

La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial (Artículo de revisión)

Guillermo Barreto Argilagos* y Herlinda Rodríguez Torrens**

*Centro de Estudio para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey

**Sede Universitaria Municipal (SUM) Camagüey, Carrera Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey

RESUMEN

La cápsula se estudia como una estructura no esencial bacteriana. Sin embargo, en la naturaleza el 99% de las bacterias se encuentran embebidas en matrices de polisacáridos llamadas *biofilms* que, determinan su supervivencia frente a antimicrobianos como quimioterapéuticos, desinfectantes y metales pesados, y posibilitan una explicación sobre los mecanismos de infección más cercanos a la realidad. Esta revisión, partiendo de trabajos de los '80 del pasado siglo, muestra la influencia de contaminantes ambientales como metales pesados y herbicidas, en el desarrollo de resistencia cruzada a diversos antibióticos, y en la producción de cápsulas. A partir de estos resultados pioneros, y de otros más recientes publicados en fuentes internacionales reconocidas, se describe cómo los biofilms (forma a que conlleva la producción de capsulas en condiciones naturales) conforman la arquitectura y el medio óptimos para que tenga lugar una elevadísima tasa de transferencia genética entre las poblaciones bacterianas involucradas, fenómeno que da respuesta a la creciente ineficiencia de las terapéuticas convencionales actuales, tanto en la parte humana como veterinaria. A tal fin, se comentan otros mecanismos no genéticos, dependientes de biofilms, importantes para comprender los mecanismos de infección bacterianos.

Palabras clave: cápsula bacteriana, *biofilms*, antibiorresistencia, metales, desinfectantes, virulencia, plásmidos, islas de patogenicidad

The bacterial capsules, somewhat more than a non essential structure (A revision)

ABSTRACT

The capsule is studied as a non essential bacterial structure. However, in nature 99 % of bacteria are imbued in polysaccharide matrixes called *biofilms* which determine their survival in front of antimicrobials like chemotherapeutics, disinfectants and heavy metals, and make viable an explanation on mechanisms of disinfection closer to the reality. This revision, starting from works published in the eighties of the last century, shows the influence of environmental contaminants like heavy metals and herbicides, on developing the resistance to several antibiotics and the production of capsules. Starting from pioneer results, and others more recently published in international recognized sources, it is described how biofilms (which bring about the production of capsules in natural conditions) shape the architecture and optimal media for a very high genetic transfer rate among involved bacterial populations, a phenomenon which gives an answer to the growing inefficiency of current conventional therapies, as much in veterinary as in human medicine. In that sense, other non genetic mechanisms are commented, depending on biofilms, which are important to understand the bacterial mechanisms of infection.

Key words: bacterial capsule; bio-films; anti-bioresistance; metals; disinfectants; virulence; plasmids; pathogenesis isles

INTRODUCCIÓN

Cuando se indaga en las particularidades de la morfología bacteriana los textos destacan la existencia de estructuras esenciales: nucleóide –que determina la cualidad distintiva de las bacterias dentro del universo viviente-, citoplasma, membrana citoplasmática y pared celular. Hay otras que, a diferencia de las anteriores, pueden o no estar presentes; pueden incluso perderlas y ello no implica la muerte al microorganismo, de ahí que se les designe como estructuras no esenciales (Pelczar y Reid, 1966; Senez, 1976; Planas,

1979; Joklik *et al.*, 1983; Mitov *et al.*, 1983; Kamburov, 1986; Barreto, 2009).

En el laboratorio muchas bacterias pierden la capacidad de formar cápsulas debido a los pasajes sucesivos, y a los propios medios de cultivos, muy diferentes al ambiente natural de procedencia. Como su no expresión “no afecta la viabilidad bacteriana” se le incluye entre las estructuras no esenciales. Sin embargo, en los medios naturales –medios acuáticos, suelo y otros organismos- por lo general deciden su supervivencia (Iáñez, 1998 a,

b; Laza *et al.*, s.a) al brindar adhesividad inespecífica a sustratos, poder antifagocítico y garantizar humedad a la bacteria (Senez, 1976; Planas, 1979; Joklik *et al.*, 1983). En su mayoría están compuestas de exopolisacáridos que se acumulan en torno a la pared celular. Se les da diversos nombres (cápsulas, capa mucilaginosa, microcápsula, glicocálix) en dependencia del grosor e interdependencia con la pared (Iáñez, 1998a).

Entre los efectos nocivos que se imputan al desmedido desarrollo industrial destaca el hecho que las mismas generan una contaminación a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) y radionuclidos (U, Th) en el entorno. Afectan la fertilidad de los suelos y su uso posterior. En el caso de los acuíferos y aguas superficiales comprometen la utilización de este recurso para el consumo humano y animal. Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire - agua - suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos (Vullo, 2003).

En la primera mitad de los '80 del pasado siglo, el docente e investigador búlgaro Yanaki Karadjov insistía en que la creciente contaminación ambiental, fundamentalmente la debida a metales pesados, inducía la producción de cápsula en bacterias, incluso en aquellas que habitualmente no la expresaban (Orozco *et al.*, 1983; Barreto y Karadjov, 1985). Esta hipótesis no era compartida por los restantes investigadores del Instituto Superior de Zootecnia y Medicina Veterinaria de Stara Zagora, institución donde, además de laborar el gestor de la idea, uno de los autores de esta propuesta fungía como su aspirante en opción al grado de Doctor en Ciencias.

Dado que la acción antifagocítica, y de protección frente a otros mecanismos del sistema inmune, están ampliamente documentados (Iáñez, 1998 a, 1999), en esta revisión se retoma algo de lo hecho junto a Karadjov, así como resultados posteriores y lo publicado más recientemente en la literatura especializada, con el objetivo de rendir tributo compartido al tutor y a esa estructura no esencial tan importante que es la cápsula bacteriana.

DESARROLLO

Bulgaria, en los años 80 del pasado siglo, tenía gran desarrollo en la esfera agropecuaria, base fundamental de su economía, y contaba con una industria farmacéutica, heredera la Bayer, que garantizaba una quimioterapia en la esfera veterinaria casi tan amplia como la aplicada en medicina humana (Pharmachim, 1986).

