII/RhIR y éste a su vez regula a los genes que participan en la síntesis de alginato (Hentzer *et al.*, 2001). En *E. coli* la producción de ácido colánico es necesaria para la diferenciación del biofilm a un biofilm maduro (Danese *et al.*, 2000b).

1.2.3.3. Disgregación del biofilm

La disgregación del biofilm puede deberse a una debilitación de las fuerzas cohesivas que mantienen a las células adheridas a la superficie generalmente, como resultado de estrés físico causado por la fricción generada por el flujo del líquido sobre la superficie del biofilm y depende de la velocidad y turbulencia del flujo y de la estructura del biofilm. Por otro lado la dispersión de las células que componen el biofilm puede ser ocasionada por la acción de enzimas que degraden la matriz polimérica que envuelve a las células, pero también puede ser influenciada por factores que son regulados dependiendo de la fase de crecimiento o por factores ambientales, como la falta de nutrientes en el medio que ocasiona la emigración de las células.

Dado que la matriz extracelular que envuelve al biofilm esta formada principalmente por exopolisacáridos, es probable que la disgregación del biofilm sea causada por la degradación de esta matriz. *P. aeruginosa* produce una alginato liasa que rompe los polimeros de alginato en pequeños oligosacáridos, lo cual afecta la propiedad del alginato de anclar las células a la superficie o de retener a las células dentro del biofilm y favorece la dispersión de las mismas (Boyd y Chakrabarty, 1994). Por otro lado *Streptococcus mutans* produce una enzima cuya actividad permite liberar sus propias proteínas de superficie (SPRE, *surface protein-releasing enzyme activity*) y que también ha sido involucrada con el proceso de disgregación (Lee *et al.*, 1996).

Estudios previos en *P. fluorescens* han demostrado que la formación máxima de biofilm se alcanza entre las 20 y 50 h y después de este tiempo la cantidad de biofilm formado disminuye, hecho relacionado con la pérdida de la matriz exopolimérica, ya que se detectó actividad de exopolisacárido liasa en los sobrenadantes de cultivos que ya han formado un biofilm maduro (Allison *et al.*, 1998).

Recientemente Kaplan y colaboradores reportaron que en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* el proceso de disgregación del biofilm involucra la formación de células no agregadas dentro del mismo, las que posteriormente son liberadas del biofilm. La producción de O-polisacáridos, un componente de los lipopolisacáridos, es importante para la formación de estas células no agregadas (Kaplan *et al.*, 2003a). Además, se observó que se requiere la participación de una *N*-acetilglucosaminidasa codificada por el gen *dspB*, cuya expresión posiblemente es inducida dentro de la colonia por el microambiente generado dentro de ésta, como baja tensión de oxígeno o menor concentración de nutrientes (Kaplan *et al.*, 2003b, Stewart, 2003).

Al igual que en otros microorganismos, en *A. actinomycetemcomitans* el pili tipo IV juega un papel importante en la adhesión, una de las pilinas que lo conforman esta sujeta a modificación postraducciona, tal vez a través de glicosilaciones, lo cual involucra la actividad de una *N*-acetilglucosamina y si ésta es hidrolizada por DpsB posiblemente se alterarían las propiedades del pili y con ello la adhesión. También

existe la posibilidad de que la *N*-acetilglucosamina sea uno de los componentes de la matriz de exopolisacáridos de *A. actinomycetemcomitans* y que al ser degradada por la *N*-acetilglucosaminidasa favorezca la disgregación (Kaplan *et al.*, 2003b).

En *E. coli* se ha reportado que el regulador global CsrA (carbon storage regulator) es una señal que favorece la disgregación del biofilm (Jackson *et al.*, 2002). CsrA es un regulador postranscripcional que reprime varias vías metabólicas que son inducidas en fase estacionaria como la biosíntesis y catabolismo de glicógeno y gluconeogénesis (Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996), además de activar glicólisis, metabolismo de acetato y motilidad (Wei *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Mutantes en *csrA* estimulan la formación de biofilm, además dobles mutantes *csrA-fimH-B*, *csrA-cpsE*, *csrA-csgA*, afectadas en producción de pili tipo I, ácido colánico y curli respectivamente, fueron capaces de formar biofilm en mayor proporción que en presencia de *csrA*. Posiblemente el papel de CsrA en la disgregación del biofilm se lleva a cabo a través de la represión de la biosíntesis de glicógeno, ya que una doble mutante *csrA-glgA* (glicógeno sintasa) está severamente afectada en la formación de biofilm (Jackson *et al.*, 2002), estos resultados concuerdan con estudios realizados en *S. enteritidis*, en los cuales la formación de biofilm se relaciona con la producción de glicógeno (Bonafonte *et al.*, 2000).

1.2.4. Propiedades Físicoquímicas

Los componentes principales de los biofilms son las células que los constituyen y la matriz de EPS en la cual las células se encuentran embebidas, dado que los EPS constituyen de un 50-90% del biofilm, la composición y cantidad de los EPS producidos por las células que integran el biofilm determinarán las propiedades del mismo (Tsuneda *et al.*, 2003). Asimismo las propiedades del biofilm controlan en cierta medida los procesos que ocurren dentro de éste; un ejemplo es la actividad metabólica de las células que constituyen al biofilm, la cual es influenciada por la cantidad de nutrimentos que a su vez está determinada por la difusión de los mismos (Stewart, 2003).

1.2.4.1. Propiedades Morfológicas

La estructura de los biofilms puede variar de acuerdo a la diversidad de especies que lo componen, condiciones ambientales y al perfil de expresión genética de las células que lo integran (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Danese *et al.*, 2000b; Hentzer *et al.*, 2001). El biofilm puede estar formado por una monocapa de bacterias distribuidas homogéneamente sobre la superficie y con un grosor de 1-2 μm , hasta estructuras tridimensionales complejas en forma de hongo, distribuidas heterogéneamente sobre la superficie formando columnas de diferente tamaño que pueden medir cientos de micras (Fig. 1.3.), las cuales son penetradas por canales acuosos que permiten el abastecimiento de nutrientes, oxígeno y desecho de sustancias tóxicas (Stoodley *et al.*, 1994).

1.2.4.2. Propiedades Reológicas

Estas se refieren a las características de la corriente que se forma alrededor de un cuerpo. El biofilm es una estructura viscosa y elástica lo cual le permite no fragmentarse fácilmente cuando es deformado por la corriente y flujo del medio líquido (Stoodley *et al.*, 1999a).

1.2.4.3. Propiedades de Conductividad Térmica

La conductividad termal de un biofilm es similar a la del agua, lo cual concuerda con que gran parte del biofilm está formado por agua. Algunos cálculos indican que la resistencia a la transferencia de calor de un biofilm es aproximadamente 27 veces mayor que la de una lámina de acero del mismo grosor. Esta característica podría explicar parcialmente la mayor resistencia de los biofilms a diferentes tipos de estrés, incluyendo el térmico (Allison *et al.*, 2000).

1.2.4.4. Difusión en el biofilm

Los organismos que componen el biofilm consumen o utilizan nutrimentos y otras moléculas que difunden a través del biofilm. La difusión de moléculas en el biofilm está determinada por las características de estas moléculas, cantidad y propiedades de la matriz extracelular, reacciones de las moléculas con los microorganismos del biofilm, grosor del biofilm, etc. Es por ello que es común encontrar gradientes de concentración de ciertas moléculas en un biofilm y esto puede explicar algunos fenómenos que ocurren dentro de esta comunidad de microorganismos.

Un gradiente en la concentración de nutrimentos puede explicar la heterogeneidad en el estado metabólico de las células que integran el biofilm, además de proveer una posible explicación del aumento en resistencia a antibióticos que las células en el biofilm exhiben respecto a las células planctónicas, ya que el mecanismo de acción de algunos antibióticos está ligado a traducción o replicación celular y si estos procesos están disminuidos en las células del biofilm, entonces el efecto de los antibióticos también se verá disminuido.

De igual forma la difusión juega un papel muy importante en el efecto que otras sustancias tóxicas causan a las células del biofilm. La matriz extracelular puede actuar como barrera física que no permita la difusión de sustancias tóxicas a las células que se encuentran en la base del biofilm o como un escudo, ya que algunos componentes de esta matriz pueden reaccionar con ciertas sustancias como el HCl, disminuyendo el daño celular (Stewart, 2003). Asimismo, debido a los gradientes de oxígeno que se han encontrado en el biofilm (Stoodley *et al.*, 1994), se puede explicar la presencia de organismos anaeróbicos estrictos en biofilms formados aeróbicamente en presencia de aeróbicos estrictos o facultativos (Bradshaw *et al.*, 1997; Bradshaw *et al.*, 1998).

1.2.5. Factores que afectan la formación del biofilm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.5.1. Naturaleza de la superficie

Se ha observado que la adhesión de las bacterias a una superficie depende de las características de ésta. La cantidad de nutrimentos depositados sobre la superficie puede ser un factor que favorezca la adhesión de microorganismos. En algunos reportes se observa que la hidrofobicidad del sustrato es determinante en la adhesión y retención de las bacterias sobre la superficie (Bos *et al.*, 2000), además la colonización de la superficie varía de acuerdo a sus características de hidrofobicidad o hidrofiliidad (Dalton *et al.*, 1994).

1.2.5.2. Factores Hidrodinámicos

En este punto se contempla el flujo del medio líquido en el cual se encuentra el biofilm, ya que éste determinará la tasa de transporte de nutrimentos y células planctónicas hacia el sustrato. Se ha observado que de acuerdo a la turbulencia del flujo del líquido sobre el biofilm, éste desarrolla estructuras diferentes, si el flujo es turbulento, las microcolonias forman estructuras filamentosas en dirección al flujo (Stoodley *et al.*, 1999b).

1.2.5.3. Temperatura

Posiblemente el efecto de la temperatura en la formación del biofilm es el mismo que sobre el crecimiento de células planctónicas, por lo que tal vez la temperatura de crecimiento óptimo en determinado organismo sea muy similar a la temperatura óptima requerida para que estos microorganismos integren el biofilm.

1.2.5.4. pH

Se ha reportado que la adición del amortiguador MOPS [3-(*N*-morfolino)propano sulfonato] al medio de cultivo mejora la formación de biofilm (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b), además se ha reportado que existe un pH óptimo de formación de biofilm en *E. coli* que corresponde a pH 6.5 por lo que posiblemente el pH del medio influye de alguna manera la formación de biofilm (Corona-Izquierdo, 2002).

1.2.5.5. Oxígeno

Estudios sobre formación de biofilm en *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* han mostrado que el biofilm se forma como un anillo en la interfase aire-medio (O'Toole *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001) estos datos han sugerido un papel importante del oxígeno en este proceso.

1.2.5.6. Interacciones entre microorganismos

Como ya se mencionó en otra sección de este trabajo, en ambientes naturales, la forma prevaleciente de vida bacteriana es el biofilm y además éste generalmente se integra por una gran variedad de microorganismos. Ejemplo de comunidades heterogéneas son los biofilms formados en unidades dentales, constituidos por más de trece géneros de bacterias, entre las que podemos mencionar *Leptospira*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Escherichia* y *Pseudomonas* entre otras; por lo que es plausible que la variedad de microorganismos que forman parte del biofilm y las interacciones que surjan entre ellos sea un factor importante para el establecimiento del biofilm bajo determinadas condiciones. Se ha observado que los anaerobios estrictos *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* pueden formar biofilm en condiciones aeróbicas cuando son incubados en presencia de organismos facultativos o aeróbicos estrictos, como *Neisseria subflava*, ya que éste último disminuye la tensión de oxígeno dentro del biofilm a niveles que pueden permitir el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

crecimiento de anaeróbicos estrictos, lo que además, permite que la cantidad de organismos anaeróbicos aumente con el tiempo de incubación (Singh *et al.*, 2003).

1.2.5.7. *Quorum sensing* (Percepción del quórum)

En apartados anteriores de este proyecto se señaló que una de las formas de comunicación entre las bacterias es el "*quorum sensing*" (QS), término que describe la capacidad de un organismo de percibir y responder a moléculas químicas o autoinductores que actúan como señales y son acumuladas de manera dependiente a la densidad celular, las cuales permiten controlar de manera coordinada la expresión genética de una comunidad.

La comunicación entre bacterias fue inicialmente estudiada en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Hastings y Nealson, 1977; Nealson y Hastings, 1979). Esta bacteria es capaz de producir luz a través de una reacción catalizada por la enzima luciferasa, sin embargo, la producción de luz únicamente ocurre cuando la densidad celular es alta y este proceso es regulado mediante las proteínas LuxI/LuxR (Engbrecht *et al.*, 1983; Engbrecht y Silverman, 1984). Otras de las respuestas o fenómenos que son reguladas por el QS, aparte de la producción de luz son la virulencia y la formación de biofilm.

1.2.5.7.1. *Quorum sensing* en bacterias Gram-positivas

La comunicación celular en las bacterias Gram-positivas se lleva a cabo a través de la producción de oligopéptidos modificados que funcionan como señales, los que son secretados extracelularmente vía un transportador ABC (*ATP binding cassette*). Cuando la cantidad de péptidos secretados alcanza una determinada concentración éstos son detectadas por una proteína detectora, parte de un sistema de dos componentes, que transduce las señales a un regulador de respuesta mediante una cascada de fosforilación que finalmente induce la expresión de ciertos genes (Schauder y Bassler, 2001).

1.2.5.7.2. *Quorum sensing* en bacterias Gram-negativas

Homólogos al sistema de QS LuxI/LuxR han sido encontrados en más de 25 especies de bacterias Gram-negativas. La comunicación se lleva a cabo a través de la producción de homoserinas lactonas con un grupo acil (acil-HSL). La enzima LuxI produce HSL acoplando la cadena acil proveniente de una proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) con la homocisteína de la S-adenosilmetionina (SAM). Las acil-HSL difunden a través de la pared celular, al igual que en bacterias Gram-positivas, una vez que alcanzan el umbral de detección se unen a la proteína receptora LuxR y activan la transcripción de genes blanco (Schauder y Bassler, 2001; Fuqua *et al.*, 2001).

Los dos tipos de lenguaje bacteriano (a través de péptidos señal u acil homoserina lactonas) permiten la comunicación entre bacterias de la misma especie, sin embargo, existe un mecanismo de comunicación universal descrito al menos en bacterias Gram negativas, es decir, un lenguaje entendido por bacterias de diferentes especies. Éste se ha descrito en la bacteria marina *V. harveyi* que posee dos sistemas de QS que combinan las características de los sistemas de QS en Gram-positivas y Gram-negativas (Fig. 1.4.).

La síntesis del autoinductor 1 y 2 (AI-1 y AI-2) está a cargo de las enzimas LuxLM y LuxS, respectivamente, no obstante, a diferencia del sistema canónico LuxI/LuxR el AI-1 (acil-HSL) es detectado por la histidina cinasa LuxN, mientras que el AI-2 (compuesto de tipo furanona) es detectado por el sistema LuxP-LuxQ. En ambos casos la señal se transduce mediante una cascada de fosforilación al regulador de respuesta LuxO a través de una proteína intermediaria denominada LuxU. A baja densidad celular la proteína LuxO se encuentra fosforilada y activa la transcripción de un represor del operón *lux* (encargado de la producción de luz) por otro lado, a una densidad celular alta el represor no se transcribe y la proteína LuxR activa la transcripción del operón *lux* (Fig. 1.4., Bassler, 1999).

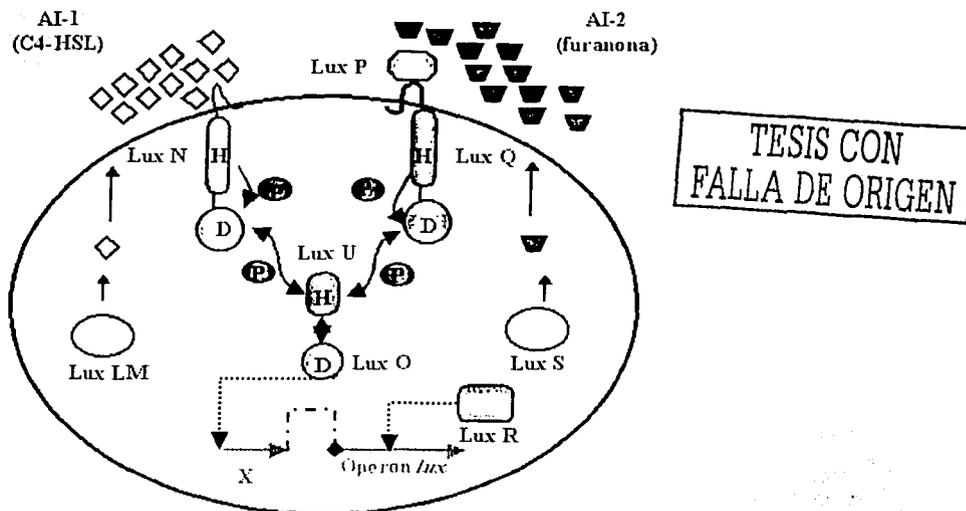


Fig. 1.4. Sistemas de *quorum sensing* en *Vibrio harveyi*.

La comunicación intraespecie en *V. harveyi* se realiza a través de la producción del AI-1, mientras que la comunicación interespecie se lleva a cabo mediante el AI-2. El análisis *in silico* ha permitido demostrar la presencia de homólogos de la proteína LuxS en más de 30 especies de bacterias (Surette y Bassler, 1998; Fuqua *et al.*, 2001).

En *P. aeruginosa* se han reportado dos sistemas de QS homólogos al sistema LuxI/LuxR, estos son LasI/LasR y RhII/RhIR. El primer sistema de quórum sensing está formado por la proteína LasI responsable de la síntesis de *N*-(-3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) y por el activador transcripcional LasR; éste sistema regula la producción de algunos factores de virulencia en *P. aeruginosa*, como elastasas, proteasas, hemolisinas, neuraminidasas, etc. El segundo sistema de QS se integra por las proteínas RhII y RhIR, la primera tiene a su cargo la síntesis de *N*-butanoil-L-homoserina lactona (BHL) y la segunda actúa como regulador transcripcional al unirse a BHL. El sistema de QS RhII/RhIR regula la síntesis de ramnolípidos, elastasas y alginato entre otros (Whitehead *et al.*, 2001)

1.2.5.8. Factores genéticos

En la siguiente tabla se describen brevemente algunos de los genes cuyos productos han sido involucrados con la formación del biofilm.

Tabla 1.1. Genes cuyos productos están involucrados en la formación de biofilm.

Gen	(Producto) Función	Organismo	Referencia
<i>dspB</i>	(N-acetilglucosaminidasa) Participa en disgregación del biofilm	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Kaplan <i>et al.</i> , 2003b
<i>cepl/cepR</i>	Sistema de QS	<i>B. cepacia</i>	Huber <i>et al.</i> , 2001
<i>agn43 (flu)</i>	(Ag43, antígeno 43) Media interacciones célula-célula y célula-superficie en medio mínimo suplementado con glucosa	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000a
<i>cpxR</i>	(Sistema de dos componentes CpxRA, de estrés extracelular) Monitorea biogénesis de pili	<i>E. coli</i>	Otto y Silhavy, 2002
<i>csgA</i>	(Curlina, subunidad estructural del curli) Participa en interacciones celulares con la superficie y con otras células	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2000
<i>csgD</i>	(CsgD) Regulador transcripcional de curli	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2001
<i>csrA</i>	(CsrA, regulador global de unión a RNA) Represor de la formación de biofilm y activador de la dispersión del mismo	<i>E. coli</i>	Jackson <i>et al.</i> , 2002
<i>dsbA</i>	(DsbA) Participa en el plegamiento de proteínas extracitoplásmicas que contienen puentes disulfuro y en ensamblaje de fimbria tipo I y del cuerpo basal del flagelo	<i>E. coli</i>	Genevaux <i>et al.</i> , 1999a
Grupo <i>fim</i>	(pili tipo I) Media interacciones célula-célula y célula superficie	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998
<i>flhD</i>	Regulador maestro de síntesis de flagelo	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998
<i>fliC</i>	(Flagelina) Subunidad estructural del flagelo	<i>E. coli</i>	Pratt y Kolter, 1998
<i>nlpE</i>	(Lipoproteína de membrana externa) Posiblemente transmite señales al dominio periplásmico de CpxA en respuesta a daño en membrana causado al momento de adhesión	<i>E. coli</i>	Otto y Silhavy, 2002
<i>ompR234</i>	(OmpR, parte del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR que responde a osmolaridad) Mutantes en este gen sobreproducen curli	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2001
<i>oxyR</i>	(OxyR, regulador maestro durante estrés oxidativo) La forma reducida de OxyR reprime la expresión del gen <i>flu</i>	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000a; Schembri <i>et al.</i> , 2003a

Gen	(Producto) Función	Organismo	Referencia
<i>rfaG rfaP galU</i>	(Participan en la biosíntesis del "core" de LPS) Mutantes en estos genes están afectadas en motilidad y fimbria tipo I	<i>E. coli</i>	Genevaux <i>et al.</i> , 1999b
<i>rpoS</i>	(RpoS) Factor sigma de fase estacionaria	<i>E. coli</i>	Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a Whiteley <i>et al.</i> , 2001
<i>wcaF</i>	Participa en la producción de ácido colánico.	<i>E. coli</i>	Danese <i>et al.</i> , 2000b
<i>cpsE</i>	Participa en síntesis de ácido colánico	<i>E. coli</i>	Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2000
<i>aafA</i>	(AafA, subunidad de AAF/II) Participa en adherencia agregativa	EAEC	Czczulin <i>et al.</i> , 1997
<i>aggR</i>	(AggR) Activador transcripcional de AAF/II	EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001
<i>fis</i>	(Fis) Activa la expresión de AggR	EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001
<i>yafK</i>	(YafK) Proteína hipotética, posiblemente regula los genes que codifican AAF/II a nivel transcripcional	EAEC	Sheikh <i>et al.</i> , 2001
<i>algL</i>	(Alginato liasa) Degrada alginato, participa en disgregación del biofilm	<i>P. aeruginosa</i>	Boyd y Chakrabarty, 1994
<i>algT</i>	(AlgT) Regula síntesis de alginato	<i>P. aeruginosa</i>	Hentzer <i>et al.</i> , 2001
<i>flgK</i>	Proteína flagelar asociada al gancho	<i>P. aeruginosa</i>	O'Toole y Kolter, 1998a
<i>lasI</i>	(LasI) N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona	<i>P. aeruginosa</i>	Davies <i>et al.</i> , 1998
<i>mucA22</i>	(Factor anti-sigma de <i>algT</i>) Mutantes en este gen sobreproducen alginato	<i>P. aeruginosa</i>	Hentzer <i>et al.</i> , 2001
<i>pilBCD</i>	(PilB, PilC, PilD) Síntesis de pili tipo IV	<i>P. aeruginosa</i>	O'Toole y Kolter, 1998a
<i>agfA</i>	(AgfA, subunidad de fimbria SEF17) Estabiliza el contacto intracelular y participa en adhesión a superficies	<i>S. enteritidis</i>	Austin <i>et al.</i> , 1998
<i>fap1</i>	(Fap1, adhesina asociada a fimbria) Participa en biogénesis de fimbrias	<i>S. parasanguis</i>	Froeliger y Fives-Taylor, 2001

1.3. Perfil genómico de células en biofilm

A lo largo de este capítulo se han descrito algunas de las diferencias en el metabolismo de las células planctónicas respecto a las células en biofilm, como ejemplo

podemos mencionar el aumento en la resistencia a antibióticos característico de las células que integran el biofilm. Dichas diferencias son consecuencia de un perfil de expresión genética diferente en las células del biofilm respecto a las células planctónicas. Una de las herramientas utilizadas para determinar como difiere la expresión genética en células incubadas bajo diferentes condiciones (en este caso células planctónicas y células en biofilm) son los microarreglos de DNA (Ye *et al.*, 2001).

El perfil de expresión genética de células en biofilm de *P. aeruginosa* comparadas con las mismas células pero en estado planctónico, ha demostrado que sólo aproximadamente el 1% de los genes muestran una expresión diferente en ambas condiciones, la expresión del 0.5% de estos se activa en el biofilm y el resto se reprime en el biofilm (Whiteley *et al.*, 2001).

Los genes mayoritariamente activados en las células del biofilm pertenecen a un bacteriófago temperado relacionado al fago filamentoso Pf1, dado que *P. aeruginosa* contiene 11 de 14 genes de Pf1 posiblemente la inducción e estos genes podría ser importante en el proceso de transferencia genética dentro del biofilm.

Algunos de los genes involucrados en el mecanismo de resistencia a antibióticos modificando la permeabilidad de la pared celular como el gen *tolA* (Rivera *et al.*, 1988) presentan mayor expresión en las células del biofilm. Mientras que los genes que codifican la citocromo *c* oxidasa, cuya expresión se ha relacionado con sensibilidad a antibióticos aminoglicosilados (Bryan *et al.*, 1980; Bryan y Kwan, 1983), se reprimen en el biofilm (Whiteley *et al.*, 2001).

Dentro del grupo de genes cuya expresión se encuentra reprimida en las células en biofilm se encuentran los genes que participan en la biosíntesis de pili y flagelo, posiblemente estas estructuras sólo son requeridas en ciertas etapas del proceso de formación de biofilm y una vez que han transcurrido, la síntesis de dichas estructuras ya no es requerida (Whiteley *et al.*, 2001). La expresión del factor sigma de fase

estacionaria *rpoS* también se reprime en el biofilm, posiblemente participa negativamente en la morfología y resistencia a antibióticos de los biofilms (Whiteley *et al.*, 2001). Mutantes en *rpoS* muestran un biofilm más robusto en *P. aeruginosa* (Whiteley *et al.*, 2001), lo que ocurre también en *E. coli* (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a).

En *E. coli* O157:H7 se han realizado estudios proteómicos que han permitido identificar algunas de las proteínas responsables del fenotipo de las células en el biofilm (Tremoulet *et al.*, 2002). En este trabajo la detección de las proteínas con diferente expresión en células en biofilm y células planctónicas se llevó a cabo utilizando geles de doble dimensión, posteriormente estas proteínas se identificaron mediante MALDI-TOF-MS. Utilizando esta metodología se identificaron 14 proteínas cuya síntesis estaba incrementada en las células del biofilm y 3 cuya síntesis se reprimía en las células del biofilm (Tremoulet *et al.*, 2002).

Dentro de las proteínas cuya expresión aumentó en el biofilm se encuentra la malato deshidrogenasa, tiamina fosfato pirofosforilasa (TPP-PPASE), la proteína de unión a galactosa (GBP), la proteína periplásmica de unión a ribosa (RBP), un transportador de aminoácidos tipo ABC, Dps (proteína de unión a DNA durante escasez de nutrientes) y H-NS (Tremoulet *et al.*, 2002). La malato deshidrogenasa es una enzima importante en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el aumento en la síntesis de esta proteína en las células del biofilm sugiere que el metabolismo central de *E. coli* es afectado por las condiciones de cultivo. Asimismo el aumento en TPP-PPASE, RBP y GBP indican que posiblemente debido a la escasez de glucosa en el biofilm maduro, se favorece la degradación de ribosa y lactosa en el biofilm. Por otro lado dado que, tanto Dps como H-NS son proteínas reguladoras de unión a DNA, probablemente influyen la síntesis de proteínas requeridas para el biofilm (Tremoulet *et al.*, 2002).

Recientemente Schembri y colaboradores reportaron el perfil de expresión genética de células de *E. coli* K-12 MG1655 en biofilm (Schembri *et al.*, 2003b) valiéndose del uso de microarreglos. En este trabajo la expresión genética de células

en biofilm formados aeróbicamente se comparó con dos grupos de células planctónicas incubadas bajo condiciones aeróbicas: células planctónicas en fase exponencial y células planctónicas en fase estacionaria.

Para facilitar la descripción de resultados, únicamente voy a mencionar aquellos genes cuya expresión fue diferente en las células del biofilm respecto a las células planctónicas (tanto en fase exponencial como en fase estacionaria).

Los datos indican que bajo estas condiciones experimentales aproximadamente el 1.84% de los genes presentan una expresión alterada en las células en biofilm al compararlas con células planctónicas.

Dentro de los genes cuya expresión se encuentra inducida en las células del biofilm podemos mencionar a los genes *fimA* y *fimF* (biosíntesis de fimbria tipo I), *flu* (síntesis de Antígeno 43), *lpxC* (biosíntesis de lípido A), lo cual correlaciona con observaciones previas acerca del papel de las fimbrias y Antígeno 43 en las etapas de adhesión inicial a la superficie. Adicionalmente se observó que el operón *cydAB*, que codifica para la oxidasa terminal citocromo *d*, es inducido en las células en biofilm, estos resultados concuerdan con reportes anteriores que indican que dada la gran densidad de células en el biofilm que limitan la difusión de algunas moléculas pueden formarse gradientes de concentración de oxígeno y nutrientes dentro del biofilm lo que induce la expresión de genes como *dps* (regulador global de condiciones de escasez de nutrimentos).

Dado que las células del biofilm pueden estar sujetas a ciertos tipos de estrés como el osmótico, oxidativo o el causado por limitación de nutrientes y algunos de los genes que participan en la respuesta celular a dichos tipos de estrés son regulados por el factor sigma de fase estacionaria (σ^S o RpoS) los autores analizaron el perfil de expresión de los genes regulados por *rpoS* en las células del biofilm y además analizaron la formación de biofilm de una mutante MG1655 afectada en *rpoS* y observaron que bajo sus condiciones experimentales esta mutante no fue capaz de

formar biofilm. Resultados contrarios a los reportados en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* MC4100 (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a y Whiteley *et al.*, 2001).