Fruto de esta política, cuando se compararon los antibiogramas realizados a cepas de *E. coli* aisladas de cerdos diarreicos cubanos y búlgaros se puso de manifiesto que las primeras presentaban un patrón de resistencia muy inferior al de sus homólogas eslavas. Resultado esperado, que se correspondía, y aún corresponde, con el comportamiento a los antimicrobianos que caracteriza a los aislamientos realizados a pacientes humanos de países desarrollados, más expuestos a los mismos, al compararlos con los obtenidos en el denominado tercer mundo (Iáñez, 1998 b; Barreto y Rodríguez, 2006; Cabrera *et al.*, 2007).

Desde el descubrimiento de los primeros antimicrobianos, los microorganismos, muy en especial las bacterias, han sido capaces de evadir su acción (Mediavilla *et al.*, 1997; Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks – SCENIHR, 2009)

Así, en 1946 la mayoría de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* eran sensibles a la penicilina; hoy, la casi totalidad de las cepas hospitalarias son resistentes a bencilpenicilina, metilicina, gentamicina, y sólo se pueden tratar con vancomicina (Prescot *et al.*, 2004). En las últimas tres décadas la población ha adquirido microorganismos poliresistentes a fármacos, entre los que destacan agentes bacterianos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* y *Streptococcus pneumoniae*, muestra elocuente de que la resistencia a los fármacos constituye un problema de salud pública extremadamente grave (Prescot *et al.*, 2004; French, 2005; SCENIHR, 2009), casi tanto como las propias enfermedades que justifican su demanda (Barreto y Rodríguez, 2006). Los últimos diez años alarman por los fallos reiterados en los tratamientos a humanos y animales (EARSS, 2005; Harbarth y Samore 2005; WHO 2007; SCENIHR, 2009). Las variantes para superar estas deficiencias, mediante el empleo de nuevos antimicrobianos sólo ha demostrado la rápida capacidad bacteriana de tolerarlos, por usar un término conservador, y am-

pliarse el rango de resistencia en patógenos humanos y animales (Falagas y Bliziotis 2007, Jansen *et al.*, 2006; SCENIHR, 2009). Un fenómeno detectado en áreas hospitalarias, comunidades y en alimentos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se ha incrementado a nivel internacional (EARSS, 2005; Jansen *et al.*, 2006; EASAC, 2007, WHO 2007; SCENIHR, 2009).

El uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias, dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares), desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad su acción (Prescot *et al.*, 2004; French, 2005; Depardieu *et al.*, 2007; EFSA, 2008a, EFSA, 2008b; SCENIHR, 2009). Fenómeno que se agrava debido a que más del 50% de las prescripciones de antibióticos se ordenan sin la realización previa de antibiogramas (Linares y Martínez, 2004). Pero resulta que la antibiorresistencia no sólo se genera y expande como respuesta al consumo de antimicrobianos en poblaciones humanas y animales, también responde, de forma cruzada, a contaminantes ambientales que cada vez se acumulan en mayor grado sobre el planeta (Suárez y Reyes, 2002; Barreto y Rodríguez, 2006; Depardieu *et al.*, 2007; EFSA, 2008a, EFSA, 2008b; SCENIHR, 2009).

No obstante la coincidencia entre lo obtenido en aquellos resultados preliminares a partir de los antibiogramas realizados a cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (ECET) aisladas de cerdos con cuadros típicos de colibacilosis en Bulgaria y Cuba, y lo reportado en la literatura de la época, en la medida que dicho estudio se extendió a un número mayor de unidades porcinas se pudo apreciar que las cepas cubanas con mayor antibiorresistencia correspondían zonas sometidas a frecuentes fumigaciones con herbicidas, debido a su proximidad a cañaverales y áreas de cultivo (Barreto y Karadjov, 1986).

Como no existían publicaciones que abordaran esta temática, sólo quedó una opción para explicar lo antes expuesto: la experimental. Dado el escepticismo de los propios colegas del Instituto Superior de Zootecnia y Medicina Veterinaria de Stara Zagora, además de 3 cepas acapsulares autóctonas, se incluyeron las cepas de referencia de *E. coli* A1, E68I y E68II, también

acapsulares y con marcada sensibilidad a un amplio número de antimicrobianos, todas donadas gentilmente por el Dr. W. Sojka (*Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, England*), eminente pionero en los estudios de colibacilosis porcina. Las seis cepas, de forma independiente, se enfrentaron a concentraciones crecientes de los herbicidas Gesalak y Simasina (utilizados ampliamente en Cuba en las áreas cañeras) por el método de gradientes de concentraciones (Szybalski y Bryson, 1952). Esta vía demostró que la exposición frecuente a concentraciones crecientes de herbicidas, en sistemas estacionarios, inducía resistencia bacteriana a varios antimicrobianos (Barreto y Karadjov, 1986).

Un fenómeno similar, pero debido a la influencia de metales pesados (fundamentalmente cobre), se constató en las cepas búlgaras (Barreto y Karadjov, 1985; Karadjov y Barreto, 1986). Aunque no se incluyó en las publicaciones realizadas, todas las cepas de referencia, y una de las autóctonas, enfrentadas durante seis meses a concentraciones crecientes de CuSO_4 , formaban colonias con una pigmentación carmelitosa, sobre todo en su centro, y producían abundante cápsula en las zonas del medio de cultivo con mayor concentración de la sal (Barreto, 1986, 2009).

La producción de cápsulas bacterianas, estimulada por agentes contaminantes del entorno, ya se había observado en trabajos realizados con *Staphylococcus aureus* (Karadjov *et al.*, 1979). Experiencias posteriores posibilitaron la obtención de resultados similares con la especie *E. coli* al utilizar plomo, cadmio y diversos herbicidas como elementos inductores (Barreto, 1986, 1988), también algunos antimicrobianos convencionales, mezclas de éstos con bases de Schiff, y otros de reciente factura (datos no publicados).