1.4. Objetivo de este proyecto

La formación de biofilms en bacterias es un proceso que ha sido ampliamente estudiado, en particular en el patógeno oportunista *P. aeruginosa*, debido a que este microorganismo coloniza y establece biofilms en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (Singh *et al.*, 2000). Estudios sobre formación de biofilm en *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* han mostrado que el biofilm se forma como un anillo en la interfase aire-medio o neustón (O'Toole *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001), estos datos sugieren que el oxígeno juega un papel importante en este proceso. El requerimiento del oxígeno en la formación de biofilm, puede entenderse cuando se trata de organismos aeróbicos, ya que es fácil pensar que si estos organismos requieren oxígeno para el funcionamiento de su metabolismo, entonces también lo requerirán para formar biofilm. Sin embargo, en *E. coli*, la formación de biofilm ocurre únicamente en presencia de oxígeno, hecho que resulta interesante dado que *E. coli* es un organismo facultativo, es decir, puede crecer en presencia de oxígeno y en ausencia de este, puede llevar a cabo la respiración anaeróbica utilizando aceptores de electrones alternos al oxígeno y aún en ausencia de estos últimos, puede realizar el metabolismo fermentativo (Böck y Sawers, 1996). Ahora bien, si *E. coli* cuenta con mecanismos que le permiten crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, ¿por qué la formación de biofilm en este organismo y bajo nuestras condiciones experimentales únicamente ocurre en condiciones de crecimiento aeróbico?. El objetivo general de este trabajo es analizar el papel del oxígeno en la formación de biofilms en *Escherichia coli*, analizando el papel de la respiración anaeróbica, el metabolismo fermentativo y el papel de señales extracelulares.

**FALTA
LAS PAGINAS**

30

A

31

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

Tabla 2.1. Cepas de *Escherichia coli*, bacteriófagos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Genotipo Relevante	Referencia o procedencia
BW21437	<i>DE3 Δ(lac)X74 rpoS (am) phoR68 (Oc) ΔcreABCD154 ΔackA</i>	Barry L. Wanner
BW21770	<i>DE3 Δ(lac)X74 ΔackA159 rpoS am</i>	Barry L. Wanner
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	Colección del laboratorio
DJ901	<i>ΔsoxRS zjc 2204::Tn10kan</i>	Greenberg <i>et al.</i> , 1990
GS08	<i>oxyR::kan</i>	Gisela Storz
JRG1728	<i>Δfnr Δlac Cam^R</i>	Jeff Green
KSA712	<i>CF7789 Δ(λ att-lom)::bla Φ(csrA'-lacZ)1 (hyb) Amp^R Kan^R</i>	Jackson <i>et al.</i> 2002
NH0758	<i>hns-651 trpB83::Tn10</i>	Falconi <i>et al.</i> , 1991
PC35	<i>arcA::kan</i>	Rob Gunsalus
RKP4545	<i>VJS676 hmp::Tn5</i>	Colección del laboratorio
TR1-5	<i>csrA::kan</i>	Jackson <i>et al.</i> 2002
UU1117	<i>(aer) DE1 thr (am)-1 leuB6 his-4 metF (am) 159 eda50 rpsL136 thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tox78/sibI</i>	John S. Parkinson
JMH0362	<i>XL1-Blue pSB20/aer</i>	John S. Parkinson
W3110	<i>F lam-In (rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	Colección del laboratorio
WG01	<i>W3110 rpoS::Tn10</i>	Carmen Gómez-Eichelmann
XL1-Blue	<i>F' supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyra46 thi relA1 lac</i>	Stratagene
ZK408	<i>flhC araD ΔlacU169 strA thi pyrC64 nsIA his</i>	Roberto Kolter
JMH0031	<i>MC4100 fis::kan</i>	Colección del laboratorio
JMH0299	W3110 mutante seleccionada por inserción de miniTn5 (Kan ^R) deficiente en nado	Este trabajo
JMH0300	W3110 mutante seleccionada por inserción de miniTn5 (Kan ^R) deficiente en nado	Este trabajo
JMH0301	W3110 mutante seleccionada por inserción de miniTn5 (Kan ^R) deficiente en nado	Este trabajo
JMH0302	W3110 mutante seleccionada por inserción de miniTn10 (Tet ^R) deficiente en nado	Este trabajo
JMH0314	W3110 mutante seleccionada por inserción de miniTn5 (Kan ^R) mutante supresora en nado de JMH0299	Este trabajo
JMH0345	W3110 <i>arcA::kan</i>	Este trabajo
JMH0346	W3110 <i>arcB::kan</i>	Este trabajo
JMH0349	W3110 <i>dpiB::kan</i>	Este trabajo
JMH0350	W3110 <i>fis::kan</i>	Este trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

JMH0351	W3110 <i>hmp::kan</i>	Este trabajo
JMH0352	W3110 <i>oxyR::kan</i>	Este trabajo
JMH0572	W3110 <i>hns-651 trpB83::Tn10</i>	Este trabajo
JMH0574	W3110 <i>pSB20/aer</i>	Este trabajo
JMH0576	W3110 <i>soxRS zjc 2204::Tn10kan</i>	Este trabajo
JMH0861	W3110 <i>pEGFP</i>	Este trabajo
JMH0908	XL1-blue <i>pUC18</i> contiene clonado el fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 7 kpb de la mutante JMH0314 y que incluye al <i>miniTn5</i>	Este trabajo

Bacteriófagos	Referencia
P_{1vir}	Miller, 1992
λ NK1105 (λ <i>miniTn5</i>)	Kleckner <i>et al.</i> , 1991
λ NK1098 (λ <i>miniTn10</i>)	Kleckner <i>et al.</i> , 1991

Oligonucleótidos	
M13 -21	5' TGTAACGACGGCCAGT 3'
M13 rev	5' TTCACACAGGAAACAG 3'

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.2. Métodos de cultivo

2.2.1. Medios de cultivo

Los medios líquidos se prepararon por disolución de los solutos indicados en agua destilada y posterior esterilización a 15 p.s.i. y 121°C por 20 min, cuando el medio estaba suplementado con MOPS (3-*N*-morfolino propano sulfonato), el tiempo de esterilización disminuyó a 15 min. Los medios sólidos se prepararon por adición de agar bacteriológico (DIFCO) 1.5% (w/v) a los medios líquidos y posterior esterilización bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Se utilizó medio LB (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%) para cultivos en medio líquido. Para los ensayos de formación de biofilm se usó medio LB suplementado con MOPS (3-*N*-morfolino propano sulfonato) 100 mM (O'Toole *et al.*, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b). El pH de los medios se ajustó a 7.0 antes de esterilizar.

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45 μm y adicionados al medio bajo condiciones de esterilidad a una temperatura del medio de cultivo menor a 50°C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200 $\mu\text{g/ml}$, cloramfenicol 25 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$. Cuando fue necesario, se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y X-gal 0.4% (w/v). Los agentes oxidantes se agregaron a los medios de cultivo a las siguientes concentraciones: Metil viológeno (Paraquat, PQ) 100 μM , H₂O₂ 0.01%.

2.2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 225 rpm con temperatura controlada. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en tubos de ensayo con tapa de rosca llenados al máximo volumen e incubados sin agitación. Los cultivos aeróbicos en medio sólido se crecieron en cajas de Petri, las condiciones de cultivo anaeróbico en medio sólido fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de formación de biofilm. Para los ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación, los cultivos aeróbicos se incubaron sin agitación y las incubaciones anaeróbicas se llevaron a cabo en jarras de anaerobiosis, utilizando el sistema anaeróbico GasPak™ (BBL Microbiology Systems), que genera una atmósfera compuesta por hidrógeno y dióxido de carbono. Cuando se realizaron incubaciones bajo concentraciones controladas de oxígeno, se utilizó una cámara de microaerofilia MACS-VA500 *microaerophilic work station* (DW Scientific) con la siguiente mezcla de gases: nitrógeno 80%, dióxido de carbono 10% y oxígeno 10%. Todos los cultivos se incubaron a 37°C, a menos que se indique lo contrario.

Para ensayos de formación de biofilm en presencia de aceptores de electrones alternos al oxígeno o productos de fermentación, éstos se adicionaron al medio LB MOPS 100 mM pH 7.0 a las siguientes concentraciones finales: nitrato 40 mM, nitrito 5 mM, DMSO-molibdato 40 mM, 0.1 mM o fumarato 40 mM y acetato 0.2%, succinato

0.4%, etanol 2.0%, formiato 2.0% o lactato 0.4%. Todos los reactivos fueron esterilizados por filtración.

El crecimiento fue determinado midiendo la DO a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech™), para ello, se utilizaron cubetas de plástico desechables de 1 ml, diluyendo 10 ó 100 veces la concentración del cultivo.

2.3. Métodos genéticos

2.3.1. Transformación

Mediante el proceso de transformación se puede introducir DNA plasmídico en células competentes, es decir, células que han sido sometidas a un tratamiento por medio del cual la membrana es permeabilizada y permite el paso del DNA presente en el medio al interior de la bacteria. El protocolo que se siguió esta basado en el método de transformación por CaCl_2 , descrito en Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001) y que a continuación se detalla.

2.3.1.1. Preparación de células competentes

- 1) Crecer un cultivo a saturación a 37°C, 225 rpm en medio LB.
- 2) Diluir el cultivo 1:100 en 20 ml de LB e incubar a 37°C, 225 rpm por 2 h.
- 3) Transferir a un tubo Falcon de 50 ml y centrifugar por 10 min a 3000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 4) Resuspender el pellet celular en 20 ml de CaCl_2 100 mM frío e incubar en hielo por 45 min.
- 5) Centrifugar por 10 min a 3000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 6) Resuspender en 1 ml de CaCl_2 100 mM frío.

2.3.1.2. Transformación de células competentes

- 1) Mezclar 100 μ l de células competentes con 2 μ l de DNA.
- 2) Incubar en hielo por 1 h.
- 3) Incubar a 43°C por 90 seg.
- 4) Agregar 1 ml de LB e incubar a 37°C, 225 rpm por 1.5 h.
- 5) Centrifugar por 3 min a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
- 6) Resuspender el pellet en 80 μ l de MgSO₄ 10 mM.
- 7) Platear en medio selectivo.

2.3.2. Transducción generalizada mediante fago P_{1vir}

La transducción es un proceso por el cual se transfiere material genético de una cepa a otra utilizando como vehiculo de entrega a bacteriófagos. En este trabajo se utilizó el bacteriófago P_{1vir} que es una variedad del fago P₁ que no puede formar lisógenos.

2.3.2.1. Preparación de lisados

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa donadora a 37°C, 225 rpm en medio LB suplementado con CaCl₂ 5 mM más el antibiótico correspondiente.
- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial de MgSO₄ 10 mM.
- 4) Mezclar 200 μ l de células con 200 μ l de bacteriófago P_{1vir}, usar como control células sin fago.
- 5) Incubar a 37°C sin agitación por 20 min.
- 6) Agregar 2-3 ml de LB suplementado con CaCl₂ 5 mM y agitar con vortex.
- 7) Incubar a 37°C, 225 rpm por 2-4 h, hasta observar que el cultivo con fagos se clarifica mientras que el cultivo control llega a saturación.
- 8) Remover los restos celulares por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

- 9) Repetir el paso 8.
- 10) Adicionar al sobrenadante 2 gotas de cloroformo y agitar con vortex. Almacenar los lisados a 4°C.

2.3.2.2. Transducción al genoma

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa receptora a 37°C, 225 rpm en medio LB suplementado con CaCl₂ 5 mM más el antibiótico correspondiente.
- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial de MgSO₄ 10 mM.
- 4) Diluir los lisados obtenidos con el protocolo 2.3.2.1. a diferentes diluciones de 10⁰ a 10⁻⁴, en MgSO₄ 10 mM.
- 5) Mezclar 100 µl de células con 100 µl del lisado a diferentes diluciones.
- 6) Utilizar como controles muestras de sólo células y sólo fagos, para observar que las células receptoras no sean resistentes a antibiótico y que los lisados no contengan células.
- 7) Incubar a 37°C por 20 min.
- 8) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 9) Resuspender en LB, repetir paso 8.
- 10) Repetir el paso 9.
- 11) Agregar 1 ml de LB e incubar a 37°C, 225 rpm por 1-2 h.
- 12) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 13) Resuspender el pellet en 80 µl de MgSO₄ 10 mM.
- 14) Platear en medio selectivo.

2.3.3. Mutagénesis

2.3.3.1. Mutagénesis por inserción de un elemento transponible

Uno de los métodos más utilizados en genética molecular en la obtención de mutantes es la mutagénesis mediante el uso de elementos transponibles que se

insertan al azar en el cromosoma, ocasionando generalmente, la pérdida total de la función del gen en el cual se insertaron. En este trabajo se utilizaron los transposones mini-Tn5 (λ NK1105) y mini-Tn10 (λ NK1098) que confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente. El método que se siguió se basa en el protocolo descrito por Kleckner y colaboradores (Kleckner *et al.*, 1991). La selección de mutantes se llevó a cabo aeróbica y anaeróbicamente y la detección del fenotipo de las mutantes se realizó mediante ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación (Protocolo 2.5.)

2.3.3.1.1. Preparación del lisado con fago λ

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa C600 (ésta contiene una mutación en el supresor *supE* que permite insertar glutamina en los codones de término tipo ámbar) a 37°C, 225 rpm en medio LB.
- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM.
- 3) Mezclar 50 μ l de células con 50 μ l del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.
- 5) Agregar 2 ml de LB MgSO₄ 10 mM precalentado a 37°C.
- 6) Incubar de 2-4 h a 37°C, 225 rpm
- 7) Una vez que el cultivo se lise agregar 2 gotas de cloroformo.
- 8) Colectar los restos celulares por centrifugación.
- 9) Remover el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo, agregar 2 gotas de cloroformo.
- 10) Almacenar el lisado a 4°C

2.3.3.1.2. Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa W3110 a 37°C, 225 rpm en medio LB.

- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO_4 10 mM y CaCl_2 5 mM.
- 3) Mezclar 100 μl de células con 100 μl del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.
- 5) Agregar 1-2 ml de LB MgSO_4 10 mM.
- 6) Incubar a 37°C sin agitación por 1 h.
- 7) Platear diluciones seriales en medio selectivo.
- 8) Incubar a 37°C.

2.3.3.2. Mutagénesis mediante agentes químicos

A diferencia de la mutagénesis por inserción de transposones, la mutagénesis mediante el uso de agentes químicos causa sustituciones de bases. El MNNG (*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina) es un agente alquilante que al metilar la posición O^6 de la guanina permite su apareamiento con timina, causando transiciones G:C \rightarrow A:T. Para esta mutagénesis se usó el protocolo descrito por Miller (Miller, 1992). Para la detección de mutantes se siguió el protocolo para ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación (Protocolo 2.5.)

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa W3110 a 37°C, 225 rpm en medio LB.
- 2) Diluir en cultivo 1:50 en LB e incubar a 37°C sin agitación por 2 h.
- 3) Incubar a 37°C, 225 rpm por 1.5-2 h.
- 4) Centrifugar a 3,000 rpm por 5 min.
- 5) Lavar el pellet con un volumen igual al cultivo original de solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 5.5 (Ácido cítrico 9.6 g, NaOH 4.4 g, aforar a 500 ml con H_2O . Ajustar pH a 5.5 con NaOH 10 N y esterilizar por autoclave) y centrifugar a 3,000 rpm por 5 min.
- 6) Repetir el paso 5.
- 7) Resuspender en 2.5 ml de solución amortiguadora de citratos.

- 8) Agregar 1:20 v/v de una solución MNNG 1 mg/ml y agregar el mismo volumen de solución amortiguadora de citratos a la muestra control.
- 9) Agitar con vortex.
- 10) Incubar durante 5, 10, 15, 30 y 45 min a 37°C agitando continuamente.
- 11) Centrifugar a 3,000 rpm por 5 min.
- 12) Lavar el pellet 2 veces con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.0 (KH₂PO₄ 6.8 g, NaOH 1.16 g, aforar a 500 ml con H₂O. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 2 N y esterilizar por autoclave).
- 13) Centrifugar a 3,000 rpm por 5 min y resuspender en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos.
- 14) Platear cada muestra en medio sólido LB a diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁵ para las células tratadas con MNNG y 10⁻⁵ y 10⁻⁶ para las células control.

Preparación de MNNG

- 1) Pesar un tubo de microcentrifuga.
- 2) Colocar una pequeña cantidad de MNNG dentro del tubo, bajo una campana de extracción.
- 3) Pesar nuevamente el tubo de microcentrifuga que contiene el MNNG y calcular la cantidad del reactivo.
- 4) Diluir en el volumen de acetona necesario para crear una solución stock de 10 mg/ml.
- 5) Diluir la solución stock 1:10 v/v en solución amortiguadora de citratos para crear una solución de trabajo 1 mg/ml.

2.4. Métodos bioquímicos

2.4.1. Determinación de la actividad de β-galactosidasa

Una de los genes reporteros más utilizados en estudios sobre regulación genética, es el gen *lacZ* que codifica la enzima β-galactosidasa. El sustrato de esta

enzima es la lactosa, pero también puede actuar sobre análogos de esta molécula, uno de ellos es el cromóforo *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), cuya hidrólisis puede detectarse mediante una reacción colorimétrica midiendo absorbancia a 420 nm. Para monitorear la actividad de un gen, se pueden construir fusiones uniendo la región promotora del gen de interés con la región codificante del operón *lacZ* y midiendo la expresión del gen de interés mediante la actividad de la β-galactosidasa.

Para calcular la actividad de β-galactosidasa se usa la fórmula de Miller (1992):

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 [DO_{420\text{nm}} - (1.75 \cdot DO_{550\text{nm}})]}{t \cdot v \cdot DO_{600\text{nm}}}$$

$DO_{600\text{nm}}$ = Densidad óptica de la suspensión celular.

$DO_{420\text{nm}}$ y $DO_{550\text{nm}}$ son las medidas de absorbancia.

t = Tiempo de reacción (min)

v = Volumen del cultivo celular usado (ml)

La $DO_{420\text{nm}}$ mide la absorbancia debida a la hidrólisis de ONPG; mientras que la $DO_{550\text{nm}}$ mide la dispersión de la luz debida a los restos celulares y la turbidez. Para estos experimentos se usó un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech™).

El ensayo de β-galactosidasa se llevó a cabo como se describe por Miller (Miller, 1992) y se realizó por triplicado para cada muestra.

- 1) Medir la $DO_{600\text{nm}}$ de la muestra.
- 2) Emplear 30, 50 y 100 μl de cada muestra y aforar a 1 ml con solución amortiguadora Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, β – mercaptoetanol 50 mM).

- 3) Ajustar pH a 7.0. Adicionalmente, emplear una muestra sin células que recibirá el mismo tratamiento que los tubos con células y que será el control del experimento.
- 4) Permeabilizar las células previamente resuspendidas en solución amortiguadora Z agregando 40 μl de cloroformo y 20 μl de SDS al 0.1 %, mezclar con vortex durante 10 seg.
- 5) Incubar a TA por 10 min.
- 6) Agregar 200 μl de ONPG (0.4% en solución amortiguadora Z) a cada tubo, a intervalos de 30 seg, mezclar con vortex durante 10 seg (mismo tiempo y velocidad para cada tubo).
- 7) Incubar a TA hasta que la mezcla del ensayo, inicialmente incoloro, cambie a amarillo por la hidrólisis del ONPG.
- 8) Agregar 500 μl de una solución Na_2CO_3 1 M a intervalos de 30 seg, para detener la hidrólisis del ONPG.
- 9) Registrar el tiempo de reacción para cada muestra. Medir la absorbancia a 420nm y 550nm.

2.5. Ensayos de formación de biofilm

2.5.1. Condiciones de Crecimiento

Para los ensayos de formación de biofilm se utilizó el método descrito por O'Toole y Kolter con ciertas modificaciones (O'Toole *et al.*, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b).

- 1) Diluir un cultivo saturado de la cepa W3110 a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.1 en LB suplementado con MOPS 100 mM pH 7.0.
- 2) Inocular 150 μl por pozo en placas de cloruro de polivinilo (PVC, 96-well *vynil assay plates*: Costar, Cambridge MA)
- 3) Incubar a 37°C en presencia o ausencia de oxígeno. Cubrir las placas de microtitulación con cajas plásticas para prevenir la evaporación.

2.5.2. Detección y cuantificación del biofilm mediante tinción con cristal violeta

- 1) Después del tiempo de incubación indicado, lavar los pozos 3 veces con agua para remover las células que no se adhirieron.
- 2) Detectar el biofilm formado mediante una tinción con cristal violeta al 1.0% e incubar por 20 min.
- 3) Lavar los pozos con H₂O para remover el cristal violeta no adherido a superficies bióticas.
- 4) Cuantificar la cantidad de biofilm formado eluyendo el colorante en cada pozo con 200 μ l de una solución 80% etanol 20% acetona e incubando por 20 min a 4°C.
- 5) Medir la absorbancia a 590nm. La cantidad de biofilm formado se reportó en unidades arbitrarias (U.A.), una U.A. corresponde a la absorbancia medida para el control usado.

2.5.3. Detección del biofilm por Microscopia confocal

La proteína verde fluorescente es otra de las moléculas reporteras que se han utilizado para monitorear la expresión de ciertos genes. Asimismo, su uso se ha extendido en análisis de formación de biofilms mediante microscopia láser confocal (Skillman *et al.*, 1998); (Hentzer *et al.*, 2001) Para realizar este ensayo se transformó la cepa W3110 con el plásmido pEGFP (CLONTECH) mediante el protocolo de transformación descrito anteriormente (2.3.1.) El plásmido pEGFP contiene clonado un gen que codifica una proteína fluorescente modificada que emite luz verde a 507 nm. Las muestras se observaron con un microscopio Nikon Eclipse E600. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon EH-21 Coolpix 995.

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa W3110 pEGFP en LB MOPS 100 mM pH 7.0 con ampicilina a una concentración final de 250 μ g/ml.
- 2) Diluir en medio fresco suplementado con glucosa al 0.2% y ampicilina a una DO_{600nm} de 0.1 e incubar en presencia de IPTG 200 mM.

- 3) Inocular placas de microtitulación para realizar un ensayo de formación de biofilm, como se indica en el Protocolo 2.5.1.
- 4) Lavar los pozos con PBS 1x (Na_2HPO_4 72 mM, NaH_2PO_4 28 mM, NaCl 126 mM. Ajustar pH a 7.2) pasado el tiempo de incubación.
- 5) Fijar las muestras con paraformaldehído 0.4% en PBS por 10 min.
- 6) Lavar con PBS 1x.
- 7) Montar las muestras en laminillas usando líquido de montaje para fluorescencia (DAKO).
- 8) Observar en un microscopio de fluorescencia.

2.5.4. Obtención de células y sobrenadantes

Cuando se requirió mezclar células y sobrenadantes de cultivos en medio LB suplementado con MOPS 100 mM pH 7.0, provenientes de una incubación aeróbica o anaeróbica para los ensayos de formación de biofilm, se realizó el siguiente procedimiento. Las células y sobrenadantes se utilizaron inmediatamente después de ser obtenidos.

- 1) Inocular placas de microtitulación con un cultivo de *Escherichia coli* W3110 (como se describe en 2.5.1.) e incubar aeróbicamente por 24 h o anaeróbicamente por 48 h.
- 2) Colectar el cultivo de varios pozos (aeróbicos y anaeróbicos por separados) en tubos para microcentrifuga y centrifugar a 13,000 rpm por 5 min.
- 3) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 4) Resuspender las células en 1/15 del volumen original de MgSO_4 10 mM.

2.5.4.1. Mezclas de células y sobrenadantes

- 1) Mezclar 10 μl de células resuspendidas en MgSO_4 10 mM, con 140 μl de sobrenadante o medio nuevo (como se indica en cada experimento).
- 2) Inocular placas de microtitulación (150 μl por pozo).

- 3) Incubar aeróbicamente por 24 h o anaeróbicamente por 48 h a 37°C.

2.6. Curvas de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento a lo largo del proceso de formación de biofilm en condiciones aeróbicas se tomaron muestras de un cultivo inoculado en un matraz Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz, éste se incubó aeróbicamente a 37°C sin agitación. El monitoreo del crecimiento bajo condiciones anaeróbicas se realizó tomando muestras de un cultivo inoculado en un tubo con tapa de rosca llenado al máximo volumen. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la DO_{600nm} en un espectro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech™).

2.7. Ensayos de nado

Los ensayos de nado se llevaron a cabo en placas de agar suave (agar, 0.3%; triptona, 1.3% y NaCl, 0.7%). En algunos experimentos las placas fueron suplementadas con glucosa 0.2%. Se utilizó un cultivo saturado de la cepa a analizar, se inocularon 2 μ l del cultivo en una placa de agar suave y se incubó por 4 h aeróbicamente o por 8 h anaeróbicamente a 30°C. Las células que nadan forman un halo alrededor del punto de inoculación.

2.8. Manipulación y análisis de DNA

2.8.1. Obtención de DNA genómico

La purificación del DNA genómico se llevó a cabo siguiendo el método de extracción por fenol-cloroformo, como se describe a continuación:

- 1) Inocular un cultivo de la cepa requerida en 50 ml de LB e incubar a 37°C con agitación.

- 2) Colectar las células a una DO_{600nm} de 0.8 a 1.0.
- 3) Resuspender en 10 ml de solución amortiguadora TE (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
- 4) Adicionar 10 mg de lisozima e incubar 15 min a 30°C.
- 5) Adicionar 1 ml de SDS al 20%, mezclar por 15 seg usando una pipeta. La solución se verá viscosa.
- 6) Adicionar 10 ml de fenol (saturado con solución amortiguadora TE; tomar la fase oleosa) y 1.5 ml de NaCl 5 M. Invertir el tubo rápidamente a TA por 20 min.
- 7) Separar las fases por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.
- 8) Remover la fase superior con una pipeta despuntada y transferirla a un tubo limpio.
- 9) Adicionar 1 volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) y mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
- 10) Repetir los pasos 7 y 8.
- 11) Adicionar 1 volumen de cloroformo y mezclar invirtiendo durante 10 min.
- 12) Repetir los pasos 7 y 8.
- 13) Adicionar 1 volumen de isopropanol (agregar el isopropanol de tal manera que escurra por las paredes del tubo, se forman dos fases)
- 14) Mezclar suavemente la interfase utilizando una varilla de vidrio para recoger el DNA en forma de fibras.
- 15) Lavar el DNA en etanol 70% frío.
- 16) Secar el DNA a TA.
- 17) Resuspender el DNA en 1 ml de TE, hasta disolver totalmente.
- 18) Adicionar RNasa a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ e incubar a 50°C por 1 h.
- 19) Adicionar Proteinasa K a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Incubar a 37°C por 1 h.
- 20) Adicionar TE para ajustar el volumen a 5 ml.
- 21) Adicionar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1). Mezclar invirtiendo por 10 min.
- 22) Centrifugar y recuperar la fase superior.

- 23) Adicionar 1 volumen de cloroformo. Mezclar invirtiendo por 10 min.
- 24) Centrifugar y recuperar la fase superior.
- 25) Repetir los pasos 13, 14, 15, 16 y 17.
- 26) DNA listo para corte enzimático.

2.8.2. Obtención de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó usando el Estuche de purificación de DNA de QIAGEN™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el protocolo "*QIAprep Spin Miniprep Kit*", que permite la purificación de más de 20 µg de DNA plasmídico.

El protocolo se basa en la lisis de las células bajo condiciones alcalinas (NaOH, SDS). El SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteínicos de la membrana celular, permitiendo la lisis y liberación del contenido celular. El NaOH desnaturaliza tanto el DNA cromosomal y plasmídico, como las proteínas. El tiempo óptimo de lisis permite la máxima liberación del DNA plasmídico de la célula sin permitir la salida del DNA cromosomal, minimizando a su vez la exposición del plásmido a una desnaturalización irreversible. El RNA se degrada por acción de la RNasa A. Las proteínas, el DNA cromosomal y los restos celulares son precipitados debido a la alta concentración de sales. El DNA plasmídico es adsorbido en una columna de resina de intercambio aniónico, constituida por Dietilaminoetanol (DEAE), en condiciones ácidas la resina se carga positivamente e interacciona con los grupos fosfatos del DNA, a través de interacciones electrostáticas, las endonucleasas y sales son removidas mediante lavados. El DNA se eluye a pH básico (8.5).

- 1) Colectar un cultivo saturado por centrifugación. Resuspender las células en 250 µl de solución amortiguadora P1 (RNasa A 100 µg/ml, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) hasta obtener una solución homogénea.

- 2) Agregar 250 μ l de solución amortiguadora P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) a la suspensión celular, mezclar invirtiendo el tubo hasta obtener una solución viscosa y clara.
- 3) Agregar 350 μ l de solución amortiguadora N3 (CH_3COOK 3.0 M pH 5.5), mezclar invirtiendo el tubo.
- 4) Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm.
- 5) Transferir el sobrenadante a una columna QIAprep.
- 6) Centrifugar de 30 a 60 seg y descartar el flujo.
- 7) Lavar la columna agregando 500 μ l de solución amortiguadora PB y centrifugando de 30 a 60 seg. Descartar el flujo.
- 8) Lavar la columna agregando 750 μ l de solución amortiguadora PE (80% etanol) y centrifugando de 30 a 60 seg.
- 9) Descartar el flujo y centrifugar por 1 min adicional para remover residuos de la solución amortiguadora de lavado.
- 10) Colocar una columna QIAprep en un tubo de microcentrifuga limpio. Para eluir añadir 50 μ l de solución amortiguadora EB (Tris-Cl 10 mM pH 8.5) o H_2O al centro de la columna, incubar por 1 min y centrifugar por 1 min.
- 11) Almacenar los plásmidos obtenidos a -20 °C.