La pobre difusión de lo descubierto en Europa del Este, y países tercermundistas como Cuba, la carencia de una Internet, y la innegable acción antimicrobiana de los metales pesados, conllevó por buen tiempo al uso de muchos de ellos como desinfectantes (sobre todo el mercurio) y como aditivos nutricionales en las dietas animales (Maynard *et al.*, 2003; Do *et al.*, 2006; Bunner *et al.*, 2007) aunque Aarestrup y Hasman (2004) reportaron aislamientos de enterococos, de procedencia animal, que habían adquirido resistencia al cobre, así como una disminución en la susceptibi-

lidad hacia este metal en cepas de *Salmonella*. En el año 2 000 Estados Unidos aprobó una patente para la amplificación del efecto antimicrobiano de péptidos mediante su asociación con iones metálicos. De acuerdo a quienes realizaron la propuesta los iones cobre, en el rango de 0.01 mM a 10 mM, incrementaban sensiblemente la acción antimicrobiana de péptidos diversos frente a *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (US Patent 6042848).

Lo que podría asumirse como una contradicción, realmente no lo es. En concentración de trazas muchos metales pesados se comportan como micronutrientes esenciales. Los microorganismos los utilizan en los procesos *redox* para estabilizar moléculas a través de interacciones electrostáticas, como componentes de enzimas y para la regulación de la presión osmótica. Algunos cationes divalentes (cobalto, cobre, níquel y zinc) se unen fuertemente a grupos sulfhidrilos (-SH) por lo que su concentración intracelular debe controlarse estrictamente para evitar los efectos tóxicos subsecuentes (Choudhury y Srivastava, 2001; Vullo, 2003).

Los microorganismos se han adaptado tanto a los metales que les sirven de nutrientes esenciales y han desarrollado mecanismos de resistencia, genéticamente codificados a nivel de nucleóide o en plásmidos R. La resistencia debida a plásmidos cuenta con el agravante de su gran diseminación a otras bacterias mediante conjugación. Al respecto se han reportado numerosos ejemplos en bacterias que, en esencia, conducen a una reducción en el transporte del metal al interior celular y una potenciación de su eflujo tanto en su forma iónica como en complejos (metalotioneínas –proteínas ricas en grupos sulfhidrilos- o quelatos) (Chen *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 2007; Cervantes y Gutiérrez-Corona, 2006; SCENIHR, 2009).

Se han fundamentado seis mecanismos bacterianos de resistencia a metales pesados: exclusión mediante barreras permeables; mecanismos de secuestro intra y extracelulares; transporte activo y bombas de eflujo; detoxificación enzimática y reducción de la sensibilidad de los sitios diana a dichos metales (Bruims *et al.*, 2000). Dentro de estos mecanismos el primero mucho tiene que ver con las cápsulas y envolturas bacterianas en general, por lo que será al que se prestará mayor énfasis en lo adelante.

Ya en la década del '90, Iáñez (1998 a), en su interesantísimo curso de Microbiología General, acotaba: “La cápsula se puede definir como una estructura superficial que presentan muchas bacterias en sus ambientes naturales, consistente en acumulación de material mucoso o viscoso, situado externamente respecto de la pared celular (o, en su caso, respecto de la capa S y de la vaina)” Más adelante, al referirse a las propiedades de las mismas, puntualiza: “1) Mejora en las propiedades de difusión de nutrientes hacia la célula. Los polisacáridos extracelulares aniónicos funcionan como una resina de intercambio..... 4) Protección contra agentes antibacterianos” Al respecto de esta última función, la primera que especifica es: “contra metales pesados”. Luego de referir las contempladas en la mayoría de los textos, añade: “contra detergentes”.

Yeaman y Yount (2003), tras aclarar que la composición de las cápsulas varía notablemente en los diferentes microorganismos, aseveran, a manera de hipótesis, que al estar compuestas por complejos aniónicos de carbohidratos y fosfatos, resulta razonable asumir que esas matrices pueden secuestrar péptidos catiónicos antimicrobianos, previniendo así su acceso a los sitios diana. Este criterio ha sido compartido por otros investigadores, quienes afirman que el carácter aniónico de estos polímeros posibilita la captación de metales (Geesey y Jang, 1989). Los valores altos de pH inhiben la adsorción de metales y los bajos la incrementan (Lion *et al.*, 1988; Geddie y Sutherland, 2008).

Los polímeros extracelulares de un buen número de bacterias han sido objeto de estudio en múltiples investigaciones en las que se les ha caracterizado. Según Williams y Wimpenny (1977) en *Pseudomonas* están conformados por hexosa (75%), acetato (4%) y ácido pirúvico (6%), independientemente de la fuente de carbono que utilice la bacteria en su nutrición. Sin embargo, otros autores son del criterio que la composición del exopolisacárido es diferente para cada bacteria: alginato, en *P. aeruginosa*; celulosa, en *S. typhimurium*; exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*; poli-Nacetil-glucosamina, en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes señalan que, incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir diferentes exopolisacáridos (Lasa *et al.*, s.a).

El efecto de las fases de crecimiento sobre la producción de cápsula, otro aspecto muy investigado, resulta variable. En *Pseudomonas* comienza al final de la fase exponencial y se hace máxima en la estacionaria (Williams y Wimpenny, 1977). Uhlinger y White (1983) coinciden al respecto, e insisten en que la máxima producción se corresponde con la de mayor estrés fisiológico. Resultados similares reportan Pavoni *et al.* (1972) para cultivos mixtos, y puntualizan que la mayor producción ocurre al final de la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, otros investigadores de este ubicuo género bacteriano aseveran que la síntesis de exopolisacáridos alcanza su clímax durante la fase exponencial (Mian *et al.*, 1978) o puede ocurrir indistintamente en una u otra fase (Hsieh *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con cepas de *E. coli* cubanas y búlgaras, así como las de referencia de esta especie, gramnegativas como *Pseudomonas*, se ajustan más a lo sugerido por Uhlinger y White (1983) ya que tanto los herbicidas como los metales pesados, en las concentraciones utilizadas, indiscutiblemente provocaban un estrés fisiológico y las observaciones del crecimiento en las placas se realizaba ya avanzada la fase de latencia (18-24 horas a 37 °C, e incluso una semana, cuando se incubaron a temperatura ambiente) (Datos no publicados previamente).

Otro aspecto muy controvertido se refiere a si la producción de polímeros extracelulares resulta ventajosa a las bacterias o no. Quienes abordan el dilema desde el punto de vista energético afirman que la producción de cápsula implica una inversión importante de ATP (Jarman y Pace, 1984). La aparición de mutantes no mucoides, cuando se trabaja en cultivos continuos, es una evidencia de que las mismas poseen ventajas adaptativas que las seleccionan hasta superar, en términos poblacionales, a sus homólogas productoras de cápsulas (Mian *et al.*, 1978; Jarman y Pace, 1984). Sin embargo, en los medios naturales las bacterias enfrentan condiciones muy diferentes a las investigadas en los laboratorios, mucho menos las que imponen los cultivos continuos en los que por lo general los microorganismos están obligados a multiplicarse a su velocidad máxima de crecimiento.

Las bacterias en los diversos ecosistemas se encuentran como: a) bacterias planctónicas, de

libre flotación, y b) bacterias biofilm, formando colonias de microorganismos sésiles. Se postula que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico. Las bacterias planctónicas se mantienen en dicho estado hasta tanto logran adherirse a superficies, momento en el que, si se dan las condiciones requeridas, se organizan en biofilms (Sanclement *et al.*, 2005; Ramadan *et al.*, 2005; Ramadan, 2006). Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, constituyen la forma habitual de crecimiento de las bacterias en los medios naturales (Costerton *et al.*, 1995).

Desde que Koch introdujo el uso de los medios de cultivo a finales del siglo XIX, casi todo lo estudiado, hasta el momento actual, aborda sólo a los gérmenes planctónicos, y descritos en base a sus características de desarrollo en medios de cultivos sintéticos. Esta gran contradicción con lo expuesto en el párrafo anterior se debe, fundamentalmente, al hecho que la investigación que presupone a las bacterias embebidas en biofilms es más difícil que la realizada con bacterias planctónicas (Nazar, 2007). Desafortunadamente, este enfoque centrado en el desarrollo de estas últimas en cultivos de laboratorio, una condición que tiene escasa relación con los ambientes microbianos verdaderos, ha limitado la comprensión respecto a las interacciones bacterias – medio ambiente, incluido el caso donde ese medio no es otro que el hospedero humano o animal (Donlan, 2002; Thomas y Nakaishi, 2006).

Los biofilms se crean cuando las bacterias libres flotantes “perciben” una superficie, se adhieren a ella y, a continuación, elaboran señales químicas para coordinar diferenciación y formación de estructuras, incluyendo el desarrollo de una cubierta polisacárida –la cápsula, asumida como estructura no esencial en las investigaciones convencionales- protectora (Scott y Manning, 2003). Las bacterias pueden formar biofilms en cualquier ambiente líquido. Las interfases sólido-líquido (una superficie y la fase acuosa –agua, sangre, etc.) proporcionan las condiciones ideales para la fijación, multiplicación e interacción con otras especies (Geesey, 1982; Sanderson *et al.*, 2006). Estas interacciones, debidas en buena medida a la producción de polímeros extracelulares de natura-

leza polisacárida, determinan el comportamiento y la supervivencia bacteriana en su entorno como se analizará a continuación.

La adhesión a superficies permite a las bacterias (adsorbidas) el acceso a mayores concentraciones de sustrato ya que, además de la adhesión al mismo, incrementan su área de absorción (Láñez, 1998a). Las células adheridas a superficies, al multiplicarse, pueden mantenerse unidas entre sí (microcolonias) y permitir la adhesión de especies diferentes con las que se establecen relaciones simbióticas (consorcios) (Geesey, 1982; Sanderson *et al.*, 2006). Además de la mejor utilización de los sustratos, estos polímeros interactúan con cationes y brindan protección contra agentes líticos (Geesey, 1982).

Los biofilms bacterianos constituyen la estrategia de supervivencia de estos organismos procariontes. Gracias a esta organización logran ventajas significativas que les protegen frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos. La capacidad de formar biofilm no parece restringirse a ningún grupo bacteriano específico y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de biofilms adheridos a superficies en una interfase sólido/líquida, incluyendo patógenos como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella* y *S. aureus* (Anderl *et al.*, 2000; Chole y Faddish, 2003; Post *et al.*, 2004; Thomas y Nakaishi, 2006). La adhesión a una superficie húmeda (inanimada o viviente), es de carácter irreversible; el biofilm no logra ser removido mediante lavado suave (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2002; Fergie *et al.*, 2004; Ramadan, 2006).

van Leeuwenhoek (1676, 1683), utilizando sus microscopios artesanales, fue el primero en describir la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales, por lo que se le reconoce como el descubridor de los biofilms bacterianos (Donlan, 2002). Tal como sucedió con mucho de lo observado por este agudo holandés, el pobre desarrollo de las ciencias del momento limitó valorar su importancia. Así, no es hasta la década del ‘70 del pasado siglo que, tratando de encontrar una explicación a la resistencia bacteriana a diversos desinfectantes cons-

tratada en sistemas de aguas industriales, se redescubrió la presencia de comunidades bacterianas embebidas matrices glucoprotéicas formadas en superficies en contacto con el agua a las que se denominó *biofilms*. A estas curiosas asociaciones, como hipótesis, se atribuyó la explicación del fenómeno investigado (Costerton *et al.*, 1978).

Jones (1970), por su parte, había reportado que la presencia de metales tóxicos en el mar inducía a las bacterias marinas a producir grandes cantidades de materia orgánica extracelular, la cual interactuaba con los iones metálicos, reduciendo su toxicidad en el ambiente. Lamentablemente, esta valiosa información, al igual que la de Costerton *et al.* (1978), no figuraron entre las fuentes utilizadas por los investigadores liderados por Karadjov, al publicarse en revistas ajenas a la esfera veterinaria. En la actualidad, el carácter multidisciplinario de los equipos de investigación, posibilita que esta vertiente utilísima, llamada *biorremediación*, figure tanto en temas de salud, como geológicos y ecológicos, entre otros, al posibilitar el rescate racional de ambientes contaminados (Corzo *et al.*, 1994; Unz y Shuttleworth, 1996; Novo *et al.*, 2000; Suárez y Reyes, 2002).