2.8.3. Manipulación enzimática del DNA

2.8.3.1. Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas a partir de levaduras o bacterias, estas cortan el DNA de cadena doble mediante la hidrólisis de enlaces fosfodiéster, generando extremos 3'-OH y 5'-fosfato. La secuencia de reconocimiento generalmente es palindrómica y varía en tamaño de acuerdo a la enzima utilizada. Si el sitio de corte coincide en ambas cadenas, se generan extremos romos, mientras que si el sitio de corte no coincide en ambas cadenas se generan extremos cohesivos.

Dado que los sitios de restricción en una molécula de DNA son constantes, se puede obtener un patrón de restricción definido. Esto permite obtener mapas de restricción característicos de cada molécula. El uso de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo, se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de digestión se purificaron siguiendo el protocolo de Purificación de productos de PCR de QIAGEN™ "*QIAquick PCR Purification Kit*".

2.8.3.2. DNA Ligasa del bacteriófago T4

En este trabajo se utilizó la DNA Ligasa del bacteriófago T4, esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3'-OH y 5'-fosfato. Para la unión de extremos cohesivos, se requiere que estos se hayan generado por la misma enzima. La enzima se utilizó siguiendo el protocolo del fabricante.

2.8.4. Análisis de DNA por hibridación tipo *Southern*

El DNA es digerido y los fragmentos son separados por tamaño en un gel de agarosa. El DNA es desnaturalizado y transferido del gel a una membrana de nylon. Una vez en la membrana, el DNA se hibrida a una sonda acoplada a un sistema de detección. La sonda es una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia en el DNA cromosomal.

Se siguió el protocolo descrito por la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech™ y se usó el estuche "*ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system*", que se basa en un ensayo de quimioluminiscencia. El protocolo se detalla a continuación.

2.8.4.1. Procesamiento del gel de agarosa

Previo digestión del DNA de la muestra a analizar y separación de los fragmentos en un gel de agarosa por electroforesis (Protocolo 2.8.6.1.) se toma una

fotografía del gel usando un transiluminador de luz UV, colocando una regla fluorescente a lo largo del gel, de manera que el cm 0 coincida con el inicio de los pozos.

- 1) Colocar el gel en un recipiente y cubrirlo con solución depurinizadora (HCl 250 mM).
- 2) Incubar en agitación de 10 a 12 min, hasta que el azul de bromofenol del frente de corrida torne a amarillo.
- 3) Decantar la solución depurinizadora y enjuagar el gel con agua bidestilada.
- 4) Cubrir el gel con solución desnaturalizadora (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) e incubar en agitación por 25 min hasta que el azul de bromofenol torne a azul.
- 5) Decantar la solución y enjuagar con agua bidestilada.
- 6) Cubrir con solución neutralizadora (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, ajustar pH a 7.5) y agitar. Si se usa la membrana Hybond™ N⁺, agitar por 30 min.

2.8.4.2. Transferencia de DNA a la membrana

- 1) Montar un dispositivo como se indica en la Fig. 2.1. Usar pinzas y guantes al manipular la membrana. Evitar que se formen burbujas entre la membrana de nitrocelulosa y el gel. Usar solución amortiguadora SSC 20x (Citrato Na₃ 0.3 M, NaCl 3 M, pH 7.0) Incubar de 12-15 h.
- 2) Desmantelar el dispositivo y remover la membrana y el gel juntos. Marcar los carriles en la membrana y colocarla sobre papel Whatman™ 3MM.
- 3) Observar el gel con el transiluminador para verificar que el DNA ha sido transferido.
- 4) Colocar la membrana sobre una hoja de papel Whatman™ 3MM (con la cara que contiene el DNA hacia arriba), fijar el DNA a la membrana con luz UV a 120 mJ (UV1800 Stratallinker, Stratagene™).
- 5) Preparar la solución amortiguadora de hibridación (*ECL™ Gold Hybridization Buffer*, preparar siguiendo instrucciones del fabricante), se requieren 0.25 ml

por cada cm^2 de la base del recipiente en el que se llevará a cabo la hibridación.

- 6) Incubar la membrana con solución amortiguadora de hibridación (previamente calentado a 42°C) por 1 h a 42°C .

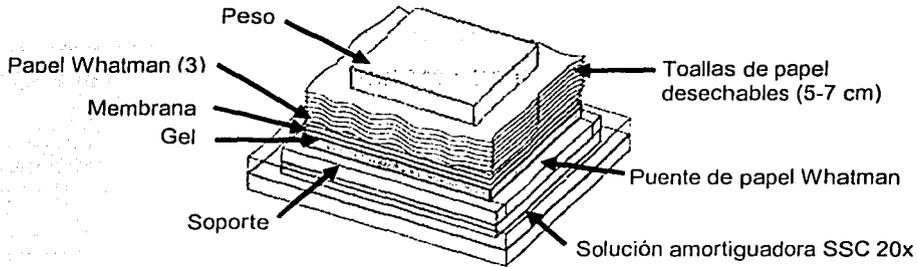


Fig. 2.1. Transferencia de DNA a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad.

2.8.4.3. Marcado de la sonda

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El DNA que fue utilizado como sonda, se obtuvo mediante digestión del plásmido pUC4K que contiene un cassette de kanamicina entre los sitios de restricción de la enzima *Bam*HI, o mediante amplificación del fragmento requerido. Los fragmentos de DNA fueron purificados mediante "QIAquick™ PCR Purification Kit" (Protocolo 2.8.6.2.).

- 1) Ajustar la concentración del DNA usado como sonda a $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$.
- 2) Desnaturalizar 100 ng de DNA por calentamiento a 100°C en un baño de agua hirviendo por 5 min.
- 3) Incubar en hielo inmediatamente por 5 min y centrifugar por 10 seg para coleccionar todo el contenido en el fondo del tubo
- 4) Agregar 1 volumen del agente de marcaje (estuche ECL, este contiene peroxidasa en complejos con carga positiva). Resuspender con micropipeta y centrifugar por 10 seg.

- 5) Agregar la mitad del volumen de solución glutaraldehído, mezclar y centrifugar para colectar el contenido. De esta forma la proporción DNA:agente de marcaje:glutaraldehído es 1:1:1.
- 6) Incubar 10 min a 37°C. Cuando se usan ácidos nucleicos menores a 300 pb, el tiempo de incubación debe aumentarse a 20 min.
- 7) Usar de inmediato o incubar en hielo por máximo 15 min.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.8.4.4. Hibridación y lavado de la membrana

- 1) Agregar la prueba marcada por las paredes del recipiente en el que se colocó la membrana con la solución amortiguadora de hibridación. No añadir la sonda directamente sobre la membrana. Incubar a 42°C toda la noche.
- 2) Precalear la solución amortiguadora primario de lavado a 55°C (SDS 0.4%, SSC 0.5x).
- 3) Colocar las membranas en un recipiente con solución amortiguadora primaria de lavado en un volumen de 2-5 ml/cm² de la membrana.
- 4) Incubar por no más de 10 min a 55°C.
- 5) Retirar la solución amortiguadora y repetir el lavado.
- 6) Colocar la membrana en un contenedor limpio y agregar solución amortiguadora secundaria de lavado en exceso (SSC 2x).
- 7) Incubar 5 min a TA. Retirar la solución amortiguadora y repetir el lavado.

2.8.4.5. Generación y detección de la señal luminosa

- 1) Mezclar volúmenes iguales del reactivo de detección 1 (contiene peróxido) con el reactivo de detección 2 (luminol) en suficiente volumen para cubrir la membrana (aprox. 0.125 ml/cm²). Preparar al momento.
- 2) Eliminar el exceso de solución amortiguadora secundaria en la membrana con papel Whatman™ 3MM.
- 3) Colocar la membrana en un recipiente limpio, manteniendo la cara que contiene el DNA hacia arriba.

- 4) Agregar el reactivo de detección directamente sobre la membrana e incubar por 1 min a TA. La reacción que ocurre al mezclar los agentes de detección ocasiona la reducción de peróxido por peroxidasa, la cual provoca la oxidación del luminol y consecuentemente la producción de luz azul.
- 5) Colocar la membrana escurrida entre 2 acetatos al tamaño del cassette de autoradiografía utilizado, con la cara que contiene el DNA hacia arriba. Trabajar tan rápido como sea posible.
- 6) Colocar una película autoradiográfica sobre los acetatos que contienen la membrana en un cuarto oscuro. Se usó la película Hyperfilm-ECL™ que es sensible a luz azul.
- 7) Incubar toda la noche y revelar.

2.8.4.6. Revelado de película autoradiográfica

Las soluciones de revelado y fijadora KODAK™ se usaron bajo las instrucciones del fabricante.

- 1) Colocar la película en un recipiente con solución reveladora e incubar hasta que comiencen a aparecer bandas oscuras, agitar durante la incubación.
- 2) Lavar la película con agua.
- 3) Incubar en solución fijadora por 5 min.

2.8.5. Secuenciación del DNA.

Se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Empleando el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems, basado en un sistema automatizado de electroforesis capilar, con una capacidad de lectura de 400-600 pb. Para este proceso se utilizaron los oligonucleótidos M13 -21 y M13 Rev, cuya secuencia se describen en la Tabla 2.1.

2.8.6. Resolución y purificación de fragmentos de DNA

2.8.6.1. Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método que permite la separación de fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño. La detección del DNA se realizó por visualización con bromuro de etidio, que es una molécula plana que se intercala entre las bases del DNA y que emite fluorescencia al ser irradiada con luz UV. El peso molecular de los fragmentos analizados se determinó por comparación con un marcador de fragmentos de DNA con pesos conocidos. Se utilizó el marcador de 1 kb de Invitrogen™ que contiene 12 fragmentos que van de 1,018 a 12,216 pb.

- 1) Pesar la agarosa necesaria para obtener una concentración final de 1%.
- 2) Disolver la agarosa por calor en solución amortiguadora TBE 1x (Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM pH 8.3).
- 3) Añadir la agarosa disuelta a un conformador de geles sin olvidar colocar el peine para formar los pozos en el gel. Permitir que gelifique.
- 4) Preparar las muestras de DNA diluyendo en H₂O y solución amortiguadora de carga 6x (EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y glicerol 30% en agua destilada) a una concentración final 1x.
- 5) Montar el gel en la cámara de electroforesis (sistema de Bio-Rad subcell GT™) utilizando solución amortiguadora TBE 1 x.
- 6) Realizar la electroforesis a un voltaje constante (100 V por 45 min)
- 7) Teñir el gel en una solución de bromuro de etidio 5 µg/ ml.
- 8) Observar la separación de los fragmentos de DNA en el gel utilizando un transiluminador (Hofer).
- 9) Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital DC290 ZOOM (KODAK) y se manipularon con el programa 1D versión 3.5.4.

2.8.6.2. Purificación de fragmentos de DNA en solución

Para limpiar los fragmentos de DNA o plásmidos digeridos de enzimas y otros reactivos que pudiesen afectar pasos subsecuentes en su manipulación, los productos de digestión fueron purificados mediante el "QIAquick™ PCR Purification Kit". Este protocolo se basa en la purificación de fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble, provenientes de reacciones de PCR u otras reacciones enzimáticas. Mediante este método se puede purificar fragmentos de 100 pb a 10 kb por adsorción a una resina a cierta concentración de sales y pH. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

- 1) Agregar 5 volúmenes de solución amortiguadora PB a 1 volumen de la muestra de PCR o producto de digestión y mezclar.
- 2) Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
- 3) Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar de 30 a 60 seg, para unir el DNA.
- 4) Descartar el flujo. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
- 5) Lavar la columna con 750 µl de solución amortiguadora PE y centrifugar de 30 a 60 seg.
- 6) Descartar el flujo, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
- 7) Colocar la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio.
- 8) Para eluir, agregar 50 µl de solución amortiguadora EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) o H₂O al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

2.8.6.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa

Este proceso se llevó a cabo usando el estuche comercial "QIAquick™ Gel Extraction Kit" de QIAGEN. El método se basa en el mismo principio que el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en solución. Este protocolo esta diseñado para extraer y purificar DNA de 70 pb a 10 kb.

- 1) Tomar el fragmento de DNA del gel de agarosa utilizando una espátula.
- 2) Pesar el fragmento de agarosa en un tubo de centrifuga. Agregar 3 volúmenes de solución amortiguadora QG a 1 volumen del gel (100 mg ~ 100 μ l)
- 3) Incubar a 50°C por 10 min (hasta que el gel se haya disuelto por completo). Para facilitar el proceso mezclar con vortex cada 2 o 3 min durante la incubación.
- 4) Una vez que el gel se disuelva por completo, verificar que el color de la mezcla sea amarillo (similar a la solución amortiguadora QG sin agarosa disuelta).
- 5) Agregar el mismo volumen que el peso del gel de isopropanol y mezclar.
- 6) Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección.
- 7) Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min, para unir el DNA.
- 8) Descartar el flujo. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
- 9) Lavar la columna con 500 μ l de solución amortiguadora QG y centrifugar por 1 min.
- 10) Lavar la columna con 750 μ l de solución amortiguadora PE y centrifugar por 1 min.
- 11) Descartar el flujo, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
- 12) Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
- 13) Para eluir, agregar 50 μ l de solución amortiguadora EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) o H₂O al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

**FALTA
LAS PAGINAS**

58

A

59

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. Crecimiento de la cepa W3110 bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas

En secciones anteriores de este trabajo se reportó que estudios sobre la formación de biofilm en *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* han mostrado que éste se forma como un anillo en la interfase aire-medio o neuston (O'Toole *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001); estos datos sugieren un posible papel del oxígeno en este proceso. En *E. coli* W3110, la formación de biofilm sigue el mismo patrón bajo nuestras condiciones experimentales, por lo que el primer paso en la realización de este proyecto fue determinar la cinética de formación de biofilm de *E. coli* bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

3.1.1. Cinética de formación de biofilm en aerobiosis o anaerobiosis

Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describe en material y métodos, se utilizó un cultivo de la cepa *E. coli* W3110 en medio LB suplementado con MOPS 100 mM pH 7.0 y se inocularon placas de microtitulación que se incubaron a 37°C bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La detección del biofilm se llevó a cabo mediante tinción con cristal violeta y la cantidad del biofilm formado se cuantificó eluyendo el colorante con una solución 80% etanol 20% acetona. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm del colorante eluido al tiempo 0. Los datos obtenidos se muestran en la Fig. 3.1.

Como se puede observar en el panel A, en condiciones aeróbicas el biofilm se forma como un anillo alrededor de la interfase aire-medio; estos resultados concuerdan con estudios previos (O'Toole *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001).

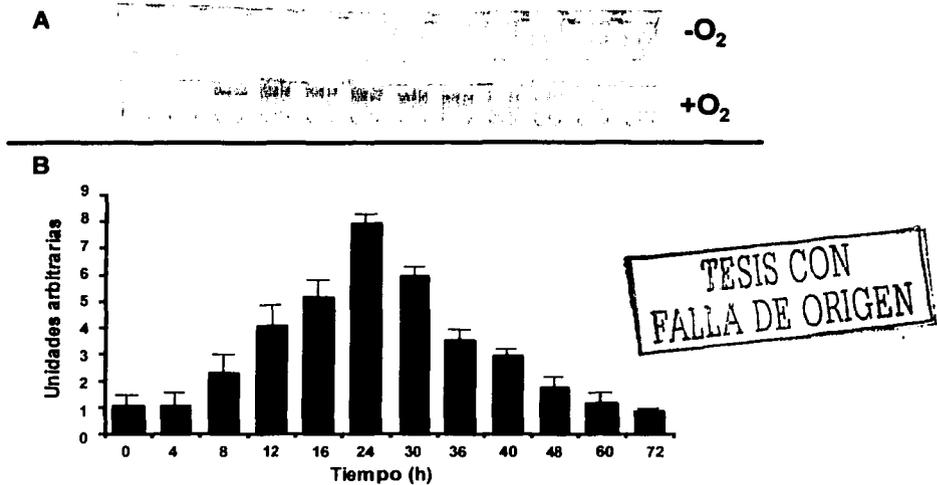


Fig. 3.1. Formación de biofilm en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. A) Formación de biofilm a lo largo de la curva de crecimiento bajo condiciones aeróbicas ($+O_2$) o anaeróbicas ($-O_2$). B) Cuantificación del biofilm formado en condiciones aeróbicas. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia medida a 590 nm en el pozo correspondiente al tiempo 0.

Posiblemente, estos resultados indican que el metabolismo de las células que están en mayor contacto con el aire, permite la formación de biofilm y pese a que la incubación es bajo condiciones aeróbicas, probablemente la aereación no alcanza el fondo del pozo y por ello las células no se adhieren a la superficie bajo la interfase. La cuantificación del biofilm aeróbico (panel B) muestra que éste es un proceso acumulativo, ya que la cantidad de biofilm formado aumenta conforme el tiempo de incubación y alcanza un punto máximo a las 24 h. Sin embargo, después de 24 h de incubación, la cantidad de biofilm formado disminuye, lo cual sugiere la disgregación del mismo, resultados similares han sido observados en *P. fluorescens* (Allison *et al.*, 1998) y en *P. aeruginosa* (Hinsa *et al.*, 2003).

Esta dispersión del biofilm puede deberse a una escasez de nutrientes en el medio de cultivo, ya que bajo nuestras condiciones experimentales, los cultivos se encuentran en fase estacionaria a las 24 h (Fig. 3.2.). Si la dispersión del biofilm se debiera a la falta de nutrientes, entonces al agregar medio nuevo a cultivos de más de 24 h de incubación, posiblemente se prevendría la disgregación del biofilm. No

obstante, cuando se agregó medio fresco (LB MOPS 100 mM pH 7.0) a estos cultivos, se obtuvo el mismo patrón.

Por otro lado, existen reportes que indican que después de 24 h de incubación, un cultivo aeróbico puede alcanzar anaerobiosis (Tran y Uden, 1998), por lo que posiblemente la dispersión del biofilm se debe a la acumulación o producción de una molécula de disgregación en ausencia de oxígeno. Para comprobar esta hipótesis, se realizó la cinética de formación de biofilm en condiciones anaeróbicas. Como se observa en el panel A de la Figura 3.1. no se detectó formación de biofilm bajo condiciones de incubación anaeróbica. Para descartar la posibilidad de que la ausencia de biofilm en anaerobiosis se debiera a un menor crecimiento de las células bajo estas condiciones, se determinó la curva de crecimiento tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Fig. 3.2.).

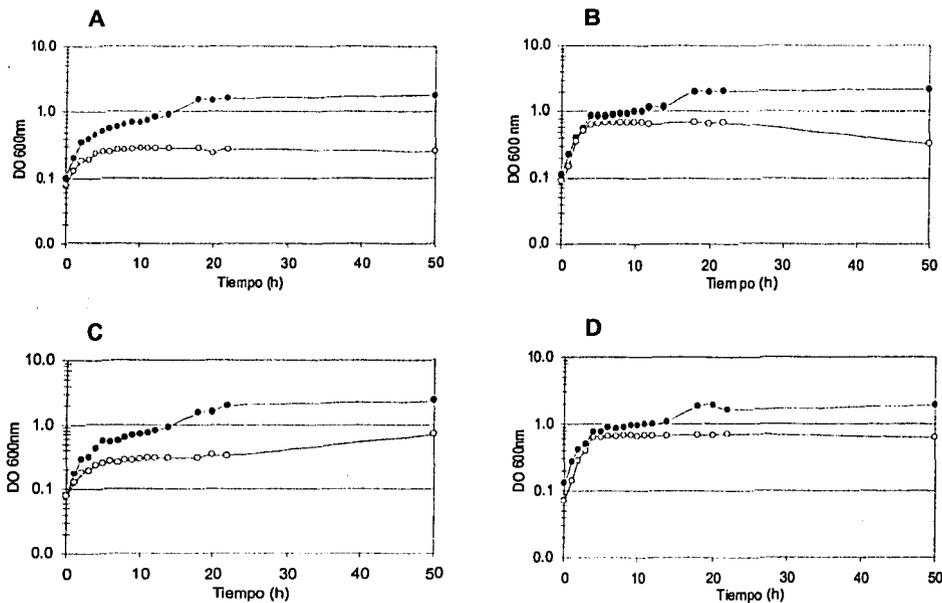


Fig. 3.2. Curva de crecimiento de la cepa W3110. Las células se incubaron bajo condiciones anaeróbicas (O) o aeróbicas (●) a 37°C en medio LB MOPS 100 mM pH 7.0 (A) adicionado con glucosa 0.2% (B), nitrato 40 mM (C) o glucosa 0.2%, nitrato 40 mM (D). Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se determinó la DO a 600nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas el crecimiento de los cultivos llegó a fase estacionaria. Por otro lado, aunque la DO alcanzada en condiciones anaeróbicas fue menor a la DO alcanzada en aerobiosis en todos los medios de cultivo utilizados, el crecimiento anaeróbico mejoró en medio adicionado con glucosa (Fig. 3.2. panel B); sin embargo, no hubo formación de biofilm en ausencia de oxígeno en ningún caso. Resulta interesante que *E. coli* no forme biofilm en condiciones anaeróbicas ya que, es un organismo facultativo y estos datos indican que posiblemente, el oxígeno es importante en el proceso de formación de biofilm.

3.1.2. Microscopia confocal

El método de detección de biofilms mediante tinción con cristal violeta se basa en la propiedad de dicho colorante en teñir componentes de pared celular; varios estudios sobre formación de biofilm se han apoyado en la observación y análisis de los biofilms mediante ensayos de microscopia confocal utilizando para ello células transformadas con plásmidos que contengan genes que codifiquen proteínas fluorescentes (Skillman *et al.*, 1998; Hentzer *et al.*, 2001), por lo que para validar los resultados obtenidos mediante el método de tinción con cristal violeta, se realizaron análisis mediante microscopia confocal. Células W3110 fueron transformadas con el plásmido pEGFP, que codifica una proteína verde fluorescente. Se realizaron ensayos de formación de biofilm utilizando las células transformadas. Las células adheridas se observaron mediante microscopia láser confocal (Fig. 3.3.).

La cantidad de células adheridas a las laminillas de PVC aumenta con el tiempo de incubación, a las 24 y 36 h se observa la mayor cantidad de células en el biofilm y después de este tiempo las células se despegan de la superficie, como se observa al comparar la cantidad de células adheridas a las 36 h con 48, 60 y 72 h. Estos datos corroboran los resultados obtenidos mediante tinción con cristal violeta, por lo que en este proyecto se usó principalmente el método de tinción con cristal violeta para detectar el biofilm formado.

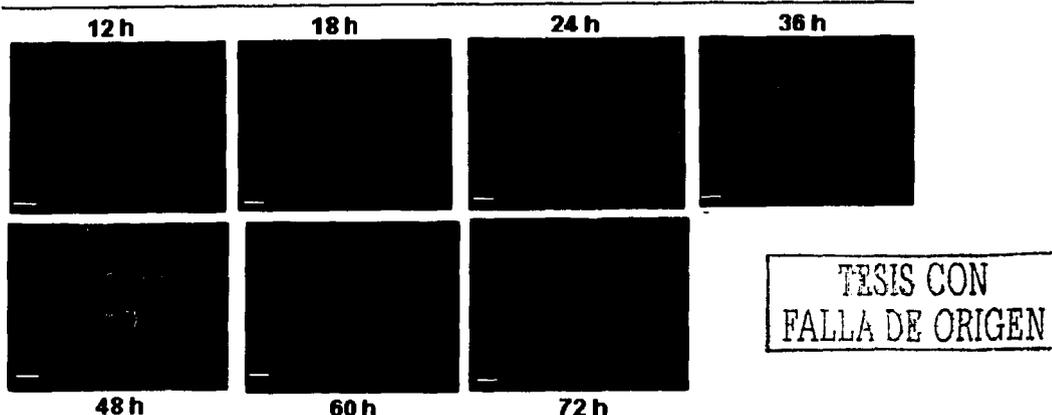


Fig. 3.3. Detección de biofilm por microscopia confocal. Células W3110 fueron transformadas con el plásmido pEGFP. La formación de biofilm se detectó mediante microscopia láser confocal a los tiempos indicados.

3.1.3. La ausencia de oxígeno como señal de disgregación

Como ya se mencionó anteriormente, posiblemente la causa de la disgregación del biofilm se debe a la ausencia de oxígeno, si esto es cierto, entonces un biofilm establecido se dispersaría al ser transferido a condiciones anaeróbicas. Para analizar esta posibilidad, un cultivo de células de la cepa W3110 fueron inoculadas en placas de microtitulación e incubadas en aerobiosis por 12 h, tiempo al cual se encontraban formando biofilm (Fig. 3.1.), posteriormente fueron transferidas a anaerobiosis por distintos tiempos de incubación y se detectó la cantidad de biofilm remanente (Fig. 3.4.).

La cantidad de biofilm formado en un cultivo aeróbico de 12 h representa el 100% (A), sin embargo, al transferir el biofilm aeróbico a condiciones anaeróbicas las células constituyentes del biofilm se dispersan en un 40% después de 4 h de incubación. Por otro lado, cuando células W3110 provenientes del mismo cultivo aeróbico se inocularon en placas nuevas de microtitulación y se incubaron anaeróbicamente no se detectó formación de biofilm. Estos resultados indican que posiblemente la ausencia de oxígeno es una señal de disgregación aunque también

existe la posibilidad de que anaeróbicamente se produzca una molécula que favorece la dispersión del biofilm.

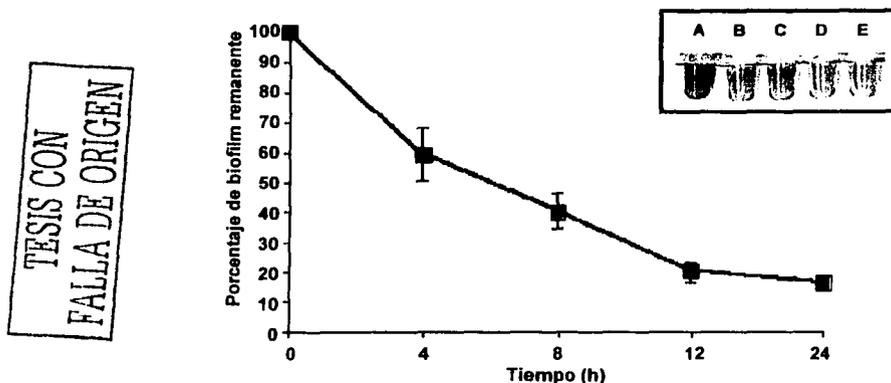


Fig. 3.4. Disgregación del biofilm en ausencia de oxígeno. Un biofilm de W3110 formado en 12 h de incubación aeróbica, fue transferido a anaerobiosis por 4(B), 8(C), 12(D) y 24 h (E). El biofilm se cuantificó mediante elución con etanol-acetona. El porcentaje de biofilm remanente fue calculado tomando como 100% la cantidad de cristal violeta medida en A.

3.1.4. Formación de biofilm bajo una atmósfera con 10 ó 21.1 % de oxígeno

Los resultados anteriores indican que posiblemente existe una molécula de disgregación que se acumula en ausencia de oxígeno o que la falta de oxígeno es la señal de disgregación. Para determinar si el biofilm puede establecerse bajo concentraciones de oxígeno menores a la atmosférica (21.1%), se realizaron ensayos de formación de biofilm bajo una atmósfera al 10% de oxígeno empleando una cámara que permite controlar la tensión de oxígeno. Como se observa en la Fig. 3.5. la cepa W3110 es capaz de formar biofilm bajo esta concentración de oxígeno.

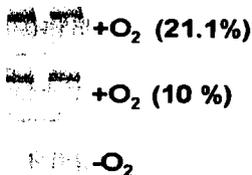


Fig. 3.5. Formación de biofilm bajo diferentes tensiones de oxígeno.

3.2. Papel de aceptores de electrones alternos

E. coli es un organismo facultativo, que en ausencia de oxígeno puede llevar a cabo la respiración anaeróbica utilizando aceptores de electrones alternos al oxígeno como nitrato, nitrito, DMSO y fumarato (Gennis y Stewart, 1996).

Para determinar si la cadena de transporte de electrones estaba involucrada en la formación de biofilm en *E. coli* W3110 y si la ausencia de biofilm en condiciones anaeróbicas sólo se debía a la ausencia de aceptores de electrones alternos en el medio de cultivo, células W3110 se inocularon en medio LB MOPS 100 mM pH 7.0 en presencia de nitrato 40 mM, nitrito 5 mM, DMSO-molibdato 40 mM, 0.1 mM o fumarato 40 mM en condiciones aeróbicas (24 h) o anaeróbicas (48 h) a 37°C (Fig. 3.6.).

La formación de biofilm aeróbica en presencia de los aceptores de electrones alternos indicados no difiere significativamente. Sin embargo, sin importar el aceptor de electrones utilizado el biofilm no es formado bajo condiciones anaeróbicas. Cabe mencionar que el crecimiento anaeróbico en presencia de nitrato es mayor que en LB-MOPS, por ello, la ausencia de biofilm bajo estas condiciones es aún más interesante.

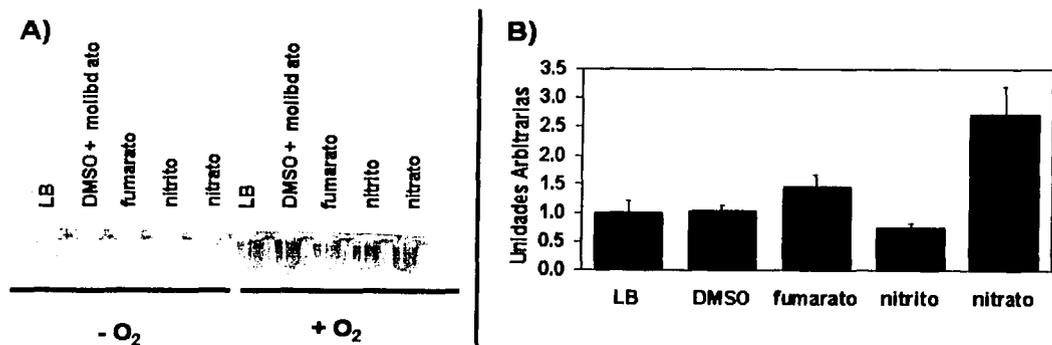


Fig. 3.6. Papel de la cadena de transporte de electrones en la formación de biofilm. A) Formación de biofilm de W3110 incubada en presencia de aceptores de electrones alternos al oxígeno, en aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h). B) Cuantificación del biofilm formado por W3110 aeróbicamente en presencia de aceptores de electrones. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia a 590 nm de las células incubadas sólo con LB MOPS.