Suárez y Reyes (2002), en su monografía “La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente”, destacan la alta toxicidad de los metales, comparable con su utilidad, razón que convirtió al hombre en su principal diseminador en los medios naturales. Estas autoras describen los principales mecanismos inherentes a bacterias que las convierten en los instrumentos idóneos para contrarrestar el daño hecho al planeta y rescatar los ecosistemas más afectados. Entre los mecanismos abordados, destacan aquellos en los que se involucra la producción de polímeros extracelulares para la movilización e inmovilización de metales. En el primer caso se refiere a la capacidad de ciertas bacterias para liberar los metales constitutivos de algunos compuestos químicos. El ejemplo más conocido es el *Thiobacillus ferrooxidans*, responsable de la lixiviación de Fe, Cu y Mo, razón por la cual se utiliza en la extracción industrial de estos metales (Novo *et al.*, 2000). La inmovilización alude a la capacidad inherente a las biomasas bacterianas para atrapar metales, uniéndolos a sus componentes estructurales, aspecto que posibilita utilizarlas para recuperar metales de efluentes industriales (Unz y Shuttleworth, 1996). La interacción entre

los polímeros microbianos y los metales pesados tiene implicaciones ecológicas y prácticas importantes ya que puede mediar la fijación de metales a las partículas de arcilla en el suelo, con las consecuentes alteraciones en los cultivos agrícolas, intervenir en algunos pasos de los ciclos biogeoquímicos de los elementos, alterándolos, e inmovilizar los metales tóxicos de efluentes líquidos, reduciendo su biodisponibilidad (Corzo *et al.*, 1994).

A todo lo beneficioso analizado anteriormente, se contrapone el lado negativo de las bacterias en biofilms, justamente el tema que aborda este trabajo: su resistencia a antimicrobianos diversos. Para poder comprender este complejo fenómeno, es preciso, más allá de esa bacteria capsulada de forma independiente, que por lo general asumimos, pensar en términos de poblaciones (de un tipo microbiano o mixtas) inmersas en una matriz o glicocálix.

En los biofilms existe un medioambiente muy dinámico. En ellos la tasa de intercambio de material genético es elevadísima, sobre todo la mediada por plásmidos (Sanclement, 2005; Ramadan, 2006). Se ha demostrado que la matriz de biofilms de *P. aeruginosa*, una de las especies más polirresistentes, contienen ADN como constituyente principal. Es evidente que una tasa de transferencia génica, mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre bacterias biofilms, posibilite la redistribución de genes entre sus miembros de forma continua, lo que repercute en su adaptación evolutiva (Post *et al.*, 2004). Existen evidencias de cómo cepas bacterianas de importancia clínica, portadoras de plásmidos, desarrollan biofilms más fácilmente y, además, transfieren dichos plásmidos a organismos receptores, generando la formación de biofilm. Sin plásmidos, estas bacterias producen solamente microcolonias de escaso desarrollo.

Los plásmidos pueden codificar resistencia a múltiples antimicrobianos (antibióticos, desinfectantes, metales pesados) y, al mismo tiempo la información para diversos factores de virulencia (fimbrias, exoenzimas que potencian la invasividad, cápsulas antifagocíticas, toxinas, sistemas para atrapar hierro, etc.) (Harnett y Gyles, 1984, 1985; Barreto y Rodríguez, 2006) A ese conjunto de información genética, que no necesariamente ha de estar en plásmidos, también se da en el nucleoide, es a lo que se ha denominado

“islas de patogenicidad”. Se trata de un proceso largo, en el que este planeta, con las condiciones que hemos creado, ha actuado en forma de inmenso laboratorio (Barreto y Rodríguez, 2006).

A partir de lo expuesto resulta evidente que: si estas islas de patogenicidad se ubican en plásmidos, podrán diseminarse con alta frecuencia a través de conjugación a bacterias de la misma especie, afines, e incluso diferentes, fenómeno que se potenciará significativamente cuando tiene lugar en biofilms. De ahí que esta forma de asociación, al seleccionar variantes resistentes a los antimicrobianos, está favoreciendo el predominio de biotipos con una virulencia exacerbada (Donlan, 2002; Sanclement *et al.*, 2005; Ramadan, 2006; Cervantes y Gutiérrez-Corona, 2006; Barreto y Rodríguez, 2006), aspecto al que se brinda poca atención.

Pero, además de la resistencia asociado a la transferencia de plásmidos, los propios biofilms por su arquitectura confieren nuevas propiedades a los miembros que la integran. Para ilustrar lo planteado con un ejemplo vale señalar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ampicilina para una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en estado planctónico es de 2 µg/mL. Esta misma cepa, al crecer como biofilm, exhibe 66% de sobrevivencia luego de terapia con 5 000 µg/mL del antimicrobiano (Stewart y Costerton, 2001; Chole y Faddis, 2003; Sanderson *et al.*, 2006).

Para explicar esta resistencia se han planteado diversas hipótesis: *(a) Penetración lenta o incompleta del antibiótico en el biofilm*: la matriz de exopolisacáridos constituye una barrera que impide el ingreso del antimicrobiano. Aunque hay estudios *in vitro* en los que se demuestra la penetración de algunos antibióticos al biofilm, se postula que pueden ser desactivados por acción de polímeros extracelulares, o sólo alcanzan una difusión limitada dentro de estas matrices aniónicas (Stewart y Costerton, 2001; Post *et al.*, 2004). *(b) Causas metabólicas*: una baja actividad metabólica, debida a limitaciones de oxígeno y nutrientes, puede provocar que la población ingrese en un estado de lentificación o cese de su mitosis, sobre todo las bacterias situadas más profundamente, con lo cual dejan de ser sensibles a los antimicrobianos. Se ha descrito la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de biofilms debido a consumo completo del oxígeno en las capas superficiales. Los aminoglicósidos, resultan menos

eficaces contra la misma bacteria en condiciones anaeróbicas que aeróbicas. No puede descartarse el efecto debido a la acumulación de productos ácidos del biofilm que provocan diferencias significativas de pH entre el exterior y el interior de éste, interfiriendo con la acción del antibiótico (Stewart y Costerton, 2001; Post *et al.*, 2004). *(c) Cambios genéticos:* como ya se ha expresado, la elevada tasa de transferencia genética conlleva, en su expresión fenotípica, a modificaciones en la fisiología de las bacterias biofilm, debido a la aceptación y recombinación de genes específicos que potenciarían mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos (Scott y Manning, 2003; Chole y Fraddis, 2003; Post *et al.*, 2004; Sanclément *et al.*, 2005; Thomas y Nakaishi, 2006). No obstante el respaldo mayoritario a esta hipótesis, Stewart y Costerton (2001) expresan sus dudas al respecto, señalando que cuando las bacterias son dispersadas desde un biofilm, con frecuencia se tornan rápidamente susceptibles a antibióticos, lo que sugeriría que tal resistencia no sería adquirida vía mutaciones o recombinación (Nazar, 2007). *(d) Formación de endosporas:* esta hipótesis se sustenta en la posible génesis de una subpoblación de bacterias biofilm con un estado fenotípico muy especial y altamente protegido, con una diferenciación semejante a endosporas. Se basa en investigaciones que muestran resistencia en biofilms recientemente formados, aún cuando éstos son demasiado delgados para constituir una barrera a la penetración de agentes antimicrobianos (Stewart y Costerton, 2001).

Dada la gran información existente al respecto de los mapas genéticos de la mayoría de las especies mencionadas, los autores del presente trabajo consideran que la hipótesis “d” resulta la más improbable. La esporulación es un estado fisiológico, genéticamente determinado en géneros bacterianos particulares, ninguno de los cuales comprende las especies analizadas; no obstante, durante más de 3 décadas se han estudiado las denominadas proteínas de *shock*, con frecuencia presentes en *Salmonella*, luego de pasteurizaciones ineficientes a alimentos, que las hace tolerantes a ulteriores procesos a temperaturas que normalmente no soportarían (Murano y Pierson, 1993). Más que hipotéticas endosporas, tal vez la resistencia este relacionada con variantes de este tipo. Otro aspecto que no puede des-

entenderse es que los antibióticos utilizados rutinariamente en clínica han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no extrapolarse a esa misma bacteria cuando lo hace en el interior de un biofilm. Las mismas propiedades que hacen a las bacterias biofilms resistentes a antibióticos, y al sistema inmune (aspecto no analizado en este trabajo), también las tornan difíciles de cultivar *in vitro*. Incluso, su estado metabólico dentro del biofilm puede imposibilitar por completo su cultivo (Post *et al.*, 2004).

La unión bacteriana a una superficie, y la formación paulatina de un biofilm requieren de “comunicación” entre sus integrantes. En los ‘90 del pasado siglo se constató la existencia de señales químicas coordinadas que posibilitaban dicha comunicación y regulaban las funciones de la población en los biofilms; los mediadores resultaron ser proteínas y al mecanismo de regulación se le dio el nombre de *quorum sensing*, el mismo posibilita, entre otras, establecer la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad poblacional existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. Cuando una bacteria se une a una superficie produce una molécula señal (*sensing*); mientras más se unen (*quorum*) mayor será la concentración local de la señal. A continuación se inducen diferentes fenómenos en las bacterias para, finalmente, producirse la diferenciación que caracteriza al biofilm. Su objetivo es coordinar comportamientos específicos, o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad (*quórum*), los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios (Portera, 1999; Donlan, 2002; Ramadan, 2006; Nazar, 2007). Los microorganismos involucrados secretan moléculas señalizadoras denominadas autoinductores como las acil-homoserina-lactonas, que predominan en bacterias gramnegativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en las grampositivas. Además, poseen un receptor que puede detectar específicamente el auto-inductor respectivo. Cuando éste se une al receptor activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (Thomas y Nakaishi, 2006).

Davies *et al.* (1998) demostraron que en la formación de biofilm en *P aeruginosa* están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula-célula: *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*. Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación del biofilm. Mutantes incapaces de elaborar ambas señales producen biofilms notoriamente más delgados y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidos mucho más fácilmente de superficies mediante uso de surfactantes. La adición de lactona homoserina al medio que contiene los biofilms mutantes da origen a biofilms similares a los de bacterias no mutantes (Donlan, 2002).

En los años posteriores se ha ido dilucidando la genética que rige la señalización célula-célula y la traslocación coordinada de genes responsables de factores de defensa y virulencia (Scott y Manning, 2003) que determinan la producción de factores de virulencia, la invasividad, e incluso el abandono del sustrato (entre ellos los hospederos humanos o animales) y la búsqueda de nuevas opciones (nuevos hospederos) (de Kievit e Iglewski, 2000), todo lo cual resulta imprescindible para quienes traten de comprender los mecanismos de infección en las enfermedades de etiología bacteriana, así como la resistencia de estos agentes en las enfermedades crónicas. En tal sentido, resultan muy útiles las revisiones de Laza *et al.* (s.a) y Nazar (2007).

Luego de tan extenso análisis resulta justo reconocer la certeza de lo aseverado por Karadjov cuando, desde los tempranos '80, llamaba la atención sobre la inducción de cápsula –no podía llamarle biofilm– como respuesta bacteriana ante contaminantes del ecosistema tan agresivos como metales pesados y herbicidas. Huelgan también los comentarios al respecto de que dichos polímeros extracelulares constituyen una estructura no esencial, tal vez si se sigue estudiando a las bacterias en su fase planctónica.