Estos resultados indican que la respiración anaeróbica no es suficiente para la formación de biofilm, al menos bajo nuestras condiciones experimentales. Posiblemente debido a que se requiere una molécula inductora de la formación de biofilm que sólo se sintetiza aeróbicamente o cuya actividad depende de la presencia de oxígeno.

3.3. Papel de los productos de fermentación en la formación de biofilm

En ausencia de oxígeno y aceptores de electrones alternos *E. coli* puede llevar a cabo el metabolismo fermentativo (Böck y Sawers, 1996) como parte de este metabolismo *E. coli* libera al medio metabolitos secundarios como acetato, succinato, etanol, formiato o lactato, tal vez éstos pudieran actuar negativamente sobre la formación de biofilm. Si es así, entonces los productos de fermentación también prevendrían la formación de biofilm en aerobiosis.

Para corroborar esta hipótesis, células W3110 fueron incubadas aeróbicamente en presencia de acetato 0.2%, succinato 0.4%, etanol 2.0%, formiato 2.0% o lactato 0.4% (Fig. 3.7.).

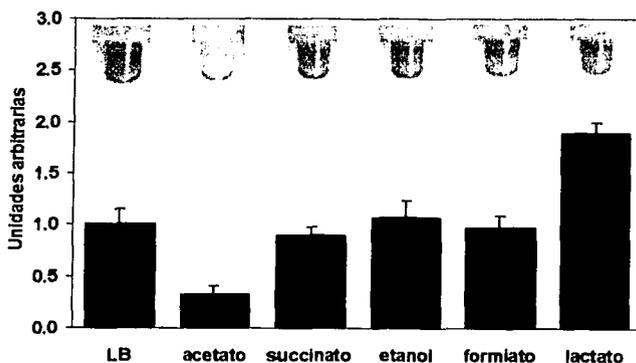


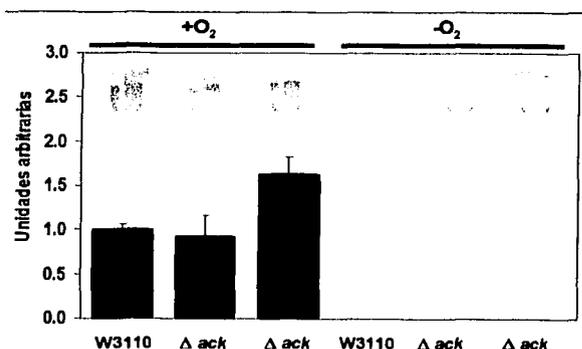
Fig. 3.7. Efecto de productos de fermentación en la formación de biofilm de *Escherichia coli* W3110. Células W3110 fueron incubadas aeróbicamente por 24 h en medio LB MOPS 100 mM pH 7.0 en presencia de acetato, succinato, etanol, formiato o lactato a las concentraciones indicadas en el texto. La detección del biofilm se realizó mediante tinción con cristal violeta. La gráfica representa la cantidad de biofilm en cada condición. Una unidad arbitraria corresponde a la absorbancia a 590 nm de la elución del biofilm formado en LB.

La formación de biofilm de W3110 en presencia de succinato, etanol y formiato, es muy similar a la formación de biofilm en LB MOPS, en presencia de lactato, la cantidad de biofilm formado es dos veces mayor respecto al control, posiblemente el lactato es utilizado como fuente de carbono. Sin embargo ninguno de estos productos afecta negativamente la formación de biofilm, excepto el acetato. Como se observa en la gráfica, en presencia de acetato la formación de biofilm es dos veces menor que el biofilm formado en LB MOPS 100 mM pH 7.0. Si el acetato fuera una señal negativa para la formación de biofilm, entonces, cepas afectadas en la vía de síntesis de acetato, probablemente formarían biofilm en condiciones anaeróbicas.

En *E. coli* la única vía de síntesis de acetato se lleva a cabo por acción de las enzimas fosfotransacetilasa (PTA) y acetato cinasa (ACK) que catalizan la formación de acetato a partir de acetilCoA (Böck y Sawers, 1996)



Se analizó la formación de biofilm de las cepas mutantes en *ack* (Tabla 2.1.) BW21437 y BW21770 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Fig. 3.8.).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 3.8. Formación de biofilm de cepas deficientes en producción de acetato. La formación de biofilm de las cepas W3110, BW21437 y BW21770 en medio LB MOPS 100 mM, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, se determinó por tinción con cristal violeta. La gráfica muestra la cuantificación del biofilm.

Ninguna de las cepas afectadas en el gen que codifica para la enzima acetato cinasa (ACK) formó biofilm anaeróticamente, estos resultados sugieren que ninguno de los productos de fermentación analizados previenen la formación de biofilm en ausencia de oxígeno bajo nuestras condiciones experimentales.

3.4. Participación de moléculas extracelulares en la formación del biofilm

La participación de señales moleculares extracelulares juega un papel importante en el proceso de formación de biofilm. Uno de los tipos de señalización molecular entre bacterias es la percepción del quórum. En *P. aeruginosa* los sistemas de respuesta al quórum RhII/R y LasI/R han sido involucrados en la regulación de la estructura del biofilm (Singh *et al.*, 2000; Hentzer *et al.*, 2001; Shih y Huang, 2002).

En *E. coli* se ha reportado que existen señales extracelulares que podrían participar en la respuesta al quórum y en formación de biofilm (Surette y Bassler, 1998; Stickler, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a). Si existiera una molécula inductora de la formación de biofilm que se activara en presencia de oxígeno, entonces aquellas células que fueran incubadas con sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos formarían biofilm incluso en anaerobiosis.

Por otro lado, si en condiciones anaeróbicas se produjera o acumulara una molécula inhibitoria de la formación de biofilm, entonces, también inhibiría la formación de biofilm en presencia de oxígeno. El experimento que se realizó para confirmar esta hipótesis, consistió en mezclar células provenientes de cultivos aeróbicos (24 h) o cultivos anaeróbicos (48 h) con sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos e incubarlos en presencia o ausencia de oxígeno.

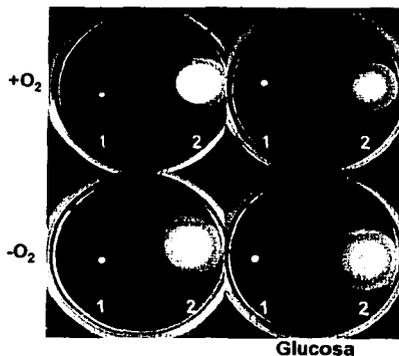
En la parte superior de la Fig. 3.9. se muestra la detección de biofilm por el método de cristal violeta de los cultivos aeróbicos y anaeróbicos a partir de los cuales se tomaron las células y sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos o

detectó formación de biofilm en presencia de oxígeno y ésta fue mucho menor al utilizar sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos.

3.5. Papel de la motilidad en la formación de biofilm

Se ha reportado que el nado y la motilidad mediada por flagelo, son importantes en la etapa de adhesión inicial a la superficie durante el proceso de formación del biofilm (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Watnick *et al.*, 2001; Sheikh *et al.*, 2001). La mayoría de las mutantes aisladas que no forman biofilm aeróbicamente, están afectadas en síntesis de flagelo (Genevaux *et al.*, 1999a).

Para determinar si la ausencia de biofilm en condiciones anaeróbicas se debía a un defecto en motilidad causado por la ausencia de oxígeno, se realizaron ensayos de nado en placas de agar suave. Se inocularon 2 μ l de un cultivo saturado de la cepa W3110 sobre la placa de agar, se utilizó como control una cepa deficiente en síntesis de flagelo (ZK408). El nado se observa como un halo alrededor del punto de inoculación (Fig. 3.10.).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3.10. Ensayo de motilidad mediada por nado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

2 μ l de un cultivo saturado de la cepa ZK408 (*flhC*, 1) o W3110 (2) se inocularon en placas de agar suave y se incubaron aeróbicamente por 4 h (fila superior) o anaeróbicamente por 8 h (fila inferior), en ausencia o presencia de glucosa (columna derecha).

Como se observa en la Fig. 3.10. alrededor del punto de inoculación se forma un halo utilizando la cepa W3110 en todas las condiciones probadas, mientras que la cepa deficiente en motilidad ZK408 no presenta este halo. En aerobiosis el nado de la cepa W3110 es menor en presencia de glucosa debido a que la síntesis de flagelo está sujeta a regulación catabólica. En anaerobiosis el nado de la cepa W3110 es menor que en presencia de oxígeno y mejora en medio suplementado con glucosa.

Sin embargo, el nado no está gravemente afectado en ausencia de oxígeno, lo cual indica que la falta de biofilm en anaerobiosis no se debe a un defecto en motilidad.

3.6. Estrés oxidativo y formación de biofilm

Los resultados obtenidos hasta este punto indican que el oxígeno se requiere para la formación de biofilm de *E. coli* W3110 por razones que hasta ahora no hemos esclarecido. En *E. coli* la producción de la proteína de membrana externa denominada antígeno 43 es importante durante el proceso de adhesión inicial bajo ciertas condiciones de cultivo (Danese *et al.*, 2000a), esta proteína es codificada por el gen *flu* o *agn43* y se ha reportado que el regulador maestro del estrés oxidativo OxyR regula a nivel transcripcional la expresión de este gen (Schembri *et al.*, 2003a). Estos datos sugieren que el estrés oxidativo podría ser una señal para la formación de biofilm. Para analizar esta posibilidad observamos la formación de biofilm de mutantes de W3110 afectadas en los reguladores globales SoxR y OxyR (Storz y Imlay, 1999). En condiciones aeróbicas la formación de biofilm en la mutante *soxRS* no tuvo cambios significativos respecto a la formación de biofilm en la cepa isogénica W3110, sin embargo, la mutante en *oxyR* formó ligeramente mayor cantidad de biofilm que la cepa silvestre, resultados consistentes a los observados previamente por Danese y colaboradores respecto a la regulación que OxyR ejerce sobre *agn43* (Danese *et al.*, 2000a). No obstante ninguna de las mutantes presentó formación de biofilm en ausencia de oxígeno.

Por otro lado, células W3110 fueron incubadas en presencia de agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno 0.01% o PQ 100 μM (el PQ es un agente cíclico productor de superóxido). La formación de biofilm se determinó en ausencia y presencia de oxígeno; sin importar el agente oxidante presente en el medio las células no formaron biofilm en condiciones anaeróbicas.

3.7. Participación de posibles detectores de oxígeno y otros reguladores en la formación de biofilm

La transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico en *E. coli* es un proceso altamente regulado (Sawers, 1999). La proteína Fnr (*fumarate and nitrate reduction*) y el sistema de dos componentes ArcA/ArcB (*aerobic respiratory control*) regulan la síntesis de más de 40 proteínas durante dicha transición (Spiro y Guest, 1990; Iuchi y Lin, 1992).

Tanto Fnr como ArcA son factores transcripcionales que interactúan específicamente con el DNA. Fnr es una proteína dimérica con un centro hierro-azufre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, que al contacto con oxígeno se desensambla (Spiro y Guest, 1990). Por otro lado el sistema Arc consta de una histidina cinasa asociada a membrana que monitorea cambios en el estado redox y transmite la señal al regulador de respuesta ArcA a través de una cascada de fosforilación (Iuchi y Lin, 1992).

Existen otras proteínas involucradas en la transición del metabolismo aeróbico a anaeróbico. Aer es una flavoproteína que participa en aerotaxis, recibe señales de la cadena de transporte de electrones y responde a través del sistema de quimiotaxis CheY, CheA y CheW (Rebbapragada *et al.*, 1997) y por otro lado la proteína DpiA, parte del sistema de dos componentes DpiA/DpiB, es homóloga a un regulador en *Klebsiella pneumoniae* que activa la expresión de la vía de citrato liasa en anaerobiosis o presencia de citrato. Finalmente la proteína Hmp ha sido propuesta como posible detector de oxígeno debido a la presencia de un grupo hemo (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999).

Posiblemente la falta de biofilm en condiciones anaeróbicas puede deberse a la presencia o ausencia de una proteína o metabolito cuya síntesis es regulada por alguna de las proteínas mencionadas. Por lo que se determinó la formación de biofilm de cepas afectadas en la síntesis de estas proteínas: JRG1728 (Δfnr), JMH0345 (W3110 *arcA::kan*), JMH0346 (W3110 *arcB::kan*), JMH0349 (W3110 *dpiB::kan*), JMH0351 (W3110 *hmp::kan*), JMH0574 (W3110 pSB20/aer) y UU1117 (Δaer). Ninguna de las mutantes fue capaz de formar biofilm en ausencia de oxígeno. Estos resultados sugieren que ninguno de estos reguladores está involucrado en la formación de biofilm anaeróbicamente.

Por otro lado, se ha reportado que el regulador global H-NS regula positivamente la síntesis de LPS y flagelo en respuesta a condiciones limitadas de oxígeno, altos niveles en la expresión de flagelo ocasionan una disminución en la adhesión inicial. Por el contrario, mutantes afectadas en el gen *hns* e incubadas anaeróbicamente presentan mayor adhesión a columnas de arena (Landini y Zehnder, 2002).

Se ha observado que mutaciones en el gen *rpoS* que codifica el factor sigma de fase estacionaria RpoS, forman mayor cantidad de biofilm en condiciones aeróbicas que la cepa isogénica (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a).

Para determinar si alguno de estos reguladores participa en la formación de biofilm en ausencia de oxígeno, se observó la formación de biofilm en mutantes *hns*, *rpoS* y en *fis* que codifica la proteína de unión a DNA Fis (Hengge-Aronis, 1999; Schneider *et al.*, 2003); sin embargo, ninguna de las mutantes analizadas formó biofilm anaeróbicamente bajo nuestras condiciones experimentales.

3.8. El papel de CsrA en la disgregación del biofilm

Como se describió en la introducción de este trabajo, el único regulador de disgregación del biofilm que se ha identificado en *E. coli* es el regulador CsrA (*carbon storage regulator*), mutantes afectadas en el gen *csrA* muestran mayor acumulación de

biofilm después de 20 h de incubación respecto a la cepa silvestre en condiciones aeróbicas (Jackson *et al.*, 2002).

Si CsrA actúa como señal para la dispersión del biofilm, entonces existe la posibilidad de que esta proteína se exprese en mayor proporción en ausencia de oxígeno que en presencia de oxígeno y que ésta sea la causa de la falta de biofilm en condiciones anaeróbicas. Para determinar la expresión de CsrA se utilizó la cepa KSA712 que contiene la fusión traduccional $\Phi(\text{csrA}'\text{-}'lacZ)$ y se midió la actividad de β -galactosidasa (Fig. 3.11.).

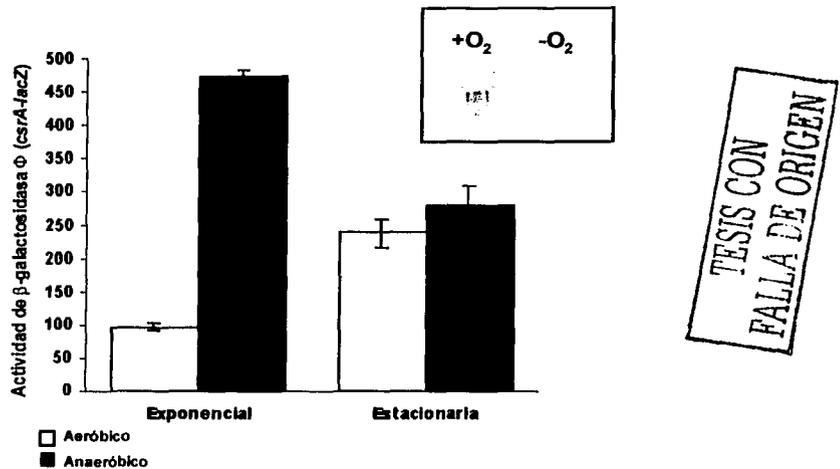


Fig. 3.11. Expresión de CsrA bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se midió la actividad de β -galactosidasa de la fusión traduccional $\Phi(\text{csrA}'\text{-}'lacZ)$ en células en fase exponencial y estacionaria provenientes de cultivos aeróbicos (barras blancas) o anaeróbicos (barras negras).

La actividad de β -galactosidasa fue aproximadamente 4 veces mayor en fase exponencial bajo condiciones anaeróbicas, mientras que en fase estacionaria no hubo diferencias significativas. Aunque parece ser que la actividad de CsrA responde a condiciones anaeróbicas en fase exponencial, una mutante en *csrA* (TR1-5) no fue capaz de formar biofilm en ausencia de oxígeno, lo que sugiere que la ausencia de biofilm en condiciones anaeróbicas es independiente de CsrA.

3.9. Búsqueda de una mutante capaz de formar biofilm anaeróbicamente

Como ya se mencionó a lo largo de este trabajo, *E. coli* no es capaz de formar biofilm anaeróbicamente, posiblemente esto se deba a que el producto de un gen actúa como señal negativa para la formación del biofilm, si esto fuera cierto, entonces, al mutagenizar este gen, posiblemente se obtendrían mutantes que formen biofilm en ausencia de oxígeno. Para tratar de aislar una mutante capaz de formar biofilm bajo condiciones anaeróbicas, se siguieron dos estrategias de mutagénesis utilizando secuencias transponibles o agentes químicos.

3.9.1. Mutagénesis usando mini-transposones

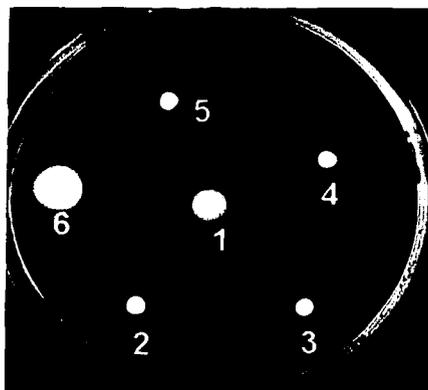
La cepa W3110 fue mutagenizada al azar utilizando los minitransposones miniTn10 (λ NK1098) y miniTn5 (λ NK1105) reportados por Kleckner y colaboradores (Kleckner *et al.*, 1991), los cuales llevan consigo un cassette de resistencia a tetraciclina o kanamicina respectivamente, por lo que la selección de las mutantes se llevó a cabo en medio sólido suplementado con tetraciclina 25 μ g/ml o kanamicina 100 μ g/ml bajo condiciones aeróbicas. La detección de mutantes capaces de formar biofilm anaeróbicamente se realizó utilizando la metodología descrita en los ensayos de formación de biofilm. Se analizaron 3360 mutantes originadas por inserción de miniTn10 y 5472 mutantes con inserción del miniTn5. La selección de mutantes se llevó a cabo en medio con el antibiótico correspondiente. La detección de mutantes que pudieran formar biofilm anaeróbicamente se realizó siguiendo el ensayo de formación de biofilm descrito en Material y Métodos. Ninguna de las aproximadamente 9000 mutantes analizadas fue capaz de formar biofilm anaeróbicamente, sin embargo, se obtuvieron 4 mutantes que no formaban biofilm en presencia de oxígeno.

3.9.1.1. Mutantes afectadas en formación de biofilm aeróbicamente

De las 4 mutantes que perdieron la capacidad de formar biofilm aeróbicamente, 3 de ellas tenían insertado el transposón λ miniTn5 (JMH0299, JMH0300 y JMH0301) y una el transposón λ miniTn10 (JMH0302). Como ya se mencionó en el apartado 3.5. de este trabajo, la mayoría de las mutantes aisladas que no forman biofilm aeróbicamente están afectadas en síntesis de flagelo (Genevaux *et al.*, 1999a). Por lo que se realizaron ensayos de nado con estas mutantes.

3.9.1.2. Ensayo de nado de las mutantes afectadas en la formación de biofilm aeróbicamente

Para descartar la posibilidad de que la ausencia de biofilm en presencia de oxígeno se debiera a un defecto en motilidad, se realizaron ensayos de nado en placas de agar suave. Se inocularon 2 μ l de un cultivo saturado sobre la placa de agar, el nado se observa como un halo alrededor del punto de inoculación (Fig. 3.12.).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3.12. Ensayo de motilidad mediada por nado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

2 μ l de un cultivo saturado de la cepa W3110 (1), JMH0299 (2), JMH0300 (3), JMH0301 (4), JMH0302 (5) o JMH0314 (6) se inocularon en placas de agar suave y se incubaron aeróbicamente por 4 h.

Únicamente la cepa W3110 presentó un halo de nado en condiciones aeróbicas, mientras que las mutantes JMH0299, JMH0300, JMH0301 y JMH0302 afectadas en la formación de biofilm no fueron capaces de nadar aeróbicamente (Fig. 3.11.). Cuando se repitió el ensayo de nado con estas mutantes, dentro de la colonia formada por una de ellas, JMH0299, se presentó un brote similar a un halo de nado asociado a la colonia no mótil, lo cual parecía indicar que la mutante JMH0299 readquirió la capacidad de nado espontáneamente posiblemente por una mutación supresora. Esta mutante supresora se renombró JMH0314. Pese a que la mutante JMH0314 readquirió la capacidad de nado aeróbicamente (Fig. 3.11.), no recuperó la capacidad de formar biofilm.

3.9.1.3. Mapeo de la inserción y secuenciación

Se eligió a la mutante JMH0314 para determinar el sitio de inserción del transposón. Para ello se extrajo el DNA cromosomal de la mutante y se realizó un análisis de restricción con diferentes enzimas que no pudiesen digerir el transposón con el fin de obtener un fragmento que pudiera clonarse en un plásmido para su posterior secuenciación. Utilizando las enzimas de restricción *EcoRI-PstI* se obtuvo un fragmento de aproximadamente 7 kpb que fue clonado en el plásmido pUC18 digerido con las mismas enzimas de restricción y se transformó en la cepa XL1-Blue, obteniéndose así la cepa JMH0908 resistente a kanamicina, una segunda verificación de que el fragmento *EcoRI-PstI* de 7.5 kpb clonado en el plásmido contenía al transposón se llevó a cabo realizando un experimento tipo Southern, hibridando al fragmento *EcoRI-PstI* clonado en el plásmido con el DNA de la cepa W3110 y de la mutante isogénica JMH0314 digerido con las mismas enzimas.

El plásmido pUC18 con el fragmento *EcoRI-PstI* de 7 kpb se secuenció utilizando el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas utilizando los oligonucleótidos M13 -21 y M13 Rev con los cuales se obtuvo una secuencia de 491 y 717 pb respectivamente.

El análisis de secuencia indica que el transposón está insertado en el gen *fimD* que forma parte del grupo de genes *fim* que se encargan de la biosíntesis de fimbria tipo I (o pili tipo I) en *E. coli* (Fig. 3.13.). El gen *fimD* codifica la proteína FimD que al igual que la chaperona FimC, participa en el ensamble de fimbrias (Klemm y Christiansen, 1990; Nishiyama *et al.*, 2003). Sin embargo, la naturaleza de la mutación supresora se desconoce.

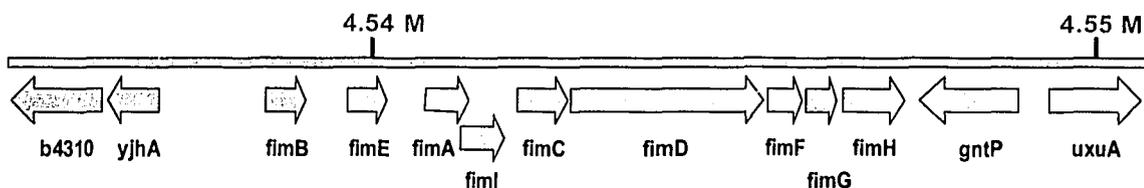


Fig. 3.13. Organización de los genes que participan en biosíntesis de fimbria tipo I en *Escherichia coli*. Fim B y FimE, reguladores de FimA; FimA, subunidad fimbrial mayor; FimI, subunidad fimbrial menor; FimC, chaperona periplásmica requerida para el ensamblaje de fimbria tipo I; FimD, proteína de membrana externa que participa en la exportación y ensamblaje de la fimbria; FimF y FimG, subunidades menores de fimbria; FimH, adhesina.

3.9.2. Mutagénesis con NSG

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La inserción de secuencias transponibles en el genoma usualmente genera la inactivación del gen afectado (Kleckner *et al.*, 1991). Si la mutación que confiere la capacidad de formar biofilm anaeróbicamente es letal, entonces no podrían seleccionarse mutantes con el fenotipo deseado utilizando este método de mutagénesis. Una estrategia alternativa de mutagénesis, es el uso de agentes químicos como el MNNG (*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina). El MNNG es un agente alquilante que al metilar la posición O^6 de la guanina permite el apareamiento con timina, causando transiciones G:C → A:T, generando así mutaciones puntuales. Se analizaron 3552 mutantes, sin embargo ninguna de ellas presentó el fenotipo deseado.

**FALTA
PAGINA**

81

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

La importancia del estudio de los biofilms radica en el impacto negativo que tienen en diferentes actividades humanas, ejemplos de ello se indican en el apartado 1.2.1. de este trabajo. La mayoría de los estudios sobre biofilms se han enfocado en la búsqueda de los determinantes genéticos importantes durante las diferentes etapas del proceso de formación de biofilms. Algunos de los genes identificados mediante este tipo de estudios se muestran en la Tabla 1.1.

Por otro lado, se ha observado que la formación del biofilm es afectada por factores como temperatura, pH, naturaleza de la superficie, percepción del quórum, interacciones con otros microorganismos, disponibilidad de oxígeno entre otros (Bradshaw *et al.*, 1997; Bos *et al.*, 2000; Fuqua *et al.*, 2001; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b). Respecto al último punto algunos reportes sobre formación de biofilm realizados en *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* muestran que el biofilm se forma como un aro en la interfase aire-medio (O'Toole *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000; Watnick *et al.*, 2001), datos que han llevado a sugerir que el oxígeno juega un papel importante en este proceso.

Como se mencionó anteriormente, la primera observación que se realizó fue que al menos bajo nuestras condiciones experimentales *E. coli* no es capaz de formar biofilm en ausencia de oxígeno pese a que la curva de crecimiento de las células W3110 en estas condiciones alcanzó fase estacionaria, además, se demostró que aparte de que el oxígeno es requerido para la formación de biofilm, la ausencia de éste es posiblemente una señal de disgregación del biofilm (Fig. 3.1. y 3.2.).

Tal y como se mencionó, *E. coli* es un microorganismo facultativo, que en ausencia de oxígeno puede llevar a cabo el metabolismo anaeróbico en presencia de aceptores de electrones alternos como nitrato, nitrito, DMSO y fumarato, y que aún en ausencia de estos últimos, puede realizar el metabolismo fermentativo. Sin embargo, el metabolismo anaeróbico no fue suficiente para permitir la formación de biofilm y la posibilidad de que alguno de los productos del metabolismo fermentativo pudiese actuar como señal negativa para el biofilm, fue descartada. Adicionalmente, se observó que la

motilidad no está severamente afectada en condiciones anaeróbicas, por lo que la ausencia de biofilm en anaerobiosis no puede explicarse por una deficiencia en la movilidad.

En *P. aeruginosa* se ha descrito que la participación de moléculas extracelulares es necesaria para la formación del biofilm (Allison *et al.*, 1998) y consistente con ello mutantes en el sistema de QS LasI/LasR están afectadas en el proceso de maduración (Davies *et al.*, 1998). En *E. coli* se ha reportado que existen señales extracelulares que podrían participar en la percepción del quórum y posiblemente en formación de biofilm (Surette y Bassler, 1998; Stickler, 1999; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a).

Sin embargo, parece ser que bajo nuestras condiciones experimentales, la formación de biofilm no involucra la participación de moléculas extracelulares, ya que sobrenadantes provenientes de cultivos aeróbicos no tuvieron efecto en la formación de biofilm de células provenientes de cultivos aeróbicos o anaeróbicos que fueron incubados en ausencia de oxígeno (Fig. 3.9.). No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la señal de disgregación o inhibición del biofilm sea sensible a oxígeno, o que por otro lado, la señal negativa de formación de biofilm sólo actúe cuando se encuentra en estado reducido, lo cual se discutirá más adelante.

Hasta este punto, todos nuestros resultados sugieren que el oxígeno es un requerimiento indispensable para la formación de biofilm, por lo que posiblemente el estrés oxidativo participe en este proceso. En *E. coli* la respuesta al estrés oxidativo está regulado por las proteínas SoxR y OxyR (Storz y Imlay, 1999), notablemente mutantes afectadas en los genes que codifican estas proteínas no tuvieron efecto sobre la formación de biofilm bajo condiciones anaeróbicas. Asimismo, la presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o paraquat no favorecieron la formación de biofilm en ausencia de oxígeno.

Schembri y colaboradores reportaron que el gen *agn43*, que codifica la proteína de membrana externa Antígeno 43, es regulado por la proteína OxyR y sólo la forma oxidada de OxyR activa su expresión, mientras que la forma reducida la reprime (Schembri *et al.*, 2003a).

Es probable que la no formación de biofilm en *E. coli* en anaerobiosis y bajo nuestras condiciones experimentales se deba a la presencia de alguna proteína que regule negativamente al biofilm al estar reducida; por lo que trabajo a futuro contemplará la determinación de la formación de biofilm en condiciones aeróbicas de células incubadas con un agente reductor.

Adicionalmente, mutaciones en proteínas que han sido planteadas como posibles detectores de oxígeno, como Fnr, ArcA, Aer, DpiB y Hmp, no contribuyeron a la formación de biofilm anaeróbicamente, al igual que mutaciones en el factor sigma de fase estacionaria RpoS, la proteína Fis y H-NS. Cabe mencionar que H-NS se ha involucrado con la activación de síntesis de flagelo y LPS en condiciones de limitación de oxígeno y que mutantes en el gen *hns* crecidas en condiciones anaeróbicas presentan mayor adhesión a columnas de arena que la cepa silvestre (Landini y Zehnder, 2002).

La proteína reguladora CsrA se ha reportado como una señal de disgregación del biofilm y mutantes en esta proteína acumulan mayor cantidad de biofilm aeróbicamente (Jackson *et al.*, 2002), mutaciones en el gen *csrA* no favorecen la formación de biofilm anaeróbicamente, resultados que sugieren que en ausencia de oxígeno la dispersión del biofilm es independiente de CsrA.

CsrA reprime algunas vías metabólicas inducidas en la fase estacionaria como la biosíntesis de glicógeno y gluconeogénesis (Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996), además activa la glicólisis, el metabolismo de acetato y la motilidad (Wei *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Las enzimas que participan en la biosíntesis de ESP pueden dividirse en 4 grupos: i) Enzimas responsables del metabolismo inicial de

carbohidratos, ii) enzimas involucradas en la síntesis de nucleósidos e interconversión, iii) glicosil transferasas y iv) translocasas y polimerasas. Posiblemente CsrA participe de alguna forma en la regulación de la biosíntesis de ácido colánico u otros LPS en *E. coli* importantes para la adhesión inicial y formación de biofilm en ausencia de oxígeno.

Por último, ninguno de los métodos de mutagénesis utilizados permitió el aislamiento de una mutante capaz de formar biofilm anaeróbicamente, estos resultados podrían indicar que i) El gen responsable de producir la señal negativa para el biofilm bajo condiciones anaeróbicas también participa en otras funciones y posiblemente es esencial ó ii) la presencia de oxígeno es indispensable para la formación de biofilm. Para continuar con la búsqueda de una cepa de *E. coli* capaz de formar biofilm aeróbicamente se transformará a la cepa W3110 con una librería genómica de *E. coli* clonada bajo un promotor inducible con IPTG.

Por otro lado, con la mutagénesis realizada se obtuvieron mutantes afectadas en la formación de biofilm bajo condiciones aeróbicas. Resultados preliminares sobre el sitio de inserción del transposón en la mutante JMH0314 revelaron que el transposón se insertó en el gen *fimD* que codifica para la proteína FimD, que participa en la exportación y ensamblaje de la fimbria. El que esta mutante este afectada en la biosíntesis de fimbrias podría explicar su defecto en formación de biofilm bajo condiciones aeróbicas; sin embargo no concuerda con el hecho de que la mutante estuviera inicialmente afectada en nado, por lo que el mapeo del sitio de inserción del transposon en la mutante JMH0314 será repetido para corroborar los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que el oxígeno juega un papel muy importante en la formación de biofilm, posiblemente activando algún regulador requerido para la síntesis de moléculas necesarias en este proceso.

La adopción de una conducta multicelular es común en las comunidades bacterianas, las cuales son beneficiadas por esta cooperación (Shapiro, 1998). En S.

typhimurium la conducta multicelular (morfotipo *rdar*) consiste en el crecimiento de colonias esparcidas que forman redes celulares sobre una superficie sólida, adhesión a superficies abióticas y la formación de agregados celulares en medio líquido (Romling *et al.*, 1998b). El morfotipo *rdar* es regulado por el gen *agfD*, que codifica para un regulador de respuesta perteneciente a la familia FixJ (Romling *et al.*, 2000).

Recientemente se observó que como parte de la conducta de morfotipo multicelular *S. typhimurium* y *E. coli* producen una matriz extracelular compuesta por fimbrias y celulosa (Zogaj *et al.*, 2001). AgfD regula la transcripción del operón *agfBA*, que participa en la síntesis de fimbria (Romling *et al.*, 1998a); por otro lado, AgfD regula transcripcionalmente al gen *adrA*, una proteína reguladora que interviene en la cascada de síntesis de celulosa (Romling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001).

Se ha reportado que la transcripción del promotor *agfD* está regulada por tensión de oxígeno, pH, temperatura, fase de crecimiento y limitación de nitrógeno y fosfatos (Gerstel y Romling, 2001). Como ya se reportó en este trabajo, la formación de biofilm en *E. coli* sólo ocurre aeróbicamente y alcanza un punto máximo a las 24 h, tiempo en el cual las células se encuentran en fase estacionaria y donde muy probablemente existe limitación de nutrimentos. Por otro lado, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el pH juega un papel importante en la formación de biofilm en *E. coli* (Corona-Izquierdo, 2002; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002b).

El homólogo a *agfD* en *E. coli*, es el gen *csgD* que codifica para la proteína CsgD que regula la síntesis de curli y participa en el proceso de adhesión inicial (Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Posiblemente CsgD regula la formación de biofilm en *E. coli* de una manera similar a la regulación que ejerce *agfD* sobre la formación del morfotipo multicelular en *S. typhimurium*. Por lo que, el trabajo a futuro incluirá el análisis de la formación de biofilm en ausencia de oxígeno de mutantes en el gen *csgD* o de cepas que sobreexpresen dicho gen mediante su inserción en plásmidos.

Finalmente, dado que se ha reportado que la degradación de alginato por alginato liasas en *P. fluorescens* (Boyd y Chakrabarty, 1994; Allison *et al.*, 1998) participa en la dispersión de las células que constituyen el biofilm, se determinará: la presencia de algunas exopolisacárido liasas en *E. coli* y se analizará su papel en la disgregación del biofilm.

Dado que uno de los factores que afecta la formación de biofilm es la interacción con otros microorganismos se analizará la formación de biofilm de *Escherichia coli* incubada en presencia de otros microorganismos.

El descifrar por qué un microorganismo facultativo únicamente puede desarrollar cierta conducta fisiológica bajo condiciones aeróbicas, abrirá una ventana en el entendimiento de la formación y dispersión de biofilm bacterianos.

FALTA

PAGINA

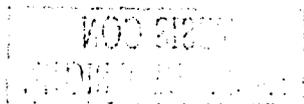
89

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Itoh, T., Kasai, H., Kashimoto, K., Kimura, S., Kitagawa, M., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Mori, T., Motomura, K., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishino, Y., Oshima, T., Saito, S., Sampei, G., Seki, Y., Sivasundaram, S., Tagami, H., Takeda, J., Takemoto, K., Takeuchi, Y., Wada, C., Yamamoto, Y. & Horiuchi, T. (1996). A 570-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0-40.1 min region on the linkage map (supplement). *DNA Res* 3, 435-440.
2. Allison, D. G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. M. & Wilson, M. (2000). *Community structure and co-operation in biofilms*. Allison, D. G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. M. & Wilson, M. (eds). Reino Unido: Cambridge University Press.
3. Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. & Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 167, 179-184.
4. Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W. & Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 162, 295-301.
5. Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2, 582-587.
6. Blattner, F. R., Plunkett, G. 3., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1474.
7. Bonafonte, M. A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., Garcia-Ros, D. & Gamazo, C. (2000). The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol Lett* 191, 31-36.
8. Bos, R., van der Mei, H. C., Gold, J. & Busscher, H. J. (2000). Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 189, 311-315.
9. Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 60, 2355-2359.
10. Böck, A. & Sawers, G. (1996). Fermentation. In *Escherichia coli and Salmonella*. Neidhardt, F. C. et al. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, págs. 262-282.
11. Bradley, D. E. (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* 26, 146-154.
12. Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. & Allison, C. (1997). Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. *Lett Appl Microbiol* 25, 385-387.
13. Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. & Allison, C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 66, 4729-4732.
14. Bryan, L. E. & Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 23, 835-845.

15. **Bryan, L. E., Nicas, T., Holloway, B. W. & Crowther, C. (1980).** Aminoglycoside-resistant mutation of *Pseudomonas aeruginosa* defective in cytochrome c552 and nitrate reductase. *Antimicrob Agents Chemother* **17**, 71-79.
16. **Characklis, W. G. & Marshall, K. C. (1990).** *Biofilms*. Characklis, W. G. & Marshall, K. C. (eds). USA: John Wiley & Sons, Inc.
17. **Corona-Izquierdo, F. P. (2002).** El papel de RpoS en la formación de biofilms en *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Odontológicas y de la Salud. UNAM.
18. **Corona-Izquierdo, F. P. & Membrillo-Hernandez, J. (2002a).** A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 105-110.
19. **Corona-Izquierdo, F. P. & Membrillo-Hernandez, J. (2002b).** Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). *Res Microbiol* **153**, 181-185.
20. **Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
21. **Czeczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1997).** Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**, 4135-4145.
22. **Dalton, H. M., Poulsen, L. K., Halasz, P., Angles, M. L., Goodman, A. E. & Marshall, K. C. (1994).** Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure. *J Bacteriol* **176**, 6900-6906.
23. **Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. & Kolter, R. (2000a).** The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**, 424-432.
24. **Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter, R. (2000b).** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**, 3593-3596.
25. **Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295-298.
26. **Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **60**, 70-102.
27. **Elasri, M. O. & Miller, R. (1999).** Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2025-2031.
28. **Engebrecht, J., Nealson, K. & Silverman, M. (1983).** Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**, 773-781.
29. **Engebrecht, J. & Silverman, M. (1984).** Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4154-4158.
30. **Falconi, M., McGovern, V., Gualerzi, C., Hillyard, D. & Higgins, N. P. (1991).** Mutations altering chromosomal protein H-NS induce mini-Mu transposition. *New Biol* **3**, 615-625.

31. **Froeliger, E. H. & Fives-Taylor, P. (2001).** *Streptococcus parasanguis* Fimbria-Associated Adhesion Fap1 Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* **69**, 2512-2519.
32. **Fujita, N., Mori, H., Yura, T. & Ishihama, A. (1994).** Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 2.4-4.1 min (110,917-193,643 bp) region. *Nucleic Acids Res* **22**, 1637-1639.
33. **Fuqua, C., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2001).** Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.
34. **Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M. S. & Oudega, B. (1999a).** Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 403-409.
35. **Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M. S. & Oudega, B. (1999b).** Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol* **172**, 1-8.
36. **Genevaux, P., Muller, S. & Bauda, P. (1996).** A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 27-30.
37. **Gennis, R. B. & Stewart, V. (1996).** Respiration. In *Escherichia coli and Salmonella*. Neidhardt, F. C. et.al. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pág. 217-261.
38. **Gerstel, U. & Romling, U. (2001).** Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**, 638-648.
39. **Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997).** Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**, 160-167.
40. **Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D. & Demple, B. (1990).** Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6181-6185.
41. **Hastings, J. W. & Nealson, K. H. (1977).** Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* **31**, 549-595.
42. **Hengge-Aronis, R. (1999).** Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 148-152.
43. **Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Kjelleberg, S. & Givskov, M. (2002).** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**, 87-102.
44. **Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2001).** Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**, 5395-5401.
45. **Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L. & O'Toole, G. A. (2003).** Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49**, 905-918.



46. Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Molin, S. & Eberl, L. (2001). The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517-2528.
47. Hyde, J. A., Darouiche, R. O. & Costerton, J. W. (1998). Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *J Heart Valve Dis* **7**, 316-326.
48. Itoh, T., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Kasai, H., Kimura, S., Kitagawa, M., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Mori, T., Motomura, K., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishino, Y., Oshima, T., Saito, N., Sampei, G., Seki, Y., Sivasundaram, S., Tagami, H., Takeda, J., Takemoto, K., Wada, C., Yamamoto, Y. & Horiuchi, T. (1996). A 460-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 40.1-50.0 min region on the linkage map. *DNA Res* **3**, 379-392.
49. Iuchi, S. & Lin, E. C. (1992). Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 3972-3980.
50. Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. & Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 290-301.
51. Kaplan, J. B., Meyenhofer, M. F. & Fine, D. H. (2003a). Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* **185**, 1399-1404.
52. Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N. & Fine, D. H. (2003b). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* **185**, 4693-4698.
53. Khoury, A. E., Lam, K., Ellis, B. & Costerton, J. W. (1992). Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *Am Soc Artif Intern Organs J* **38**, 174-178.
54. Kjelleberg, S. & Molin, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* **5**, 254-258.
55. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.
56. Kleckner, N., Bender, J. & Gottesman, S. (1991). Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol* **204**, 139-180.
57. Klemm, P. & Christiansen, G. (1990). The *fimD* gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* **220**, 334-338.
58. Landini, P. & Zehnder, A. J. (2002). The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**, 1522-1529.
59. Lee, S. F., Li, Y. H. & Bowden, G. H. (1996). Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* **64**, 1035-1038.
60. McLean, R. J., Whiteley, M., Stickler, D. J. & Fuqua, W. C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **154**, 259-263.

61. **Membrillo-Hernandez, J., Coopamah, M. D., Anjum, M. F., Stevanin, T. M., Kelly, A., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1999).** The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a Nitric oxide Releaser, and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *J Biol Chem* **274**, 748-754.
62. **Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
63. **Mittelman, M. W. (1998).** Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci* **81**, 2760-2764.
64. **Nealson, K. H. & Hastings, J. W. (1979).** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**, 496-518.
65. **Nishiyama, M., Vetsch, M., Puorger, C., Jelesarov, I. & Glockshuber, R. (2003).** Identification and characterization of the chaperone-subunit complex-binding domain from the type 1 pilus assembly platform FimD. *J Mol Biol* **330**, 513-525.
66. **O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V. J. & Kolter, R. (2000).** The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 425-431.
67. **O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998a).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.
68. **O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998b).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.
69. **O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B. & Kolter, R. (1999).** Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**, 91-109.
70. **Oshima, T., Aiba, H., Baba, T., Fujita, K., Hayashi, K., Honjo, A., Ikemoto, K., Inada, T., Itoh, T., Kajihara, M., Kanai, K., Kashimoto, K., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Masuda, S., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Motomura, K., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishino, Y., Saito, N., Sampei, G., Seki, Y., Tagami, H., Takemoto, K., Wada, C., Yamamoto, Y., Yano, M. & Horiuchi, T. (1996).** A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28.0 min region on the linkage map. *DNA Res* **3**, 137-155.
71. **Otto, K. & Silhavy, T. J. (2002).** Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2287-2292.
72. **Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293.
73. **Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. & Dorel, C. (2001).** Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. *J Bacteriol* **183**, 7213-7223.
74. **Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450-464.
75. **Rebbapragada, A., Johnson, M. S., Harding, G. P., Zuccarelli, A. J., Fletcher, H. M., Zhulin, I. B. & Taylor, B. L. (1997).** The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense

intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10541-10546.

76. Rivera, M., Hancock, R. E., Sawyer, J. G., Haug, A. & McGroarty, E. J. (1988). Enhanced binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharide from an aminoglycoside-supersusceptible, *tolA* mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 649-655.
77. Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. & Brun-Zinkernagel, A. M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* **175**, 4744-4755.
78. Romling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. & Normark, S. (1998a). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**, 722-731.
79. Romling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. & Reinkoster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**, 10-23.
80. Romling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. & Normark, S. (1998b). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**, 249-264.
81. Sabnis, N. A., Yang, H. & Romeo, T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* **270**, 29096-29104.
82. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
83. Sowers, G. (1999). The aerobic/anaerobic interface. *Curr Opin Microbiol* **2**, 181-187.
84. Schauder, S. & Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev* **15**, 1468-1480.
85. Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. & Klemm, P. (2003a). Differential Expression of the *Escherichia coli* Autoaggregation Factor Antigen 43. *J Bacteriol* **185**, 2236-2242.
86. Schembri, M. A., Kjaergaard, K. & Klemm, P. (2003b). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**, 253-267.
87. Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 262-280.
88. Schneider, D. A., Ross, W. & Gourse, R. L. (2003). Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 151-156.
89. Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gaasterland, T. & Riley, M. (2001). A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biology* **2**, RESEARCH0035.1-0035.7.
90. Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**, 81-104.
91. Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. & Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 983-997.

92. **Shih, P. C. & Huang, C. T. (2002).** Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **49**, 309-314.
93. **Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000).** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-764.
94. **Singh, R., Stine, O. C., Smith, D. L., Spitznagel, J. K. J., Labib, M. E. & Williams, H. N. (2003).** Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3412-3420.
95. **Skillman, L. C., Sutherland, I. W., Jones, M. V. & Goulsbra, A. (1998).** Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms. *Microbiology* **144**, 2095-2101.
96. **Spiro, S. & Guest, J. R. (1990).** Fnr and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 399-428.
97. **Stewart, P. S. (2003).** Diffusion in Biofilms. *J Bacteriol* **185**, 1485-1491.
98. **Stickler, D. (1999).** Biofilms. *Curr Opin Microbiol* **2**, 270-275.
99. **Stickler, D. J., Morris, N. S., McLean, R. J. & Fuqua, C. (1998).** Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum-Sensing Signal Molecules *In Situ* and *In Vitro*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3486-3490.
100. **Stoodley, P., deBeer, D. & Lewandowski, Z. (1994).** Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2711-2716.
101. **Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D. & Lappin-Scott, H. M. (1999a).** Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* **65**, 83-92.
102. **Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D. & Lappin-Scott, H. M. (1999b).** The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbiol* **1**, 447-455.
103. **Storz, G. & Imlay, J. A. (1999).** Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**, 188-194.
104. **Surette, M. G. & Bassler, B. L. (1998).** Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7046-7050.
105. **Tran, Q. H. & Udden, G. (1998).** Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *Eur J Biochem* **251**, 538-543.
106. **Tremoulet, F., Duche, O., Namane, A., Martinie, B. & Labadie, J. C. (2002).** A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 7-14.
107. **Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A. & Hirata, A. (2003).** Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 287-292.
108. **Ward, K. H., Olson, M. E., Lam, K. & Costerton, J. W. (1992).** Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol* **36**, 406-413.

109. **Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-2679.
110. **Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L. & Kolter, R. (2001).** The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* **39**, 223-235.
111. **Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A. J. & Romeo, T. (2000).** Global regulatory mutations in *csrA* and *tpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J Bacteriol* **182**, 1632-1640.
112. **Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Pruss, B. M., Babitzke, P. & Romeo, T. (2001).** Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**, 245-256.
113. **Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
114. **Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. (2001).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-864.
115. **Wolff, J. A., MacGregor, C. H., Eisenberg, R. C. & Phibbs, P. V. Jr. (1991).** Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **173**, 4700-4706.
116. **Yamamoto, Y., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Itoh, T., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mitsuhashi, N., Mizobuchi, K., Mori, H., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Oshima, T., Oyama, S., Saito, N., Sampei, G., Satoh, Y., Sivasundaram, S., Tagami, H., Takahashi, H., Takeda, J., Takemoto, K., Uehara, K., Wada, C., Yamagata, S. & Horiuchi, T. (1997).** Construction of a contiguous 874-kb sequence of the *Escherichia coli* -K12 genome corresponding to 50.0-68.8 min on the linkage map and analysis of its sequence features. *DNA Res* **4**, 91-113.
117. **Yang, H., Liu, M. Y. & Romeo, T. (1996).** Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J Bacteriol* **178**, 1012-1017.
118. **Ye, R. W., Wang, T., Bedzyk, L. & Croker, K. M. (2001).** Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J Microbiol Methods* **47**, 257-272.
119. **Yura, T., Mori, H., Nagai, H., Nagata, T., Ishihama, A., Fujita, N., Isono, K., Mizobuchi, K. & Nakata, A. (1992).** Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2.4 min region. *Nucleic Acids Res* **20**, 3305-3308.
120. **Zogaj, X., Nitz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Romling, U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**, 1452-1463.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALTA
PAGINA

99

CAPÍTULO 6. APÉNDICE

6.1. Artículo sometido**Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12.****Maritrini Colón-González and Jorge Membrillo-Hernández***

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Received:

Running title: Biofilm formation in *E. coli***Keywords: Biofilm/Escherichia/oxygen/extracellular signaling/anaerobic growth**

*Corresponding author:

Postal address:

Jorge Membrillo-Hernández
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
P. O. Box 70-228,
Coyoacán,
04510
Mexico City,
Mexico

Email: jmh@biomedicas.unam.mx

Tel. +52 55 56223840

Fax. +52 55 56223855

Abstract

Association with a surface in a structure known as biofilm is the prevailing microbial lifestyle. Here we show the kinetics of biofilm formation of *Escherichia coli* in static cultures growing under aerobic or anaerobic conditions. Aerobically growing cells in LB medium started to produce detectable amounts of biofilm after 4 to 8 h, displaying maximal accumulation of formed biofilm at 24 h, corresponding to the onset of stationary phase. Then an abrupt reduction in the biomass of the biofilm was observed. This decrease was not prevented by external addition of fresh nutrients and coincided with the depletion of oxygen as measured by the enzymatic activity of the AdhE protein. No biofilm formation was detected in cultures grown anaerobically in LB or LB supplemented with nitrate, nitrite, DMSO or fumarate, even after 72 h of incubation, well inside the stationary phase, suggesting that under anaerobic growth conditions *E. coli* cannot form biofilms.

1. Introduction

Bacterial lifestyle in natural environments occurs normally as a complex group of bacteria attached to a surface in a structure called biofilm rather than living in free-swimming, planktonic state [1]. It is known that biofilm-associated bacteria differ from their free-living counterparts, for example, biofilm-associated bacteria generally possess increased resistance to antimicrobial agents [2, 3]. Recent genetic and genomic studies have shown that biofilm is formed in multiple steps [4], in some organisms require intercellular signaling [5, 6], and, that a specific genetic profile of gene transcription is needed for biofilm formation [7].

Escherichia coli has been a useful model for the study of genetic determinants of biofilm formation [8, 9, 10]. Mutant cells lacking flagella (*fliC*, *flhC* or *flhD*) or affected in motility (*motB*) are severely impaired in their first steps of biofilm formation [9]. Recently, CsrA and RpoS were identified as key regulators of biofilm formation [11,12, 13]. In addition, the formation of biofilms is strongly influenced by the nutritional environment [9, 10].

Initial experiments performed by Christensen *et al.* [14] and O'Toole and Kolter [15, 16] have led to the establishment of a standard technique for the visualization and quantification of bacterial biofilm formation [10] where cells are first grown for 24 to 48 h without shaking in PVC microtiter dishes. Then the wells are rinsed with water and subsequently stained with 1% crystal violet for 20 min. This staining procedure allows the visualization of cells that are attached to the PVC surface as such cells are stained purple with crystal violet, whereas abiotic surfaces are not stained purple. This technique has proven to be useful for the isolation of mutants affected in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia coli* [15, 16, 17].

Previous observations [9, 15, 18, 19] showed that in most cases, highest amounts of formed biofilm are found at the air-liquid interface. A probable role of oxygen was suggested, however no experimental data was provided. In this communication, we report on the kinetics of biofilm formation of static cultures grown under aerobic or

anaerobic growth conditions. Our results strongly suggest that under anaerobic growth conditions *Escherichia coli* cannot form biofilms.

2. Material and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli W3110 [*F⁺ lam-In (rrnD-rrnE)1 rph-1*] was used throughout this study. Genetic crosses using bacteriophage P_{1vir} were carried out as previously described [20, 21]. For overnight (ON) cultures, an isolated colony was inoculated in 3 ml of LB [Luria Bertani medium (20)] supplemented with 100 mM 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS) and 0.2 % glucose (LB-MOPS) and grown at 37 °C [22]. Starting pH of the media before inoculation was 7.0 and after 72 h of growth was 7.4. Polyvinyl chloride dishes (PVC) microtitre wells containing 150 µl of LB-MOPS were inoculated with cells from an ON culture (starting OD_{600nm} = 0.1). When spent media were used for bacterial growth, two sequential centrifugation steps at 14000 g and a 0.45 µm filtration step were performed before re-inoculation with bacterial cells. Growth curves were determined by measuring the OD_{600nm}. For anaerobic growth conditions, Gas-Pak systems (BBL Sparks, MD) CO₂ jars were used following the manufacturer instructions.

2.2 Biofilm assays

Biofilm assays were carried out at 37 °C using 96-well, non-tissue culture-treated PVC dishes (Costar, Cambridge MA) as previously reported [10, 12]. Every experiment was performed in triplicate at least three times to confirm the results. To prevent evaporation, microtitre dishes were covered with a plastic box. Visualization of attached cells was performed by removing the cell culture, staining the wells with 1.0 % crystal violet for 20 min, and rinsing the wells three times with distilled water. Similar results were obtained when non-distilled water or fresh LB medium were used for rinsing.

Quantification was carried out spectrophotometrically at OD_{590nm} eluting the attached crystal violet with a solution 80% ethanol 20% acetone [8]. Standard Deviation (SD) was carried out for three independent experiments. Motility assays were performed on tryptone (1.3%) NaCl (0.7%) glucose (0.2%) agar (0.3%) plates as previously described [23].

2.3 Ethanol oxidoreductase assays

Cells were disrupted by sonication in an ice bath, and the centrifuged extracts were assayed for enzyme activity at 25°C as previously described [24]. The assay mixture (1 ml) consisted of 1.6 M Ethanol, 0.3 M potassium carbonate buffer (pH 10.0), and 0.66 mM NAD. The formation of NADH upon enzyme addition was monitored spectrophotometrically at 340 nm.

3. Results

3.1 *Escherichia coli* cannot form biofilm when grown under anaerobic conditions

Previous studies on bacterial biofilm formation have been focused on the aerobic biofilm formation after 24 or 48 h [10]. In order to shed light on the kinetics of biofilm formation we cultured *E. coli* W3110 strain in LB-MOPS under both aerobic and anaerobic growth conditions in PVC microtiter dishes and the formation of biofilm was monitored at different times of incubation. As shown in Fig. 1C, biofilm formation was evident after 8 h of incubation as a purple ring (after the crystal violet staining) at the air-liquid interface in aerobic static cultures. By contrast, no biofilm formation was observed in anaerobic cultures at the same times of incubation or even after 72 h (Fig. 1D). It is important to note that under both growth conditions, strain W3110 reached stationary phase after 15 h (aerobically) and 25 h (anaerobically) (Fig. 1A and 1B). To test if our observations were true for other wild-type *E. coli* strains, we tested strains MC4100, MG1655, and MC1061. In all cases, biofilm formation was not observed under

anaerobic growth conditions (data not shown). These results strongly suggest that under our experimental conditions, the presence of oxygen is required for biofilm formation in *E. coli*.

3.2 Is the depletion of oxygen a detachment signal for E. coli biofilms?

As it was shown in Fig. 1C, maximal amounts of biofilm formation were observed around 24 h of aerobic incubation, then a marked decrease in the amounts of biomass of formed biofilm was evident. This phenomenon is difficult to explain in terms of deficient attachment properties or a decrease in the growth rate because the biofilm observed after crystal violet staining is normally the result of a cumulative process. Our results would mean that biofilm is detaching from the wells after a certain period of incubation. One possibility is that cells are detaching from the wells in response to starving conditions, to test this hypothesis we added 0.2% glucose or fresh LB-MOPS to aerobic cultures grown for 24 h, in both cases, the kinetics of biofilm displayed in Fig. 1C was not altered despite the fact that the growth was reinitiated (Fig. 1A empty and filled circles respectively). Previous studies have shown that aerobic cultures reach anaerobiosis after 24 h of incubation even in shaking flasks [25]. Then, probably, anoxia is a detachment signal of biofilm formed by *E. coli*. To test this hypothesis, we incubated strain W3110 for 12 h in LB-MOPS medium under aerobic conditions (well inside into the biofilm-forming state; Fig. 1C) and then we transferred the cultures to anaerobic conditions for 4, 8, 12 or 24 h (Fig. 2A). After 4 h of anaerobic incubation, the amount of attached biofilm decreased dramatically by 40% as judged by the abrupt decline in crystal violet staining (Fig. 2A). A 90% decrease in biomass of formed biofilm was observed after 24 h of anaerobic incubation (Fig. 2A). As a control experiment, 12 h aerobic cultures were transferred to fresh PVC wells and incubated anaerobically. We observed no biofilm formation under anaerobic conditions starting from the 24 h aerobically grown cells even after 48 h of anaerobic incubation. On the other hand, anaerobically growing W3110 cells were transferred to aerobic conditions and biofilm formation was monitored. Invariably, biofilm formation was observed after 2 to 4 h after the shift to aerobiosis regardless of the growth phase of the culture (Fig. 2B). Taken

together, these results may indicate that lack of oxygen may be a detachment signal for *E. coli* formed biofilms.

To further explore whether under our experimental conditions, anaerobiosis is reached around 24 h of aerobic incubation, we determined the AdhE (NAD⁺ ethanol oxidoreductase) enzymatic activity of strain W3110 at different times during the aerobic growth cycle. AdhE is an Fe²⁺-containing oxidoreductase that suffers Metal-Catalyzed Oxidation (MCO) inactivation [24, 26], so that AdhE is inactivated upon exposure to oxygen. Thus, AdhE activity is a useful monitor of the oxygen presence in the cultures. As shown in Fig. 3, AdhE activity was heavily induced only after 18-24 h of incubation, suggesting that under our experimental conditions, anoxia may probably be reached around this period of time.

3.3 Biofilm formation under anaerobic growth conditions in the presence of different electron acceptors

In the absence of oxygen, *Escherichia coli* can use different electron acceptors such as nitrate, nitrite, DMSO (Dimethylsulphoxide plus molybdate) or fumarate [25]. In order to test whether the electron transport chain is involved in the biofilm formation of *E. coli*, we incubated W3110 cells aerobically or anaerobically in the presence of nitrate (40 mM), nitrite (5 mM), DMSO (40 mM + 0.1 mM molybdate) or fumarate (40 mM). In all cases, aerobic biofilm-formation was similar to that of LB-MOPS only cultures (Fig. 4). In the same way, anaerobic cultures supplemented with any of the different electron acceptors showed impaired ability of forming biofilm under anoxic conditions (Fig. 4). These results indicate that regardless the final electron acceptor, *Escherichia coli* is unable to form biofilm under anaerobic growth conditions.