REFERENCIAS

- AARESTRUP, F.M., HASMAN, H. (2004). Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet. Microbiol.* 100: 83-89.
- ANDERL, J.N., FRANKLIN, M.J., STEWART, P.S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1818-1824.
- BARRETO, G., KARADJOV, Y. (1985). Producción de pili, acción hemoaglutinante y adhesión en cepas de *E. coli* con características diversas, influidas por presencia de sulfato de cobre. *Memorias del VI Congreso de Microbiología.* Varna, tomo I, Internacional. 13 al 15 de octubre de 1985. P. 533-536.
- BARRETO, G., KARADJOV, Y. (1986). Antibiótico-resistencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas en cerdos diarreicos procedentes de zonas fumigadas con pesticidas y libres de fumigación en la provincia de Camagiuey. *Rev. Prod. Anim.* 2 (2): 145-148.
- KARADJOV, Y., BARRETO, G. (1986). Antibiorresistencia en cepas de *E. coli* aisladas de cerdos diarreicos procedentes de zonas contaminadas con metales pesados y libres de contaminación en la República Popular de Bulgaria. *Rev. Prod. Anim.* 2 (3): 227-230.
- BARRETO, G. (1986). Estudio comparativo del agente causal de la colibacteriosis porcina en cerdos en Bulgaria y Cuba con vistas a su terapia y profilaxis. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto Superior de Zootecnia y Medicina Veterinaria de Stara Zagora, Bulgaria.
- BARRETO, G. (1988). Algunas consideraciones acerca de la influencia de determinados contaminantes ambientales sobre las bacterias residentes, influencia en la viabilidad, cambios morfológicos y culturales. *Rev. Prod. Anim.* 4 (1): 69-71.
- BARRETO, G., RODRÍGUEZ, H. (2006). Impacto del entorno en la virulencia bacteriana. *Monografías.com* (2006) <http://www.monografias.com/trabajos37/virulencia-bacteriana/virulencia-bacteriana2.shtml>
- BARRETO, G. (2009). Microbiología para estudiantes de Ingeniería Química. Universidad de Camagiuey. Tomo II: Genética y Fermentaciones. CD-ROM CYTDES 2009. ISBN: 978-959-16-0983-0. pp. 9-10.
- BRUINS, M.R., KAPI, B., OEHME, F.W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 45 (3): 198-207.
- BUNNER, C.A., NORBY, B., BARTLETT, P.C., ERSKINE, R.J., DOWNES, F.P., KANEENE, J.B. (2007). Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods. *J. Am Vet Med Assoc.* 231, (2):275-83.
- CABRERA, C.E., GÓMEZ R.F., ZÚÑIGA, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de

- los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. 38 (2): 149-158.
- CERVANTES, C., GUTIERREZ-CORONA, F. (2006). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiology Reviews. 14 (2): 121-137.
- CHEN, Z., KEN, L., SHAO, Q., SHI, D., RU, B. (1999). Expression of mammalian metallothionein-I gene in cyanobacteria to enhance heavy metal resistance. Mar. Pollut. Bull. 39: 155-158.
- CHOLE, R.A, FADDIS, B.T. (2003). Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 129: 634-6.
- CHOUDHURY, R., SRIVASTAVA, S. (2001). Zinc resistance mechanisms in bacteria CURRENT SCIENCE. 81 (7): 768-775.
- CORZO, J., LEÓN-BARRIOS, M., HERNANDORICO, V., GUTIERREZ-NAVARRO, A. (1994). Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (chamaecytisus)* strain BGA-1. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4531-4536.
- COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., CHENG, K.J. (1978). How bacteria stick. Sci Am. 238: 86-95.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPINSCOTT, H.M. (1995). Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49: 711-745.
- 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: 295-8.
- DE KIEVIT, T.R., IGLEWSKI, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. Infection and Immunity. 68: 4839-4849.
- DEPARDIEU, F., PODGLAJEN, I., LECLERCQ, R., COLLATZ, E., COURVALIN, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev. 20: 79-114.
- DO, N.T., CU, H.P., NGUYEN, N.N., NGUYEN, X.H., AU, X.T., VAN, T.H., VU, N.Q., TROTT, D.J. (2006). Antimicrobial Resistance Phenotypes of ETEC Isolates from Piglets with Diarrhea in North Vietnam. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1081): 543 - 545.
- DONLAN, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8 (9): 881-890.
- EARSS. (2005) (European Antimicrobial Resistance Surveillance System). Annual Report . Disponible en: <http://www.rivm.nl/earss/>.
- EFSA. (2008a) Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards;. Published: 2 April 2008; Adopted: 6 March 2008. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178697425124.htm.
- EFSA. (2008b). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. The EFSA Journal 765:1-87.
- EASAC. (2007). (European Academies Science Advisory Council). Tackling antibacterial resistance in Europe. Disponible en: <http://www.easac.eu/document.asp?id=68&pageno=1&detail=1&parent=31>
- FALAGAS, M.E., BLIZIOTIS, I.A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? Int J Antimicrob Agents. 29: 630-636.
- FERGIE, N., BAYSTON, R., PEARSON, J., BIRCHALL, J. (2004). Is otitis media with effusion a biofilm infection? Clin Otolaryngol. 29: 38-46.
- GEDDIE, J.L., SUTHERLAND, I.W. (2008). Uptake of metals by bacterial polysaccharides. 74 (4): 467 - 472.
- GEESEY, G.G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. ASM News 48:9-14.
- GEESEY, G.G., JANG, L. (1989). Interactions between metal ions and capsular polymers. In: Metal Ions and Bacteria (Beveridge TJ, Doyle RJ, eds). New York:Wiley. pp. 325-357.
- HARBARTH, S., SAMORE, M.H. (2005). Antimicrobial resistance determinants and future control. Emerg Infect Dis. 11:794-801.
- HARNETT, N.M., GYLES, C.L. (1984). Drug and heavy metal resistance, colicin production and biochemical characteristic of selected bovine and porcine *E. coli* Appl. Environ. Microbiol. 48: 930, 935.
- HARNETT, N.M., GYLES, C.L. (1985). Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin production in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *E. coli*. Am. J. Vet. Res. 46 (2): 428-433.
- HSIEH, K.M., LION, L.W., SHULER, M.L.(1990). Production of extracellular and cell associated biopolymers by *Pseudomonas atlantica*. Biotech Let. 12:449-454.
- ÍÁÑEZ, E. (1998a). Curso de Microbiología General. Estructuras superficiales de la célula bacteriana. Hipertextos del área de la Biología. Citado en: http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/04_capsula.htm
- ÍÁÑEZ, E. (1998b). Curso de Microbiología General. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Hipertextos del área de la Biología. Citado en: <http://fai.un>