3.4 Search for extracellular molecular signals that may be affecting biofilm formation under anaerobic conditions

It is now widely accepted that cell-cell signaling in some microorganisms is an important element in biofilm formation [5, 6]. Recently, it was reported that *E. coli* produces extracellular signals that may participate in quorum sensing and biofilm formation [12, 27, 28]. We then reasoned that the lack of biofilm formation under anaerobic growth conditions could be due to a failure in producing these molecular signals. To test this hypothesis we mixed anaerobically grown cells pellets (48 h) with spent media from a 24 h aerobic LB-MOPS culture (already in biofilm formation state) and incubated the mixture anaerobically for further 48 h. If there were a molecular signal in the aerobic supernatant, this would promote biofilm formation under anaerobic conditions. As shown in Fig. 5 no biofilm formation was observed under these conditions. Similar results were obtained when cell pellets from anaerobic cultures were incubated with anaerobic supernatants or fresh LB-MOPS medium and incubated anaerobically (Fig. 5). These results suggest that no promoting molecular signals for biofilm formation were present in supernatants from aerobically growing cultures that could induce biofilm formation under anaerobic conditions.

On the other hand, it may be possible that an extracellular signal produced under anaerobic conditions is preventing the formation of biofilm under these conditions. To test this possibility, we mixed aerobically grown cells (24 h) with anaerobic spent medium from 48 h cultures and the mixture was incubated aerobically. If there were an inhibitory signal in the anaerobic supernatant, a decrease in aerobic biofilm formation would be observed. As shown in Fig. 5, biofilm formation was not affected by the presence of an anaerobic supernatant. These results indicate that no inhibitory signal is present in the anaerobic spent media that prevents biofilm formation. Interestingly, a marked decrease in biofilm formation was observed when supernatants from aerobic cultures are used regardless the origin of the cell pellets (Fig. 5), suggesting the presence of a signal(s) molecule(s) that interfere with this process. This is in good agreement with previous results [12].

3.5 Swarming motility under anaerobic conditions

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

It has been reported that swarming motility and flagella are required for the early stages of biofilm development in *E. coli* [9, 15], consistent with this, *fliC*, *flhC*, *flhD*, *motA* and *motB* mutant strains are severely defective in biofilm formation [9]. We wondered whether the reason for the lack of biofilm formation under anaerobic growth conditions was the result of a defective or null motility or a defective flagella production. Therefore we tested the motility of strain W3110 on swarming plates supplemented with 0.2% glucose under aerobic or anaerobic conditions. As shown in Fig. 6, normal levels of motility were exhibited under anaerobic growth conditions. Mutant strain ZK408 (*flhC*) defective in the synthesis of flagella was used as a negative swarming control (Fig. 6). Our results indicate that motility is not severely affected under anaerobic conditions and that the failure in biofilm production is not due to an impaired motility.

4. Discussion

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

The importance of bacterial biofilms has been highly recognized by their negative impact on medical, industrial and environmental settings. Molecular studies have been focused on the genetic determinants of biofilm formation in different bacterial species [4, 8, 17]. Mutants affected in type I pili formation or motility are severely impaired in biofilm formation [9]. Other genetic determinants affecting biofilm formation include *rpoS*, *hns*, *rfa* and *dsbA* [12, 13, 29, 30, 31]. It is widely known that biofilm formation is affected by environmental conditions and physical factors such as pH and nutrient availability. During the first attempts to develop a method for the study of biofilms, Pratt and Kolter [9] observed that *Escherichia coli*-formed biofilms were evident as a ring only at the air-liquid interface suggesting an important role for oxygen in the formation of biofilms. Interestingly, the same pattern of biofilm formation was also observed in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* [10, 32].

In this communication we demonstrated that *E. coli* cannot form biofilm under anaerobic conditions on PVC microtiter dishes. Probably, this may explain why biofilm is formed as a ring mainly at the air-liquid interface of a culture. Why is oxygen required for biofilm formation in *E. coli*? Several lines of evidence point to suggest that oxygen *per se* is essential. First, apparently, no extracellular signals produced either aerobically

or anaerobically modify the amounts of biofilm formation under anaerobic conditions. The use of aerobic or anaerobic spent media suggested that no signals are involved in this process (unless there is a oxygen-sensitive negative signal produced under anaerobic conditions; Fig. 5). Second, aerobically growing cells (and in a forming-biofilm status) stop biofilm formation and/or start biofilm dispersal after a shift to anaerobiosis (Fig. 2). Third, the respiratory system is not involved in this process since the presence of alternative electron acceptors such as nitrate, fumarate, nitrite and DMSO-molybdate did not support biofilm formation under anaerobic respiratory conditions (Fig. 4). Fourth, motility, an essential requirement for biofilm formation, is not severely affected by the absence of oxygen (Fig. 6).

Availability of oxygen is critical for triggering the synthesis of a high number of proteins involved in the aerobic or anaerobic metabolism. Our attempts of selecting a mutant with the ability to form biofilm anaerobically were unsuccessful. This result may indicate that either 1) the gene responsible for a negative signal for biofilm formation under anaerobic conditions is essential or 2) oxygen is essential for biofilm formation. Our results cannot rule out any of these two possibilities.

Several polysaccharide lyases, proteases and nucleases may be participating in the detachment process [33]. It would be very interesting to study the pattern of expression of the genes encoding any of these proteins under aerobic or anaerobic growth conditions.

To our knowledge, this is the first time that a chemical element which is not essential for growth is demonstrated to be essential for biofilm formation. It is important to note that *E. coli* is a facultative organism that has a fast grow rate under anaerobic respiratory conditions provided there is an alternative electron acceptor available. On the other hand, mostly-aerobic organisms such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Mycobacterium tuberculosis* form biofilm in the same way as *E. coli*. The essential role of oxygen in biofilm formation in *Escherichia coli* becomes relevant if we consider that during the course of the dental plaque biofilm formation, where many strict anaerobes such as *Fusobacterium nucleatum*, and *Bacteroides forsythus* require the previous attachment of an aerobe or a facultative organism to start the formation of biofilm [34, 35]. Experiments are under way to determine whether extracellular signals present in

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anaerobic cultures of dental plaque forming organisms can induce biofilm formation in *Escherichia coli* in the absence of oxygen.

Recently, Ren *et al.* [36] identified an exogenously produced furanone compound as a negative signal of *E. coli* biofilm formation, we cannot rule out the possibility that a similar compound be involved in the negative regulation of biofilm formation under anaerobic conditions. Alternatively, the presence of some surface polysaccharides lyases or adhesins may be genetically regulated depending on the availability of oxygen. Experiments are under way to test this possibility. Interestingly, an alginate lyase homologue gene (*ycbN*) is present in *Escherichia coli*. The key enigma highlighted by this study is the essential requirement for oxygen in the process of biofilm formation. Our unsuccessful attempts to isolate a mutant that lifted the oxygen requirement led us to think that oxygen may be a structural part of the biofilm complex constitution.

Acknowledgements

This work was supported by Grants J33369-N from CONACyT, IN205200 from PAPIIT UNAM and 00-419 RG/BIO/LA from TWAS. M.C.-G. is a Bsc. Scholar from PAPIIT UNAM. We thank Laura Camarena for advice on the motility assays. We are grateful to Mary Berlyn and Roberto Kolter for strains used in this work, and to Miguel Páez Silva and Luis Delgado for technical assistance. We are also grateful to the members of the Membrillo-Hernández lab for critical comments on the manuscript. Special thanks are given to the anonymous referees for their criticisms and improvement of the writing style.

References

- [1] Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745
- [2] Hoyle, B.D. and Costerton, J.W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37, 91-105

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [3] Ichimiya, T., Yamasaki, T. and Nasu, M. (1994) *In-vitro* effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Antimicrob- Chemother.* 34, 331-341
- [4] Watnick, P.I. and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 34, 586-595
- [5] Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582-587
- [6] Shih, P.C. and Huang, C.T. (2002) Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 309-314
- [7] Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860-864
- [8] Genevaux, P., Muller, S. and Bauda, P. (1996) A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 27-30
- [9] Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30, 285-293
- [10] O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. and Kolter, R. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 91-109
- [11] Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E. and Romeo, T. (2002) Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 290-301

- [12] Corona-Izquierdo, F.P. and Membrillo-Hernández, J. (2002) A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. FEMS Microbiol. Lett. 211, 105-110
- [13] Adams, J.L. and McLean, R.J. (1999) Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4285-4287
- [14] Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37, 318-326
- [15] O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30, 295-304
- [16] O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28, 449-461
- [17] Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. (2001) Biofilm formation as a developmental process. Methods Enzymol. 336, 19-26
- [18] Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. (2000a) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. J. Bacteriol. 182, 3593-3596
- [19] Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L. and Kolter, R. (2000b) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. Mol. Microbiol. 37, 424-432
- [20] Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [21] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [22] Corona-Izquierdo, F.P. and Membrillo-Hernandez, J. (2002) Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). Res. Microbiol. 153, 181-185
- [23] Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. and Mizuno, T. (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. Mol. Microbiol. 40, 440-450
- [24] Membrillo-Hernandez, J. and Lin, E.C.C. (1999) Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: transcription from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS. J. Bacteriol. 181, 7571-7579
- [25] Tran, Q.H. and Uden, G. (1998) Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. Eur. J. Biochem. 251, 538-543
- [26] Membrillo-Hernandez, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J. and Lin, E.C. (2000) Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. J. Biol. Chem. 275, 33869-33875
- [27] Surette, M.G. and Bassler, B.L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95, 7046-7050
- [28] Stickler, D. (1999) Biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 2, 270-275
- [29] Landini, P. and Zehnder, A.J. (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. J. Bacteriol. 184, 1522-1529
- [30] Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M.S. and Oudega, B. (1999a) Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. Arch. Microbiol. 172, 1-8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [31] Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M.S. and Oudega, B. (1999b) Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 173, 403-409
- [32] Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter, R. (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. 39, 223-235
- [33] Boyd, A., Chakrabarty, A.M. (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2355-2359
- [34] Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K. and Allison, C. (1997) Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. Lett. Appl. Microbiol. 25, 385-387
- [35] Wimpenny, J. (1994) The spatial organization of biofilm, p.16. In J. Wimpenny, W. Nichols, B. Stickler, and H. Lappin-Scott. (ed.) Bacterial Biofilms and their control in medicine and industry. Bioline, Cardiff, U.K.
- [36] Ren, D., Sims, J.J. and Wood, T.K. (2001) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)- 4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. Environ. Microbiol. 3, 731-736

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Legends to figures

Fig 1. Growth curves and biofilm formation of static cultures of *Escherichia coli* W3110 at different times of incubation under aerobic or anaerobic conditions. *E. coli* cells were cultured at 37 °C in LB-MOPS media aerobically (A and C) or anaerobically (B and D) on PVC microtiter dishes. Crystal violet biofilm detection assay was performed at the indicated times (C and D). Quantification of biofilm formed under aerobic (C) or anaerobic (D) conditions is shown. Standard Deviation (SD) is shown in the graph (n=3). One arbitrary unit corresponds to the OD_{590 nm} at the start of the curve (Time = 0). The growth curves of aerobically (A) or anaerobically (B) growing cultures are shown. In A: Filled squares: W3100 in LB-MOPS medium. Filled circles: LB-MOPS medium but supplemented with 0.2% glucose at 24 h (arrow). Empty circles: LB-MOPS medium supplemented with fresh LB-MOPS medium at 24 h-of cultivation (arrow). In B: Empty squares: LB-MOPS medium. Empty circles: LB-MOPS medium supplemented with nitrate (40 mM). Empty triangles: LB-MOPS medium supplemented with glucose 0.2%

Fig. 2. Biofilm formation after a shift from aerobic to anaerobic (A) or from anaerobic to aerobic culture conditions (B). A 12 h LB-MOPS aerobic culture was shifted to anaerobic conditions. Biofilm formation was monitored before (a) and after 4 h (b), 8 h (c), 12 h (d), and 24 h (e) of anaerobic growth. Inset: crystal violet stained wells of a typical experiment. Graph indicates the percentage of remaining crystal violet attached to the wells. 100% corresponds to the OD_{590nm} of a 24 h aerobically grown culture. Bars indicate SD (n=3). B) Crystal violet stained wells of a typical experiment of a shift from anaerobic to aerobic culture conditions.

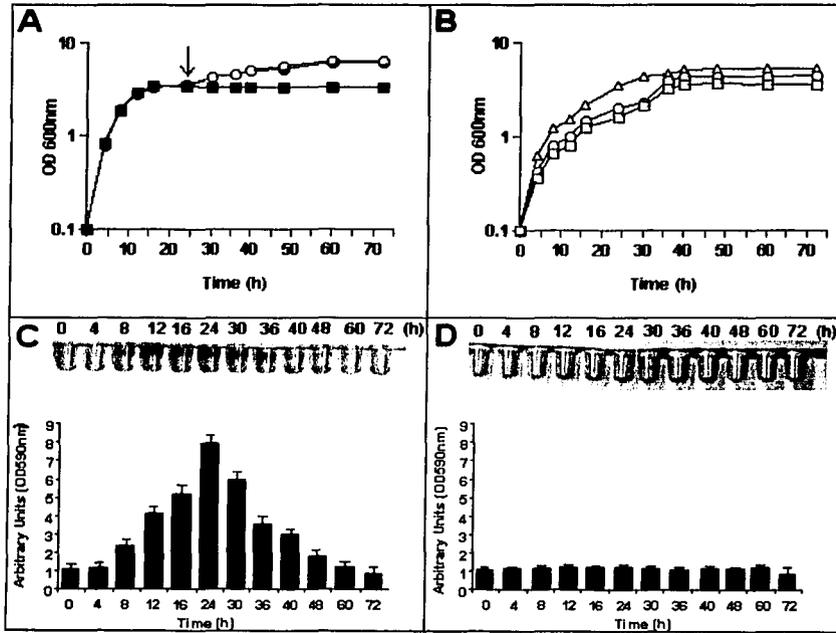
Fig. 3. AdhE specific activity of strain W3110 during aerobic culture conditions. Cultures were grown in LB-MOPS and incubated at 37 °C. Samples were removed at the indicated times and the AdhE activity was determined. Bars indicate SD (n=3). Activity is reported as nanomoles of NADH produced per minute per milligram of protein.

Fig. 4. Effect of the presence of different electron acceptors on the biofilm formation in cultures of strain W3110 grown aerobically or anaerobically. Crystal violet assay was performed in wells of static cultures of 24 h (aerobic; right panel) and 48 h (anaerobic; left panel). Cells were grown in the presence of nitrate (40 mM), nitrite (5 mM), DMSO (40 mM + 0.1 mM molybdate) or fumarate (40 mM) as indicated.

Fig. 5. Effect of different spent media or fresh LB-MOPS on biofilm formation by *E. coli*. Inset: Crystal violet staining of PVC wells where cell pellets or supernatants from 24 h aerobic (a) or 48 h anaerobic (b) were harvested. Mixture of cell pellets with different supernatants was carried out as indicated. Biofilm formation was quantified after further 24h (aerobic, +O₂, top row) or 48 h (anaerobic, -O₂, bottom row). The experiment was repeated at least three times with similar results. Results from a typical experiment are shown.

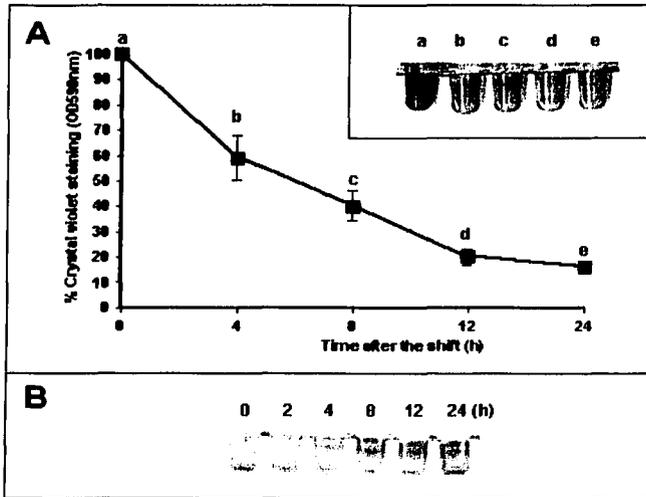
Fig. 6. *Escherichia coli* swarming motility assays under aerobic or anaerobic conditions. Strains W3110 (wild-type) and ZK408 (*flhC*) were spotted onto soft tryptone motility plates supplemented with 0.2% glucose and incubated under aerobic (+O₂) or anaerobic (-O₂) growth conditions for 8 h and 12 h respectively.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



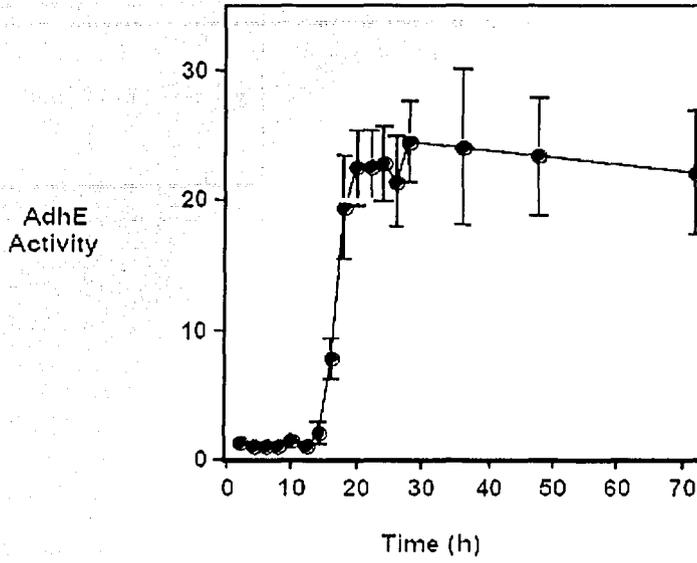
Colón-González Fig. 1

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



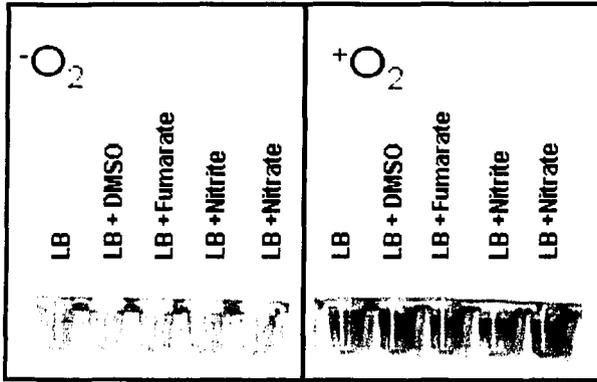
Colón-González Fig. 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



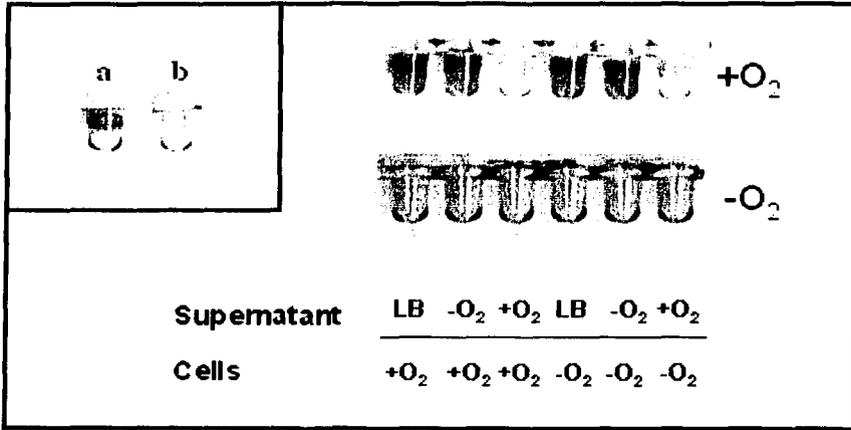
Colón-González Fig. 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



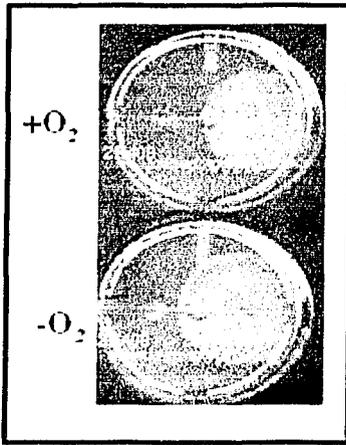
Colón-González Fig. 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Colón-González Fig. 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Colón-González Fig. 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2. Capítulo en "Microbios on line"

COMUNICACIÓN ENTRE BACTERIAS

Maritrini Colón-González y Jorge Membrillo-Hernández.

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-228. 04510 Coyoacán, D. F. Email: jmh@biomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Uno de los paradigmas más grandes en la microbiología es la concepción de la existencia de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar una nueva bacteria, cada una, idéntica a la otra. Sin embargo, desde hace más de 60 años se ha sugerido que lejos de esta conducta aislada, puede existir una conducta bacteriana en grupo, la cual sigue la norma "la unión hace la fuerza". Pero si las bacterias realmente pueden tener una conducta como grupo, entonces se hace necesaria la existencia de un sistema de comunicación entre ellas, a través del cual puedan "votar y decidir" que les conviene y actuar en grupo para conseguirlo.

En 1962, McVittie y colaboradores, sugirieron la posibilidad de esta forma de comunicación durante el proceso de formación del cuerpo fructífero en *Myxococcus xanthus* (McVittie, 1962). A ellos siguió la evidencia de una posible molécula señalizadora en Neumococos, la cual era liberada al medio en una manera dependiente de densidad celular y a la que relacionaron con el fenómeno por el cual este organismo incorporaba DNA exógeno, llamado competencia, haciendo una analogía de este sistema de comunicación al de las hormonas en organismos superiores.

De esta forma se fueron identificando otros mecanismos similares que comprobaron que las bacterias, se comunican entre sí, que tienen "voz y voto" y que pueden unir esfuerzos para llevar a cabo funciones de las cuales se benefician en conjunto.

“QUORUM SENSING”

En 1994, Fuqua y colaboradores usaron el término “quorum sensing” para describir un fenómeno dependiente de densidad celular (Fuqua *et al.*, 1994). Este proceso esta basado en la producción de moléculas que sirven como señales cuya concentración depende de la densidad del organismo que la produce. Una vez que estas moléculas o autoinductores alcanzan el umbral de detección, inducen diferentes fenómenos en la célula.

Existen diferentes formas de comunicarse con las demás bacterias; básicamente estas se agrupan en dos: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación a través de acil homoserina lactonas, lenguajes usados por bacterias gram positivas y proteobacterias respectivamente (Kleerebezem *et al.*, 1997a; Lazazzera y Grossman, 1998), ambas moléculas son llamadas autoinductores.

MECANISMOS MOLECULARES DE SEÑALIZACIÓN CÉLULA-CÉLULA

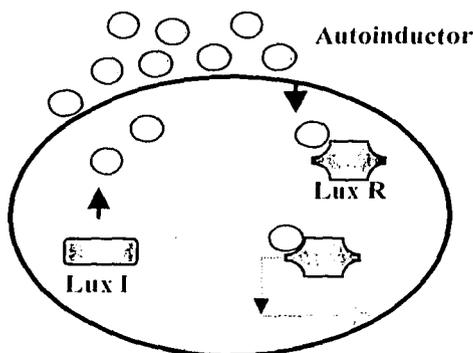
A) Lux I - Lux R

El proceso de “quorum sensing” fue observado por primera vez en *Vibrio fischeri* (Hastings y Nealson, 1977) una bacteria gram-negativa que vive como simbiote en algunas especies animales marinas. En ésta relación el hospedero provee nutrientes a la bacteria y la bacteria a cambio genera luz que sirve al pez para atraer presas, alejar depredadores u otras actividades.

Engbrecht y Silverman (1984, 1987) demostraron que se necesitan de dos componentes reguladores para dirigir el proceso de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, estos componentes son LuxI, que cataliza la producción de la acil homoserina lactona (acil-HSL) y LuxR, un regulador transcripcional que al unirse a la acil-HSL activa el operón de luciferasa .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La comunicación entre proteobacterias se lleva a cabo mediante homólogos del sistema LuxI/LuxR y este sistema canónico de *V. fischeri* se ha encontrado en más de 25 especies (Fuqua *et al.*, 1996; Bassler, 1999; de Kievit e Iglewski, 2000; Miller y Bassler 2001; Shaw *et al.*, 1997). Las moléculas que actúan como palabras son las acil homoserina lactonas, que se difunden libremente a través de la membrana y se acumulan a alta densidad celular. El cognado para LuxI es LuxR, que reconoce al autoinductor y se activa regulando la expresión de diversos genes (Fig. 1).



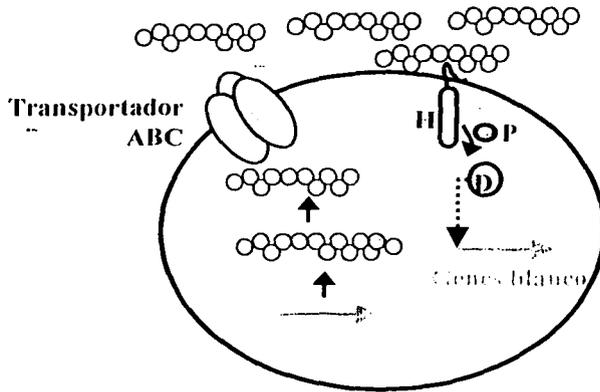
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig.1. La proteína sintasa Lux I cataliza la producción de moléculas autoinducidas que difunden libremente por la membrana y cuya concentración aumenta con la densidad celular. Una vez que estas moléculas pasan el umbral de detección se unen a la proteína Lux R que en complejo con el autoinductor actúa como regulador de la expresión de ciertos genes.

B) Péptidos

La comunicación entre bacterias gram positivas se lleva a cabo a través de oligopéptidos modificados que al igual que las homoserinas lactonas, son excretadas al medio en forma dependiente de la fase de crecimiento.

Una vez que los precursores de los péptidos son sintetizados, estos son procesados y modificados para obtener el péptido maduro, el cual es exportado mediante un transportador de la familia ABC (*ATP-Binding-Cassette*). La detección de estos péptidos se lleva a cabo mediante un sistema de dos componentes que transducen la señal por un mecanismo de fosforilación/defosforilación (Kleerebezem *et al.* 1997b; Fig. 2).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

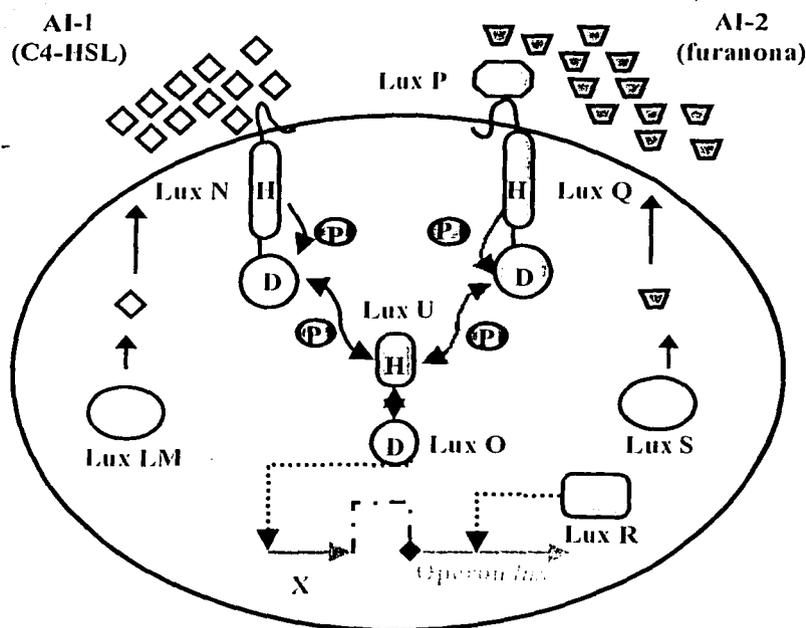
Fig.2. El pre-péptido sintetizado es modificado y posteriormente exportado por un transportador ABC, la acumulación del péptido señal responde a la densidad celular, una vez que pasa el umbral, es detectado por un sistema de dos componentes que mediante una cascada de fosforilación activan proteínas que regulan la expresión de genes blanco.

C) *Vibrio harveyi* como modelo

El quorum sensing fue originalmente estudiado en la bacteria marina *Vibrio harveyi* (Bassler *et al.* 1997). *V. harveyi* es una bacteria muy relacionada a *V. fischeri*, pero ésta no vive como simbiote y se le puede encontrar en forma de vida libre en las aguas marinas. *V. harveyi* usa el sistema de quórum sensing para controlar bioluminiscencia, sin embargo ésta no sólo emplea un sistema canónico LuxR/LuxI (Bassler *et al.* 1993, 1994a,b). Además de ello posee un circuito de quórum "mixto" con características de bacterias gram positivas y gram negativas. Al igual que las bacterias gram negativas, utiliza acil-HSL como autoinductor, pero ésta es detectada por un sistema de dos componentes similar al que poseen las gram positivas. Además se ha encontrado un nuevo sistema de quórum sensing que permite la comunicación entre *V. harveyi* y bacterias de otras especies, tanto gram-positivas como proteobacterias..

V. harveyi produce dos autoinductores denominados AI-1 y AI-2 (Bassler *et al.* 1993, 1994a). AI-1 es una acil-HSL, (Cao y Meighen, 1989) cuya síntesis depende de *luxM* (Bassler *et al.*, 1993). LuxLM lleva a cabo las reacciones enzimáticas para la

producción de HSL a partir de S-adenosil-metionina (SAM) y la proteína acarreadora de grupos acil (acil-ACP). El segundo autoinductor, AI-2 ha sido caracterizado como una furanona (Schauder *et al.*, 2001), cuya síntesis depende de la proteína LuxS (Surette *et al.*, 1999; Fig. 3).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig.3. *Vibrio harveyi* usa dos formas de lenguaje para comunicarse, una de ellas es entendida por otras especies, dicho esperanto bacteriano esta basado en un compuesto de furanona (AI-2), que es percibido por el sistema LuxP/Q; el lenguaje intraespecie se lleva a cabo por homoserinas lactonas, que son percibidas por el sistema de dos componentes Lux N/Lux U. Ambos sistemas activan mediante una cascada de fosforilación a la proteína Lux O, que en su estado activo (Lux O-P) bloquea la activación del operón *lux* posiblemente vía una proteína intermediaria desconocida (X).

Recientemente Chen *et al.* (2002) caracterizaron y determinaron la estructura del autoinductor 2. La estructura contiene dos anillos de cinco miembros fusionados, con un átomo de boro que forma un diéster derivado de borato. La estabilización del AI-2 se lleva a cabo por numerosas interacciones polares y cadenas positivas de LuxP que sirven para estabilizar la carga negativa del boro (Fig. 4).

TESIS CON
FUNDAMENTO DE ORIGEN

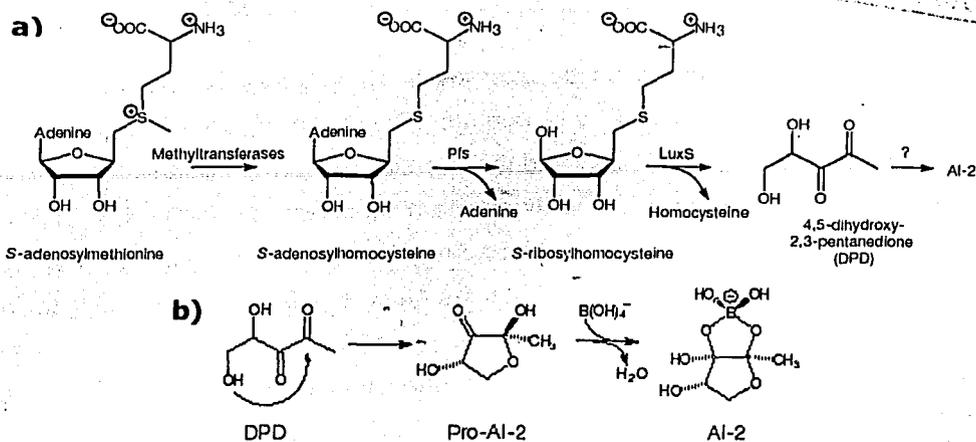


Fig.4. a) Biosíntesis del precursor de AI-2 (DPD) a partir de SAM (S-adenosil-metionina) b) Síntesis de AI-2 a partir de DPD y borato. Tomadas de Chen *et al.*, 2002.

D) El sistema de comunicación de *Myxococcus xanthus*

Las mixobacterias son bacterias gram negativas móviles que colonizan hábitats como hojas secas, madera y otros ambientes (Reichenbach, 1993). Aunque las mixobacterias fueron originalmente clasificadas como hongos, hoy en día ha sido ampliamente aceptado que son bacterias especiales que tienen un comportamiento social complejo. *M. xanthus* libera antibióticos para matar organismos vecinos y al romper sus células utiliza esas macromoléculas mediante una amplia batería de enzimas hidrolíticas. La formación de cuerpos fructíferos es el comportamiento social más estudiado en ésta bacteria. Cuando células de *M. xanthus* están privadas de nutrientes a una alta densidad de crecimiento (unas 100,000 células), empiezan a desplazarse a centros de agregación donde forman una estructura multicelular llamada cuerpo fructífero. Las células dentro de ésta estructura se diferencian de una forma de barra a unas células esféricas que son resistentes a diversos tipos de estrés como el calor y desecación, a éstas células diferenciadas se les conoce como mixoesporas. La

formación de cuerpos fructíferos probablemente ayuda a la dispersión de mixoesporas y asegura que las esporas germinen (Dworkin y Kaiser, 1985; Fig. 5).

Se sabe que por la formación de cuerpos fructíferos se requiere a) limitación de nutrientes b) alta densidad celular y c) una superficie sólida. ¿Cómo es que las células de *M. xanthus* perciben éstas condiciones, se sincronizan e inician el desarrollo del cuerpo fructífero?, ¿Cómo se coordinan para desplazarse hacia los centros de agregación? ¿Qué señalización molecular se requiere para darle esa forma de pajar al cuerpo fructífero?. Experimentos con mutantes afectadas en el proceso de la formación de cuerpos fructíferos han dado gran información acerca del proceso de señalización. La observación inicial clave fue el hecho de que mutantes afectadas en un paso del proceso podrían ser complementadas por otra mutante afectada en otro paso y que pudiera producir la moléculas faltantes de la primera, así la complementación se debería dar sólo entre mutantes que tuvieran afectada la producción de señales diferentes (Hagen *et al.*, 1978).

Un grupo de mutantes (*asg*) se caracteriza por estar afectadas en el desarrollo temprano de la formación del cuerpo fructífero. Al analizar genéticamente éstas mutantes se encontró que estaban afectadas en la producción de una señal extracelular llamada molécula señal A. Esta señal es liberada por una cepa silvestre al medio de cultivo después de aproximadamente una hora de que las células se encuentran en un estado de limitación de nutrientes (Kuspa *et al.*, 1986). La molécula señal A al parecer es una combinación de dos actividades,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

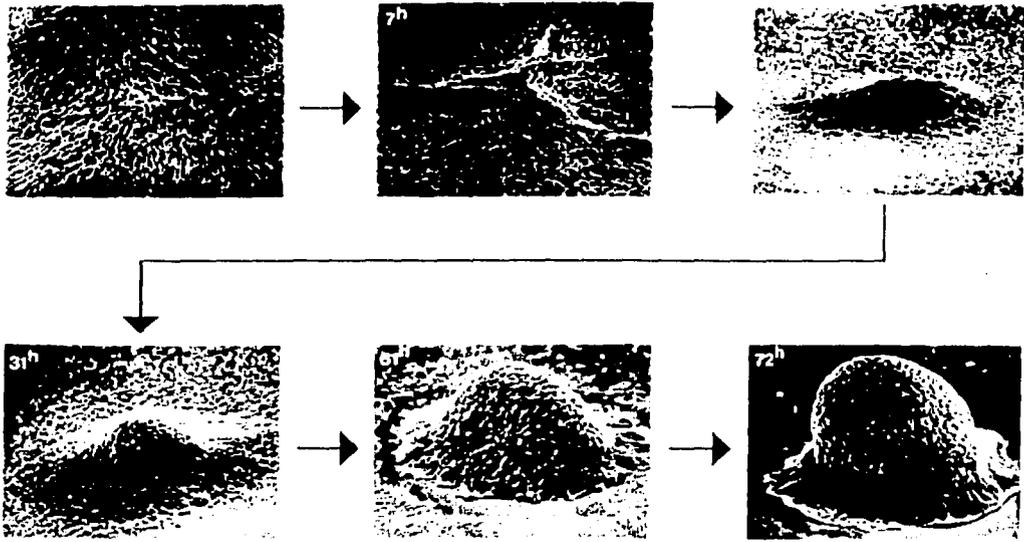


Fig.5. Establecimiento de un cuerpo fructífero en *Myxococcus xanthus*. Tomado de Kuner and Kaiser, 1981.

una sensible al calor que se ha identificado como una mezcla de proteasas y una actividad resistente al calor, que es una mezcla de aminoácidos y péptidos, lo que apoya fuertemente que la verdadera molécula señal A son péptidos y amino ácidos generados como consecuencia de proteolisis extracelular (Kuspa *et al.*, 1992). Al analizar el sitio de las mutaciones *asg* que afectan la producción de la molécula señal A se encontró a tres loci no contiguos: *asgA*, *asgB* y *asgC* (Kuspa y Kaiser, 1989). El gene *asgA* codifica para la histidín cinasa AsgA que tiene dominios conservados entre las proteínas detectoras de los sistemas de dos componentes en bacterias (Parkinson y Kafoid, 1992), con la única diferencia que al parecer no tiene dominio transmembranal (Plamman *et al.*, 1995). El gene *asgB* codifica para un polipéptido de 163 amino ácidos con un domino de unión a DNA cerca de su extremo carboxilo terminal (Plamman *et al.*, 1994). El gene *asgC* codifica para un factor sigma cuya actividad quizás sea afectada por moléculas como el ppGpp durante fase estacionaria de crecimiento (Hernández y Cashel, 1995). Probablemente, el papel de AsgA en la generación de la molécula señal A es servir como un detector de la señal de hambruna y transducir ésta señal a un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

regulador de respuesta (AsgB) quien en su forma no fosforilada actuaría como un represor de desarrollo temprano del cuerpo fructífero. Este evento podría permitir al factor sigma AsgC transcribir aquellos genes blanco necesarios para la generación de la molécula señal A (Kaplan *et al.*, 1991). El estudio de genes regulados por la molécula señal A ha puesto al descubierto un sistema de obtención y respuesta de la señal A que involucra a las histidín cinasa SasS y a su regulador de respuesta SasR, quien es un factor transcripcional de genes que específicamente responden a la señal A. SasN es un regulador negativo de ésta respuesta (Yang y Kaplan, 1997; Fig. 6).

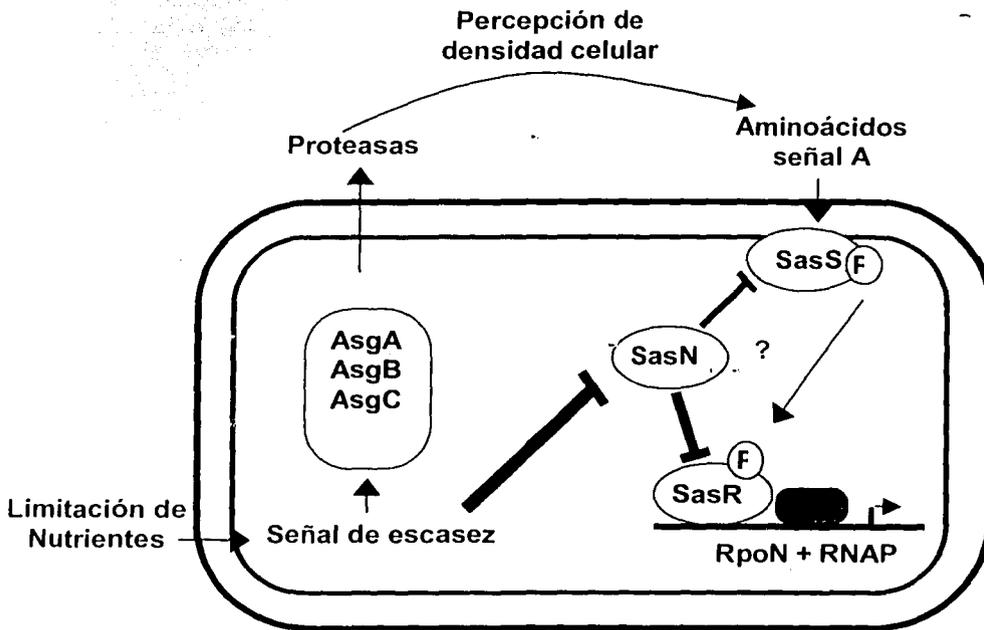


Fig. 6. Sistema de comunicación celular en *Myxococcus xanthus*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COMPUESTOS MICROBIANOS: MENSAJES MOLECULARES

Para defenderse de organismos competitivos, muchas bacterias secretan péptidos que tienen actividad antimicrobiana (AMBs). En general, estos péptidos son ricos en cisteínas y de naturaleza hidrofóbica (Klaenhammer, 1993). Existen dos familias principales de péptidos antimicrobianos (AMP "Antimicrobial Peptides):

A) Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias químicas con actividad bactericida de naturaleza proteica que son producidas por células procariontes y eucariontes. El término bacteriocina fue originalmente usado para definir a las proteínas antimicrobianas parecidas a la colicina producida por *Escherichia coli*, pero se diferencian por sus pesos moleculares y espectro de actividad inhibitoria (Pattus *et al.*, 1990; Konisky, 1982; Pugsley, 1984). El grupo más estudiado de bacteriocinas lo constituyen las producidas por bacterias láctico-ácidas. Las bacteriocinas encontradas en gram positivos son muy pequeñas y consisten de 30 a 60 aminoácidos, por lo que son denominadas bacteriocinas peptídicas (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996).

Existen dos grupos principales de bacteriocinas formadas por péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos, que actúan rompiendo la membrana celular de las células blanco. El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas va de un pequeño grupo de microorganismos relacionados y que compiten por el mismo ambiente (Dykes, 1995) hasta un amplio grupo de microorganismos que incluye especies no relacionadas (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997). La clase I de bacteriocinas la forman los lantibióticos, mientras que la clase II la forman péptidos que generalmente no tienen modificaciones postraduccionales en los aminoácidos que los forman y que incluyen a moléculas producidas por bacterias gram positivas y algunas proteobacterias.

Los lantibióticos constituyen una familia no común de péptidos con actividad biológica antimicrobiana, se cree que forman poros transitorios en la membrana (Sahl, 1991), contienen residuos insaturados como dehidroalanina y dehidrobutirina, se

caracterizan por tener puentes intramoleculares tioéter (-metil), denominados lantioninas, formados por la adición de un grupo sulfidrido derivado de la cisteína. Estos puentes determinan la estructura policíclica de los lantibióticos dando origen a los grupos A (estructura lineal) y al grupo B (circular; Jung, 1991).

Los lantibióticos del grupo A que han sido caracterizados son producidos por una variedad de bacterias gram positivas como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivaris*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus sake* y *Lactococcus lactis*. Este último produce el antibiótico más estudiado: nisina.

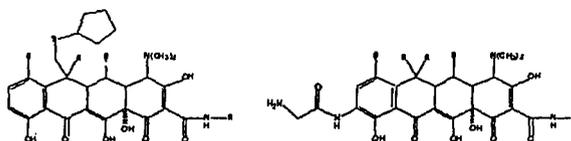


Fig.7. Estructura de la nisina (derecha) y la Z-nisina (izquierda), un derivado de ésta molécula.

La subtilisina es un lantibiótico estructuralmente relacionado con la nisina, es producido por cepas de *B. subtilis*. Su biosíntesis es regulada de manera dependiente a la fase de crecimiento, muy parecida a la nisina, iniciando su producción durante la fase media a la fase tardía de crecimiento logarítmico y alcanzando la máxima producción en la fase estacionaria temprana (Gutowski-Eckel *et al.*, 1994). La subtilisina además de actuar como antimicrobioano (AMB) también actúa como un péptido de feromona secretado, que induce su propia biosíntesis estimulando la transducción de señales del sistema de dos componentes en una manera dependiente de "quorum sensing" (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Dunny y Leonard, 1997).

Los mecanismos reguladores para la secreción de bacteriocinas están basados en un péptido que funciona como feromona, designado IP (Inducer Peptide) que actúa como señal para un sistema de "quorum sensing" y regula la biosíntesis de varias proteínas de acuerdo a la densidad celular. En *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus*

sake se encontraron los genes IP-C11 e IP-673 respectivamente que producen IPs que disparan la producción de bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1998; Eijsink *et al.*, 1996). Estudios recientes han demostrado que algunos *Lactobacilos* producen más de una bacteriocina. Se ha propuesto que los IPs inducen la producción de una serie de péptidos antimicrobianos, que proveen a la bacteria de una mayor capacidad de competencia. Existe similitud entre los IPs y las bacteriocinas, ambos son péptidos catiónicos, parcialmente anfipáticos producidos como pre-péptidos con una secuencia líder en el N-terminal que contiene dos glicinas, lo que sugiere que son procesados y transportados por el mismo sistema ABC (Eijsink *et al.*, 1996; Hauge *et al.*, 1998). La principal diferencia entre las bacteriocinas y los IPs es su longitud, la bacteriocina más pequeña esta formada por más de 30 residuos, mientras que el IP más grande conocidos hasta ahora esta formado por 26 residuos de aminoácidos aunque algunos péptidos más pequeños pueden funcionar como IPs (Diep *et al.*, 1995).

Los IPs son muy específicos para cada especie, aunque algunos de ellos tienen una identidad de hasta 44% (Brurberg *et al.*, 1997). Las concentraciones necesarias para que lleven a cabo su función son generalmente menores a las concentraciones requeridas por las bacteriocinas, se han reportado concentraciones de inducción de 0.1 nM para *L. plantarum* y *L. sake* (Diep *et al.*, 1995; Eijsink *et al.*, 1996) y del orden femtomolar para *Enterococcus faecium* (Nilsen *et al.*, 1998).

El sistema de transducción de señales usado para la síntesis de bacteriocinas es un sistema de dos componentes que cotranscribe con el péptido inductor. Las proteínas histidina cinasa encontradas en este sistema, poseen una secuencia muy conservada dentro de las proteínas de la misma familia que se localiza en el extremo carboxilo terminal (200 residuos) y corresponde al sitio de unión a ATP. El dominio amino terminal contiene residuos hidrofóbicos que podrían formar alfa-hélices transmembranales. Mientras que en la mayoría de las histidina cinasas poseen dos regiones transmembranales, las que se asocian a los IPs tienen de 6 a 8 (Diep *et al.*, 1994; Håvarstein *et al.*, 1996). Algunos estudios han demostrado que la especificidad para la feromona correspondiente se encuentra en el amino terminal de la histidina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cinasa (Håvarstein *et al.*, 1996) Debido a que se conoce que los IPs adoptan una estructura parcial alfa-hélice en presencia de solventes parecidos a membrana y liposomas (Eijlsink *et al.*, 1996; Hauge *et al.*, 1998) se podría inferir que su interacción con la cinasa involucra una interacción previa del IP con la membrana.

El siguiente paso en la transducción de señales es la activación de una proteína de unión a DNA o regulador de respuesta mediante una cascada de fosforilación, dicha proteína se une río arriba del sitio de inicio de transcripción de genes blanco. Esta proteína parece unirse como dímero a secuencias conservadas en las regiones -40 y -80 que posee repeticiones directas, aunque otros estudios han sugerido que se une a repeticiones directas en otro sitio, cuya localización se desconoce (Risøen *et al.*, 1998).

Dentro de este mecanismo regulador, se puede esperar que exista transcripción constitutiva de algunos genes requeridos para la producción de IPs que a cierta concentración puedan disparar la vía de autoinducción, aumentando rápidamente la transcripción de genes requeridos para la biosíntesis de bacteriocinas. La regulación de la síntesis de bacteriocinas por densidad celular proporciona ventajas para poder competir en el nicho ecológico.

B) Butirolactonas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El género *Streptomyces* pertenece a las bacterias gram positivas y tiene un ciclo de vida complejo. En las fases tempranas de crecimiento se forma una espora que germina para formar un micelio multinucleado, este proceso ocurre principalmente por medio de la extensión de pared celular en las puntas de las hifas. En respuesta a limitación de nutrientes se forma el micelio aéreo y las hifas que lo forman se segmentan en partes uninucleadas que dan origen a una nueva espora. Además de este proceso, *Streptomyces* es capaz de producir metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen actividad bactericida. Algunos informes han sugerido que estos dos procesos, morfológicos y fisiológicos podrían estar controlados por genes reguladores y compuestos comunes (Chater 1989a, 1989b y 1993). Uno de estos compuestos es el

factor autorregulador denominado Factor A (2-iso-capriloil-3R-hidroximetil- γ -butirolactona) el cual induce la biosíntesis de estreptomicina y la formación de micelio aéreo en *Streptomyces griseus* (Khokhlov, 1982).

Hara y Beppu (1982a, 1982b) confirmaron que el factor A, inducía la biosíntesis de estreptomicina a una concentración de 10^{-9} M y que disparaba el switch para la formación del micelio, otros estudios confirmaron que también controlaba la producción de un pigmento amarillo difusible (Horinouchi y Beppu, 1992). Debido a los efectos pleiotrópicos que producía, las bajas concentraciones a las que actuaba y el requerimiento de una proteína receptora específica, se consideró como una hormona microbiana (Khokhlov, 1982; Horinouchi y Beppu, 1992 y 1994).

Parece ser que el factor A es producido por algunas células en el micelio en etapas tempranas de crecimiento y que éste difunde rápidamente hacia las hifas provocando así diferenciación a hifas aéreas, por lo que se considera un sistema análogo a las hormonas eucarióticas. En esta forma el factor A actúa como una molécula señal para la comunicación entre micelios cercanos estimulando esporulación rápida, que representaría una ventaja de supervivencia en el ecosistema, en contraste con el poco crecimiento observado inducido por limitación de nutrientes. La síntesis del factor A ocurre a través de dos vías, la primera es a partir del glicerol, derivado del metabolismo de carbono, y la segunda a partir de β -ceto ácidos, derivados del metabolismo de ácidos grasos. Ambos son productos de la degradación de triglicéridos. Por otra parte existen una serie de moléculas homólogas al factor A que llevan a cabo procesos reguladores en metabolismo secundario y morfogénesis en varias especies de *Streptomyces*, cuyas moléculas reguladoras poseen un anillo γ -butirolactona.

La producción de la señal A, está a cargo del gen *asfA*, que se encuentra cerca de uno de los extremos del cromosoma lineal (Lezhava *et al.*, 1997). Por los estudios realizados por Horinouchi y colaboradores, (1984, 1989) se ha propuesto que AfsA es una enzima que cataliza la formación del factor A a partir de precursores presentes en *Streptomyces*, posiblemente glicerol y β -ceto ácidos. Además, la producción del factor A

fue inhibida en una forma dosis dependiente, por cerulenina, un compuesto que inhibe la biosíntesis de ácidos grasos lo cual sugiere fuertemente que *afsA* cataliza la condensación de un glicerol (C3) y un β -ceto ácido (C10).

La proteína receptora del factor A, es la proteína ArpA, detectada en la fracción citoplásmica de *S. griseus* (Miyake *et al.*, 1989). El receptor une al factor A en una proporción molar 1:1 con una constante de disociación $K_d = 0.7$ nM, este valor es consistente con la concentración a la cual el factor A es eficiente *in vivo* (10^{-9} M) y es comparable a la encontrada en algunos receptores hormonales eucariontes. Parece ser que el factor A carece de actividad de unión a la membrana, lo cual explicaría su libre difusión a través de las membranas del micelio sin la necesidad de un receptor de superficie. ArpA es una proteína de 276 amino ácidos con una masa molecular aproximada de 29.1 kDa (Onaka *et al.*, 1995), que contiene un motivo de unión a DNA α -hélice-vuelta- α -hélice en el extremo amino terminal, lo cual sugiere que efectúa su papel regulador interactuando directamente con el DNA. Algunos reportes de estudios genéticos de ArpA (Miyake *et al.* 1990 y Onaka *et al.*, 1995, 1997) han demostrado que esta proteína sirve como un represor del metabolismo secundario y morfogénesis.

Horinouchi y colaboradores encontraron una secuencia palindrómica consenso de 22 pares de bases a la cual se une ArpA en ausencia del factor A, lo cual está de acuerdo con la idea de que ArpA se une al DNA como homodímero (Onaka *et al.*, 1995), una unidad se une a la mitad del palíndromo y la otra unidad a la mitad restante. ArpA no se une al DNA cuando el factor A se encuentra en concentraciones entre 32 y 160 nM, y, además, la adición exógena del factor A al complejo DNA-ArpA ocasiona la liberación de ArpA del DNA, lo cual sugiere que éste se une al extremo carboxilo terminal de ArpA, causando un cambio conformacional en el amino terminal, que ocasiona su disociación del DNA. El factor A es producido en una forma dependiente de crecimiento y alcanza concentraciones de 100nM, por lo que el modelo de regulación del factor A sería el siguiente: Durante la fase temprana de crecimiento ArpA se une a ciertos promotores previniendo la expresión de algunos genes, pero cuando el factor A

alcanza la concentración de detección umbral, se une a ArpA y libera a esta proteína del DNA, permitiendo la transcripción y traducción de proteínas dependientes del factor A que transmiten la señal a genes que participan en la biosíntesis de estreptomina y morfogénesis (Horinouchi y Beppu, 1994; Vujaklija *et al.*, 1993).

COMUNICACIÓN CELULAR ENTRE BACTERIAS ASOCIADAS A ORGANISMOS SUPERIORES

Debido a los diversos procesos evolutivos que han ocurrido a través del tiempo, las bacterias han desarrollado formas de vida en asociación a organismos superiores, algunas de estas relaciones pueden ser dañinas para el hospedero, mientras que en otras pueden beneficiarse tanto huésped como hospedero. Muchas de estas relaciones se llevan acabo a través de una regulación mediada por autoinductores.

A) *Rhizobium leguminosarum*

Rhizobium leguminosarum es una bacteria gram negativa que vive en simbiosis con algunas leguminosas, ésta se une a las vellosidades de las raíces y se internaliza a través de ellas. Como parte de su ciclo de vida se diferencia en bacteroides, esta diferenciación ocurre en estructuras denominadas nódulos que se forman en la corteza de la raíz y es el lugar donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (Ver Capitulo de Wang *et al.*, *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas). En el caso de *R. leguminosarum* vb *viciae*, los genes necesarios para colonización, nodulación y fijación se encuentran en un plásmido Sym, llamado pRL1J1 (Hirsh, 1979; Wisniewski-Dye y Downie, 2002). Esta cepa de *R. leguminosarum* parece producir múltiples acil-HSLs (Gray *et al.*, 1996), algunas de ellas al asociarse con RhiR, codificado por *rhiR*, activan la expresión de *rhiABC* (Crockford *et al.*, 1995), que posiblemente participan en interacciones en la rizósfera.

B) *Rhizobium etli*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Rhizobium etli es una bacteria simbiote del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que produce al menos siete diferentes moléculas autoinductoras (AI). Rosemeyer y colaboradores identificaron el sistema de quórum sensing *rail/raiR* (Rosemeyer *et al.*, 1998). Mutantes en *rail* presentan un fenotipo de bajo número de nódulos pero su efectividad en fijación de nitrógeno no es afectada. Además, en el sobrenadante de cultivos de mutantes en *rail* sólo se detectaron tres AI, lo que implica a *rail* en la síntesis de al menos cuatro AI. Algunas de estas moléculas tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de otras especies de rhizobia (Daniels *et al.*, 2002).

C) *Agrobacterium tumefaciens*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agrobacterium tumefaciens, pertenece a las bacterias gram negativas, ésta infecta a plantas causando tumores en sus hospederos. El mecanismo de infección se lleva a cabo mediante la transferencia a la planta de una secuencia que forma parte del plásmido, llamado plásmido Ti, que contiene los genes responsables de transferencia del DNA por medio de conjugación (genes *tra*) y los genes requeridos para la transformación de la planta (genes *vir*) (Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Farrand *et al.*, 1996). Una vez que se forma el tumor, éste libera sustancias llamadas opinas, que sirven a la bacteria como alimento para la colonización (Dessaux *et al.*, 1992), dentro de estas moléculas se encuentran la nopalina y octopina entre otras. Las enzimas requeridas para el catabolismo de estas moléculas son codificadas por genes que también se encuentran en el plásmido Ti.

Zhang y Kerr (1991) observaron que la transferencia del plásmido Ti era estimulada por una molécula de bajo peso molecular a la que denominaron CF (factor de conjugación) y que después se caracterizó como 3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL) y 3-oxo-C6-HSL.

En 1993, Piper y colaboradores observaron que había una secuencia río arriba de un gen al que denominaron *traR* que era similar a *luxR* en *Vibrio fischeri* y realizaron experimentos que los condujeron a pensar que TraR era el receptor del autoinductor 3-

oxo-C8-HSL, cuya producción podría ser dirigida por un gen tipo *luxI*, identificado y caracterizado como *tral* por Hwang y colaboradores en 1994 (Piper *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1994).

Estos estudios también demostraron que la producción de feromonas por *tral* esta regulada positivamente por TraR, además se identificó a otro gen *traM* cuyo producto (TraM) interactúa con TraR actuando como antagonista y cuya producción también se regula positivamente por TraR (Hwang *et al.*, 1995; Fig. 8).

La regulación dependiente de quorum sensing en los plásmidos dependientes de opinas fue descrita por Fuqua y Winans (1996b) quienes propusieron un modelo de regulación en el cual el complejo octopina-receptor (OCCR) activa la transcripción de *traR* y a su vez TraR se une al autoinductor (AAI) y regula la expresión de *traM*, genes de movilización (*tra*) y de sí mismo (*traR*) (Fig. 8).