- ne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm
- IÁÑEZ, E. (1999). Curso de Inmunología General. 16 El sistema del Complemento. Hipertextos del área de la Biología. Disponible en: www.ugr.es/~eia-inez/inmuno/cap_16.htm
- JANSEN, W.T., VAN DER BRUGGEN, J.T., VERHOEF, J., FLUIT, A.C. (2006). Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resist Updat.* 9:123-33.
- JARMAN, T.R., PACE, G.W. (1984). Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch Microbiol* 137:231-235
- JOKLIK, W.K., WILLET, H., AMOS, D.B. (1983). *Zinsser Microbiología*. Tomo I. Edición Revolucionaria. p. 37-46,
- JONES, G.E. (1970). Metal organic complexes formed by marine bacteria. In: *Organic Matter in Natural Waters* (Hood DW, ed). College, AK:Institute of Marine Science. p:301-319.
- KAMBUROV, G. (1986). *Microbiología veterinaria, virología e inmunología*. Semisdat. Sofía, Bulgaria. p. 25-32.
- KARADJOV, Y., BRATANOV, B., KOLALOVSKI, B., MIJAILOV, C., MONOD, G., NEDELCHOVA, K., DELEV, P. (1979). Aspectos higiénico-veterinarios de la contaminación del medio ambiente. *Zemisdat*. Sofía.
- LASA, I., DEL POZO, J.L., PENADÉS, J.R., LEIVA, J. (s.a). *Biofilms bacterianos*. s.a. Disponible en: www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/
- LINARES, J.F., MARTÍNEZ, J.L. (2004). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23: 86-93.
- LION, L.W., SHULER, M.L., HSIEH, K.M., GHIORSE, W.C. (1988). Trace metal interactions with microbial biofilms in natural and engineered systems. *CRC Crit Rev Environ Control.* 17: 273-306.
- MAYNARD, C., FAIRBROTHER, J.M., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R.C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIERE, S., HAREL, J. (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23 - year period from pigs. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 47, (10): 3214-3221.
- MEDIAVILLA, A., FLOREZ, J. y GARCÍA-LOBO, J.M. (1997). *Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociación de antibióticos*. En: *Farmacología Humana*. J. FLOREZ, J A. ARMIJO, A. MEDIAVILLA (Dir.) Ed. Masson S.A. p. 1061-1083. Barcelona.
- MIAN, F.A., JARMAN, T.R., RIGHELATO, R.C. (1978). Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 134: 418-422, 1978.
- MITOV, G.I., KPRELIAN, G.K., DIMITROV, D.I., TIGUNENKO, I.B., MARINOVA, R.S., ZLATEV, S.P. (1983). *Microbiología para estudiantes de medicina*. Medicina y Fisiocultura. Sofía, Bulgaria. p. 30-45.
- MURANO, E.A., PIERSON, M.D. (1993). Effect of heat shock and incubation atmosphere on injury and recovery of *E. coli* O157:H7. *J. Food. Protect.* 56: 168-172, 1993.
- NAZAR, J. (2007). *Biofilms bacterianos*. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 67: 61-72, 2007.
- NOVO, M., DA SILVA, A., MORETTO, R., CABRAL, P., COSTACURTA, A., GARCIA, O., OTTOBONI, L. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonievvan-Leeuwenhoek* 77: 187-195.
- OROZCO, E., KARADJOV, Y., KAMBUROV, G., TODOROV, B. (1983). Experimental mastitis in cows caused by staphylococci, streptococci and corynebacteria. *Veterinary Science*. (Sofia). 20 (1): 24-29.
- PAVONI, J.L., TEENEY, M.W., ECHELBERGER, W.F.J.R. (1972). Bacterial exocellular polymers and biological flocculation. *J Water Pollut Control Fed* 44:414-431.
- PELCZAR, M.J., REID, R.D. (1966). *Microbiología*. Ediciones del Castillo, S.A. Edición en español. pp. 65-73.
- PHARMACHIM. (1986). *Guía de Medicamentos de Medicina Veterinaria*. Remedia Veterinaria. Pharmachim. Bulgaria.
- POST, J.C., STOODLEY, P., HALL-STOODLEY, L., EHRLICH, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 12: 185-190.
- PORTERA, C. (1999). Forging a link between biofilms and disease. *Science.* 283: 1837-1839, 1999.
- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. (2004). *Microbiología*. 5a. ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- RAMADAN, H.H., SANCLEMENT, J.A., THOMAS J.G. (2005). Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 132: 414-7.
- RAMADAN, H.H. (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14(3): 183-186
- SANCLEMENT, J.A., WEBSTER, P.L., THOMAS, J., RAMADAN, H.H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 115: 578-582, 2005.

- SANDERSON, A.R., LEID, J.G., HUNSAKER, D. (2006). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 116: 1121-6. SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. The SCENIHR adopted this opinion at the 28th plenary on 19 January 2009 after public consultation. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Scientific Committee. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf
- SCOTT, C., MANNING, S.C. (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J*. 82 (suppl): 18-20, 2003.
- SENEZ, J.C. (1976). *Microbiología General*. Editorial Alambra. Primera Edición en español. pp. 106-108.
- STEWART, P.S., COSTERTON, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358: 135-138.
- SUÁREZ, P., REYES, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. 7 (4): 160-164.
- SZYBALSKI, W., BRYSON, V. (1952). Genetic studies on microbiological cross resistance to toxic agents. *Journal of Bacteriology*. 64: 489-499.
- THOMAS, J.G., NAKAISHI, L.A. (2006).: Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc* 137(suppl): 10S-15S.
- UHLINGER, D.J., WHITE, D.C. (1983). Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl Environ Microbiol* 45:64-70.
- UNZ, R., SHUTTLEWORT, H.K. (1996). Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Curr. Opinion Biotechnol*. 7: 307-310.
- US PATENT 6042848: Enhancement of antimicrobial peptide activity by metal ions US Patent Issued on March 28, 2000. Disponible en: <http://www.patentstorm.us/patents/6042848/description.html>.
- VAN LEEUWENHOEK, A. (1676). Letter of 9 October 1676 to the Royal Society, London. Royal Society, MS. L.1.20. 1676.
- van LEEUWENHOEK, A. (1683). Letter of 17 September 1676 to the Royal Society, London