En los plásmidos Ti dependientes de octopina se han encontrado 5 promotores dependientes de TraR que contienen secuencias conservadas que se han denominado cajas *tra* (Fuqua y Winans, 1996a, 1996b), a las cuales posiblemente se une un dímero de TraR (Fig. 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

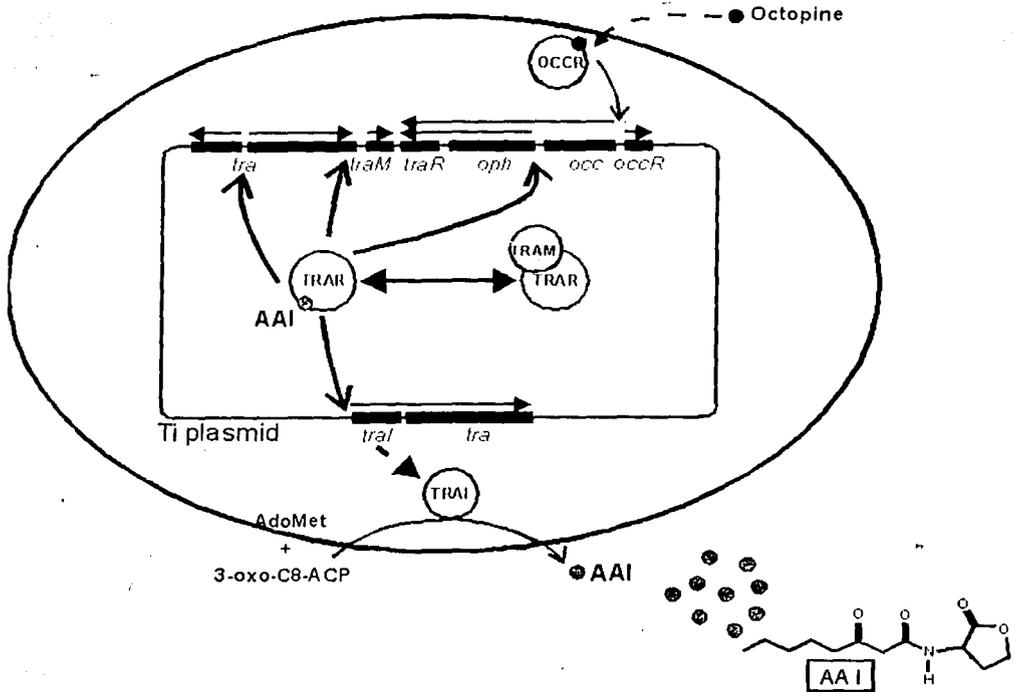


Fig. 8. Regulación de quórum sensing en *Agrobacterium tumefaciens*.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

D) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertenece a las bacterias gram positivas, se caracteriza por su amplio espectro de infección, y se sabe que su patogenicidad es un proceso multifactorial que involucra un grupo de proteínas extracelulares entre las cuales se encuentran citotoxinas, toxinas de cheque tóxico, enterotoxinas y factores de superficie, que le permiten adherirse a tejido, resistir las defensas celulares y fagocitosis, entre otros (Projan y Novick, 1997).

Los factores de patogenicidad se expresan de manera ordenada durante el desarrollo de la infección. La expresión de estas proteínas comienza en la fase

exponencial temprana, donde se producen proteínas de unión, en la fase exponencial tardía. Al final de la fase exponencial la expresión de genes que codifican factores extracelulares patogénicos aumenta y cesa cuando la célula entra a fase estacionaria.

La expresión de estos genes en *S. aureus* se lleva a cabo mediante el sistema *agr* (accessory gene regulation), denominado de esta forma porque no es necesario para crecimiento o división celular, pero mutantes en este sistema muestran virulencia atenuada (Foster *et al.*, 1990).

El sistema *agr* está constituido por dos unidades transcripcionales dirigidas por promotores divergentes (Novick *et al.*, 1995). Una característica importante en este sistema es que la activación se puede llevar a cabo con una concentración muy baja del autoinductor, aunque la acumulación de éste produce la máxima respuesta.

E) *Pseudomonas aeruginosa*

En *P. aeruginosa* existen dos sistemas "detectores de quórum" que actúan en serie, LasI-LasR y RhII-RhIR, ambos dependientes de acil-HSL. A una alta densidad celular, la concentración de ambas acil-HSL es alta y LasR se une a su acil-HSL específica para activar la expresión de genes blanco. Uno de éstos genes activados por el complejo acil-HSL-LasR es *rhIR* que codifica para un segundo receptor de acil-HSL, RhIR. RhIR entonces une a su cognado autoinductor de acil-HSL y éste complejo induce la expresión de sus genes blanco. Entonces, los genes controlados por LasR son expresados antes de los controlados por el sistema RhIR. Este patrón temporal de regulación genética permite a *P. aeruginosa* expresar diferentes factores de virulencia a diferentes estadios dentro de un proceso de infección (Pesci e Iglewski, 1997). Las dos señales de acil-HSL de *P. aeruginosa* promueven virulencia en una variedad de huéspedes diferentes, el ejemplo más importante en humanos son los pulmones de pacientes con fibrosis quística. No sólo el pulmón es susceptible al daño causado por los factores de virulencia controlados por las señales de acil-HSL sino

también es vulnerable a efectos directos de las acil-HSL. Los factores de quórum de *P. aeruginosa* inducen la producción de interleucina 8 (IL-8) en los pulmones de pacientes afectados por fibrosis quística, como resultado, neutrófilos son reclutados al pulmón y ésta acción facilita la formación de una potente infección de *P. aeruginosa*. Así, en éste sistema, las acil-HSL dirigen la expresión de genes bacterianos y de factores del huésped que aceleran el proceso de infección (Smith *et al.*, 2001; mayores detalles de los sistemas de quórum de *P. aeruginosa* se pueden encontrar en el capítulo de la Dra. Gloria Soberón-Chávez).

BIOPELICULAS: ESTRUCTURAS DE INTERACCION ENTRE BACTERIAS

En la naturaleza la colonización de hábitats por una mezcla de poblaciones bacterianas es un proceso muy común. Dentro de estos grupos de bacterias existen una gran variedad de interacciones físicas y metabólicas necesarias para la adhesión, crecimiento y supervivencia, además de aumentar la resistencia de estos grupos a ambientes hostiles para su desarrollo. Estas interacciones entre mezclas de microorganismos son denominadas comunidades microbianas y generalmente se encuentran adheridas a una superficie, organizadas en una comunidad denominada biopelícula. Estas comunidades han sido descritas en hábitats que van desde ambientes acuáticos, superficies de plantas, suelo, aparatos médicos, sistemas de filtración hasta el tracto digestivo de humanos y animales (Costerton *et al.*, 1987; Flemming y Schaule, 1996).

Dentro de las comunidades bacterianas parecen existir respuestas cooperativas que pueden involucrar protección al oxígeno u otras interacciones que dependen de la presencia de bacterias facultativas en esa comunidad. Los mecanismos a través de los cuales se pueden llevar a cabo estas respuestas pueden ser mediados por interacciones físicas o metabólicas entre bacterias anaeróbicas y facultativas, estas

condiciones permiten la supervivencia de anaerobios en condiciones de aerobiosis (Bradshaw *et al.*, 1997 y 1998).

Entre otras de las ventajas ecológicas que proporciona la vida en comunidad se encuentran un mayor rango de hábitats para colonizar, aumento en la diversidad y eficiencia metabólica, mayor resistencia a estrés ambiental y a factores de defensa del organismo hospedero (Caldwell *et al.*, 1997a, 1997b; Saphiro, 1998).

El proceso de formación de una biopelícula involucra una serie de eventos, el primero de ellos es el transporte o movimiento de los microorganismos hacia el sustrato que donde se adherirán, al llegar aquí las bacterias pueden o no adherirse dependiendo de las fuerzas de interacción con ese sustrato (Rutter y Vincent, 1980), esta adhesión inicial es reversible (Norde y Lyklema, 1989), pero en ausencia de producción de exopolímeros se vuelve menos reversible debido a la pérdida progresiva de agua (Meinders *et al.*, 1995). Una vez que se han adherido los colonizadores iniciales o primarios, los colonizadores secundarios se coadhieren a estas superficies (Kolenbrander, 1989), posteriormente el crecimiento celular guía a la acumulación microbiana en el biofilm.

Los mecanismos a través de los cuales las bacterias son transportadas hacia una superficie incluyen contacto al azar con el sustrato debido a movimiento Browniano, sedimentación por diferencias en gravedad específica entre las bacterias y el medio en el que se encuentra, transporte hacia la superficie por el movimiento del medio y transporte activo mediado por actividad flagelar que puede incluir o no quimiotaxis (Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

La motilidad juega un papel muy importante en la formación de biopelículas de *Escherichia coli*, lo que sugiere que ésta es necesaria para contrarrestar las fuerzas repulsivas de la superficies y es un factor importante para la interacción inicial y movimiento a lo largo de ella. La presencia del pili tipo I es esencial para la adhesión inicial de *E. coli* (Pratt y Kolter, 1998) y para la síntesis de fibras de curli que son fibras

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de superficie que participa en interacciones directas de células con el sustrato y con células del hospedero (Prigent-Combaret, *et al.*, 2000). El proceso de formación de biopelículas también se ve influenciado por factores externos como el ambiente nutricional (Pratt y Kolter, 1998; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a; 2002b).

Después de la adhesión, comienza la formación de microcolonias, en *Burkholderia cepacia* el sistema CepR-CepI (homólogos de LuxR-LuxI) está involucrado en la formación de microcolonias y maduración del biofilm (Huber *et al.*, 2001). En esta fase los microorganismos se rodean por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que tienen un papel importante en la estructura y propiedades fisicoquímicas de estas comunidades (Wingender *et al.*, 1999). La producción de EPS precede a la adhesión al sustrato. Los EPS forman una estructura tridimensional con canales acuosos que permiten el importe de nutrientes y el exporte de sustancias de desecho. La proporción de EPS en un biofilm va de un 50 a 90% del total de la materia orgánica (Christensen y Characklis, 1990; Nielsen *et al.*, 1997).

Los EPS están constituidos por proporciones variadas de carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y fosfolípidos, así como algunos polisacáridos como el alginato en *Pseudomonas aeruginosa* (Davies *et al.*, 1993; 1998) La sobreproducción de alginato en *P. aeruginosa* modifica la estructura tridimensional del biofilm, haciéndolo más heterogéneo y formado principalmente por grandes columnas (Hentzer, *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 1999). En *E. coli* K-12 la producción de ácido colánico (EPS) tiene un papel muy importante para la formación de la estructura tridimensional del biofilm. (Danese, *et al.*, 2000).

Finalmente, la disgregación de un biofilm se ve influenciada por el ambiente externo. Algunos de los factores que afectan este proceso son los cambios en el medio, disminución de la disponibilidad de nutrientes (Stoodley *et al.*, 1999), propiedades electroquímicas dentro del biofilm (Characklis *et al.*, 1990) y limitación del sustrato (Peyton y Characklis, 1993) o bien afectada por metabolismo, como la proteína

reguladora de unión a RNA, CsrA (carbon storage regulator) que actúa como represor de la formación de biofilm y activa la disgregación del mismo en diferentes condiciones de cultivo (Jackson *et al.*, 2002).

El modelo propuesto por O'Toole *et al.* (2000) para describir todo el proceso de agregación y disgregación sugiere que las células en estado planctónico reciben señales ambientales que ocasionan la adhesión inicial al sustrato, después de ello, las bacterias comienzan a comunicarse unas con otras en un proceso denominado "quórum sensing" y estas señales guían a la formación de microcolonias que formarán el biofilm maduro, una estructura tridimensional con forma de hongo embebida en una matriz de EPS. Finalmente nuevas señales indican a la bacteria su disgregación del biofilm para regresar al estadio planctónico, completando así el ciclo (Fig. 9).

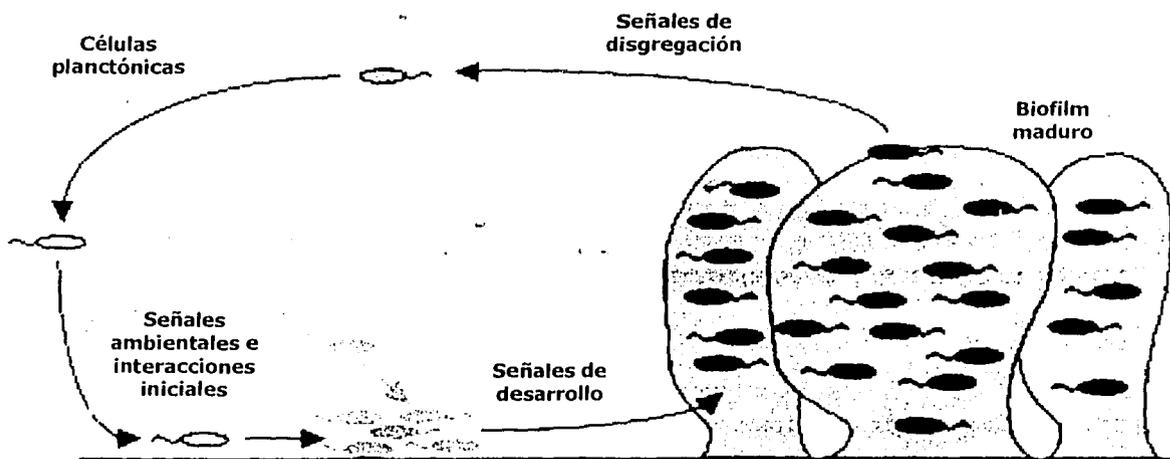


Fig. 9 Modelo de formación de biopelículas (O'Toole *et al.* 2000).

Las células que se encuentran en un biofilm, muestran diferencias fisiológicas con las células planctónicas (O'Toole *et al.*, 1999; 2000) así como patrón de expresión génica diferente. Existe represión de genes de pili y flagelo, ya que aunque son necesarios para el inicio de la formación de biofilm, probablemente no son necesarios

para la maduración de la estructura, además hay inducción de genes que tienen que ver con resistencia a antibióticos (Whiteley *et al.*, 2001).

Algunas enzimas glicolíticas involucradas en metabolismo energético, como la formación de ácidos, son reprimidas en biopelículas, mientras que las proteínas necesarias para procesos biosintéticos, como de síntesis y plegamiento de proteínas, así como replicación, tienen una expresión aumentada (Svensäter *et al.*, 2001).

Una de las formas de estudiar una biopelícula es el método desarrollado por O'Toole *et al.* (1999), en el cual inoculan placas de 96 pozos de PVC (cloruro de polivinilo) con cultivos en medio líquido, e incuban a cierta temperatura, después de la incubación los cultivos de las placas son desechados y los pozos se lavan con agua y se tiñen con cristal violeta al 0.1%. Para cuantificar el biofilm se eluye el colorante con acetona-etanol y se mide con la absorbancia a 570 nm. Además se ha observado que la formación de biofilm en *E. coli* es favorecida en medio LB suplementado con 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS) (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sin duda alguna, el vivir en comunidad hace necesario desarrollar una forma de comunicación con los demás integrantes, la capacidad de comunicarse unos con otros proporciona ventajas en diferentes aspectos, como ventajas metabólicas, mayor obtención de nutrientes, resistencia a antibióticos y en general una mejor organización para llevar a cabo un proceso determinado.

Además, la capacidad para desarrollar no sólo un lenguaje que permita comunicarse entre organismos de la misma especie, sino un lenguaje que aparentemente no tiene fronteras, pues permite comunicarse tanto con otras bacterias y hasta tal vez con algunos organismos superiores, otorga mayores ventajas dentro del nicho ecológico, posiblemente el organismo más social puede tener ventajas para su supervivencia.

REFERENCIAS

- 1) Alt-Mörbe, J., Stryker, J. L., Fuqua, S., Farrand, S. K. y Winans, S. C. 1996. The conjugal transfer system of *A. tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes. *J. Bacteriol.* 178:4248-4257.
- 2) Andersen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. y Nissen-Meyer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2269-2272.
- 3) Bassler, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:582-587.
- 4) Bassler, B. L., Greenberg, E.P. y Stevens, A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 179:4043-4045.
- 5) Bassler, B. L., Wright, M. y Silverman, M. R. 1994a. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* 12:403-412.
- 6) Bassler, B. L., Wright, M. y Silverman, M. R. 1994b. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* 13:273-286.
- 7) Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. y Silverman, M. R. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9:773-786.
- 8) Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. y Allison, C. 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect. Immun.* 66:4729-4732.
- 9) Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. y Allison, C. 1997. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:385-387.
- 10) Brurberg, M. B., Nes, I. F. y Eijsink, V. G. H. 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26:347-360.
- 11) Caldwell, D. E., Atuku, E., Wilkie, D. C., Wivchoruk, K. P., Karthikeupn, S., Korber, D. R., Schmid, D. F. y Wolfaardt, G. M. 1997a. Germ theory vs community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilm. *Adv. Dent. Res.* 11:4-13.
- 12) Caldwell, D. E., Wolfaardt, G. M., Korber, D. R. y Lawrence, J. R. 1997b. Do bacterial communities transcend Darwinism? *Adv. Microb. Ecol.* 15:105-191.
- 13) Cao, J.-G. y Meighen, E. A. 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *V. harveyi*. *J. Biol. Chem.* 264:21670-21676.
- 14) Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E. y Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.
- 15) Characklis, W. G., McFeters, G. S. y Marshall, K. C. 1990. Physiological ecology in biofilm systems, p. 341-394. In Characklis, W. G., McFeters, G. S. y Marshall, K. C. (ed.), *Biofilms*. Wiley, New York.
- 16) Chater, K. F. 1989a. Sporulation in *Streptomyces* p. 277-299. In Smith, I., Slepceky, R. A. y Setlow, P. (ed) Regulation of prokaryotic Development: Structural and functional Analysis of bacterial sporulation and Germination. American Society for Microbiology. Washington. D. C.
- 17) Chater, K. F. 1989b. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trend. Genet.* 5:372-377.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- 18) Chater, K. F. 1993. Genetic of ferentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:685-713.
- 19) Chen, X., Schauder, S., Potter, N., Van Dorsseleer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. y Hughson, F. M. 2002. Sřructural idenfification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* 415:545-549.
- 20) Christensen, B. E. y Characklis, W. G. 1990. Physical and chemical properties of biofilms, p. 93-130. *In* Characklis, W. G. y Marshall, K. C. (ed.), *Biofilms*. Wiley. New York.
- 21) Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E. y Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- 22) Corona-Izquierdo, F. P. y Membrillo-Hernández, J. 2002. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(*N*-morpholino)propane sulfonate (MOPS). *Res. Microbiol.* 153: 181-185.
- 23) Corona-Izquierdo, F. P. y Membrillo-Hernández, J. 2002. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 211:105-110.
- 24) Costerton, J. W., Chen, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. y Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilm in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
- 25) Crockford, A. J., Davis, G. A. y Williams, H. D. 1995. Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Microbiology.* 141:843-851.
- 26) Danese, P. N., Pratt, L. A. y Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182:3593-3596.
- 27) Daniels, R., De Vos, D. E., Desair, J., Raedschelders, F., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J., y Michiels, J. 2002. The *cin* quórum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 277:462-468.
- 28) Davies, D. G., Chakrabarty, A. M. y Geesey, G. G. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1181-1186.
- 29) Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. y Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280: 295-298.
- 30) de Kievit, T. R. e Iglewski, B. H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 68:4839-4849.
- 31) Dessaux, Y., Petit, A. y Tempe, J. 1992. Opines in *Agrobacterium* biology, p. 109-136. *In* D. P. S. Verma (ed.), *Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 32) Diep, D. B., Håvarstein, L. S. y Nes, I. F. 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18:631-639.
- 33) Diep, D. B., Håvarstein, L. S. y Nes, I. F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178:4472-4483.
- 34) Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Nissen-Meyer, J. y Nes, I. F. 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcriptional unit as an *agr*-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:160-166.
- 35) Dunny, G. M. y Leonard, B. A. B. 1997. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:527-564.
- 36) Dykes, G. A. 1995. bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Trends Ecol. Evol.* 10:186-189.
- 37) Dworkin, M. y Kaiser, D. 1985. Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science.* 230:18-24.
- 38) Eijsink, V. G. H., Brurberg, M. B., Mid del Hoven, P. H. y Nes, I. F. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178:2232-2237.

- 39) Engebrecht, J. y Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:4154-4158.
- 40) Engebrecht, J. y Silverman, M. 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res.* 15:10455-10467.
- 41) Farrand, S. K., Hwang, I. y Cook, D. M. 1996. The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4 and F. *J. Bacteriol.* 178:4233-4247.
- 42) Flemming, H.-C. y Schaule, G. 1996. Biofouling, p. 39-54. In Heitz, E., Sand, W. y Flemming, H.-C. (ed.), *Microbially influenced corrosion of material-Scientific and technological aspects*, Springer, Heidelberg.
- 43) Foster, T. J., O'Reilly, M., Phonimdaeng, P., Cooney, J., Patel, A. H. y Bramley, A. J. 1990. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. Properties of coagulase and gamma-toxin, alpha-toxin, beta-toxin and protein A in the pathogenesis of *S. aureus* infections, p. 403-420. In R. P. Novick (ed.), *Molecular Biology of the Staphylococci*. VCH publishers, New York.
- 44) Fuqua, W. C. y Winans, S. C. 1996a. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* 178:435-440.
- 45) Fuqua, W. C. y Winans, S. C. 1996b. Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol. Microbiol.* 20:1199-1210.
- 46) Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:727-751.
- 47) Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 176:269-275.
- 48) Gray, K. M., Pearson, J. P., Downie, J. A., Boboye, B. E. A. y Greenberg, E. P. 1996. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J. Bacteriol.* 178:372-376.
- 49) Gutowski-Eckel, Z., Klein, C., Siegers, K., Bohm, K., Hammelmann, M. y Entian, K.-D. 1994. Growth phase-dependent regulation and membrane localization of SpaB, a protein involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1-11.
- 50) Hagen, D. C., Bretscher, A. P. y Kaiser, D. 1978. Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* 64:284-296.
- 51) Hara, O. y Beppu, T. 1982a. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-the role of A-factor. *J. Antibiotic.* 35:349-358.
- 52) Hara, O. y Beppu, T. 1982b. Induction of streptomycin inactivating enzyme by A-factor in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiotic.* 35:1208-1215.
- 53) Hastings, J. W. y Nealson, K. H. 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:549-595.
- 54) Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. y Eijsink, V. G. H. 1998. Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G and helicity is enhanced upon α - β interaction. *Eur. J. Biochem.* 251:565-572.
- 55) Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F. y Morrison, D. A. 1996. Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.* 21:863-869.
- 56) Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G.T., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. y Parsek, M. R. 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183:5395-5401.
- 57) Hernández, V. J. y Cashel, M. 1995. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 252:536-549.

- 58) Hirsch, P. R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 113:219-228.
- 59) Horinouchi, S. y Beppu, T. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:377-398.
- 60) Horinouchi, S. y Beppu, T. 1994. A-factor as microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 12:859-864.
- 61) Horinouchi, S., Kumada, Y. y Beppu, T. 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* 158:481-487.
- 62) Horinouchi, S., Suzuki, H., Nishiyama, M., y Beppu, T. 1989. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 171:1206-1210.
- 63) Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. y Eberl, L. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology.* 147:2517-2528.
- 64) Hwang, I., Cook, D. M. y Farrand, S. K. 1995. A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J. Bacteriol.* 177:449-458.
- 65) Hwang, I., Pei-Li, L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E. y Farrand, S. K. 1994. Tral, a LuxI homolog, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4639-4643.
- 66) Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., Romeo, T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:290-301.
- 67) Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey, p. 1-34. In J. Jung and Sahl, H.-G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics: Proceedings of the First International Workshop on Lantibiotics*. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
- 68) Kaplan, H. B., Kuspa, A. y Kaiser, D. 1991. Suppressors that permit A-signal-independent developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 173:1460-1470.
- 69) Khokhlov, A. S. 1982. Low molecular weight microbial bioregulators of secondary metabolism, p. 97-109. In V. Krumphanzl, B. Sikyta, and Z. Vanek (ed.), *Overproduction of Microbial Products*. Academic Press, London.
- 70) Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-86.
- 71) Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M. y Kuipers, O. P. 1997a. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4581-4584.
- 72) Kleerebezem, M., Quadri, L. E. N., Kuipers, O. P. y de Vos, W. M. 1997b. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24:895-904.
- 73) Kolenbrander, P. E. 1989. Surface recognition among oral bacteria: multi-generic coaggregations and their mediators. *Crit. Rev. Microbiol.* 17:137-155.
- 74) Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36:125-144.
- 75) Kuner, J. M. y Kaiser, D. 1981. Introduction of transposon Tn5 into *Myxococcus* for analysis of developmental and other non selectable mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:425-429.
- 76) Kuspa, A., Kroos, L. y Kaiser, D. 1986. Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* 117:267-276.

- 77) Kuspa, A., Plamman, L. y Kaiser, D. 1992. A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* 174:7360-7339.
- 78) Kuspa, A. y Kaiser, D. 1989. Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J. Bacteriol.* 171:2762-2772.
- 79) Lazazzera, B. A. y Grossman, A. D. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* 6:288-94.
- 80) Lezhava, A., Kameoka, D., Sugino, H., Goshi, K., Shinkawa, H., Nimi, O., Horinouchi, S., Beppu, T. y Kinashi, H. 1997. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* 253:478-483.
- 81) McVittie, A., Messik, F. y Zahler, S. A. 1962. developbiology of *Myxococcus*. *J. Bacteriol.* 84:546-551
- 82) Meinders, J. M., Van der Mel, H. C. Y Busscher, H. J. 1995. Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. *J. Colloid Interface Sci.* 176:329-341.
- 83) Miller, B. M. y Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199.
- 84) Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, M., Chiba, N., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N. y Beppu, T. 1989. Detection and properties of A-factor binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 171:4298-4302.
- 85) Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S. y Beppu, T. 1990. The A- factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* 172:3003-3008.
- 86) Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. y Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:17-32.
- 87) Nielsen, P.-H., Jahn, A. y Palmgren, R. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 36:11-19.
- 88) Nilsen, T., Nes, I. F. y Holo, H. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180:1848-1854.
- 89) Norde. W. y Lyklema, J. 1989. Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid-chemical approach. *Colloids Surf.* 38:1-13.
- 90) Novick, R. P., Projan, S., Kornblum, J., Ross, H., Kreiswirth, B. y Moghazeh, S. 1995. The *agr* P-2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 248:446-458.
- 91) Nuñez, C., Moreno, S., Soberón-Chávez, G. y Espin, G. 1999. The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* 181:141-148.
- 92) O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B. y Kolter, R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310:91-109.
- 93) O'Toole, G. A., Kaplan, H. B. y Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- 94) Onaka, H. y Horinouchi, S. 1997. DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* 24:991-1000.
- 95) Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. y Horinouchi, S. 1995. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 177:6083-6092.
- 96) Parkinson, J. S. y Kafoid, E. C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26:71-112.
- 97) Pattus, A., Massotte, D., Willmsen, H. U., Lakey, J., Tsernogloy, D., Tucker, A. y Parker, M. W. 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* 46:180-192.
- 98) Pesci, E. C. e Iglewski, B. H. 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends in Microbiol.* 5:132-134.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- 99) Peyton, B. M. y Characklis, W. G. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear-stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.* 41:728-735.
- 100) Piper, K. R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S. K. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature.* 362:448-450.
- 101) Plamman, L., Davis, J. M., Cantwell, B. y Mayor, J. 1994. Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 176:2013-2020.
- 102) Plamman, L., Li, Y., Cantwell, B. y Mayor, J. 1995. The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* 177:2014-2020.
- 103) Pratt, L.A. y Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30:285-293.
- 104) Prigent-Combaret, C., Grensier, G., Thuy Le Thi, T., Vidal, O., Lejeune, P. y Dorel, C. 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* 2:450-464.
- 105) Projan, S. y Novick, R. 1997. The molecular basis of virulence, p. 55-81. In G. Archer and k. Crossley (ed.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
- 106) Pugsley, A. D. 1984. The ins and outs of colicins. Part I: Production and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* 7:168-175.
- 107) Reichenbach, H. 1993. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy, pp. 13-62. En M. Dworkin y D. Kaiser (eds.), *Mixobacteria II*. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- 108) Risoen, P.-A., Håvarstein, L. S., Diep, D. B. y Nes, I. F. 1998. Identification of the DNA-binding sites of two response regulators involved in regulation of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.* 259:224-232.
- 109) Rosemeyer, V., Michiels, J., Verreth, C. y Vanderleyden, J. 1998. *luxI*-and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* 180:815-821.
- 110) Rutter, P. R. y Vincent, B. 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physicochemical aspects, p. 79-91. In Berkeley, R. C. W., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter, P. R. y Vincent, B. (ed.), *Microbial adhesion to surfaces*. Ellis Horwood. London.
- 111) Sahl, H.-G. 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, p. 347-359. In J. Jung and Sahl, H.-G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics: Proceedings of the First International Workshop on Lantibiotics*. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
- 112) Saphiro, J. A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:81-104
- 113) Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. y Bassler, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* 41:463-476.
- 114) Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C. Cronan, J. E., Rinehart, K. L. y Farrand, S. K. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6036-6041.
- 115) Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H. y Phipps, R. P. 2001. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* 167: 366-374.
- 116) Stoodley, P. J., Jørgensen, F., Williams, P. y Lappin-Scott, H. M. 1999. The role of hydrodynamics and AHL signaling molecules as determinants of the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, p. 223-230. In

- Wimpenny, J., Gilbert, P., Walker, J., Brading, M. y Bayston, R. (ed.), *Biofilms: the Good, the Bad and the Ugly*. BioLine. Cardiff.
- 117) Surette, M. G., Miller, M. B. y Bassler, B. L. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:1639-1644.
- 118) Svensäter, G., Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D. y Hamilton, I.R. 2001. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205:139-146.
- 119) Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. y Zehnder, J. B. 1990. Influences of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* 54:75-87.
- 120) Vujaklija, D., Horinouchi, S. y Beppu, T. 1993. Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 175:2652-2661.
- 121) Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. y Greenberg, E. B. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 417:860-864.
- 122) Wingender, J., Neu, T. R. y Flemming, H.-C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? p. 1-19 In Wingender, J., Neu, T. R. y Flemming, H.-C. (ed.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer. Berlin.
- 123) Wisniewski-Dye, F. y Downie, J. A. 2002. Quorum sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81:397-407.
- 124) Yang, C. y Kaplan, H. B. 1997. *Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression. *J. Bacteriol.* 179:7759-7767.
- 125) Zhang, L. y Kerr, A. 1991. A diffusible compound can enhance conjugal transfer of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 173:1867-1872.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN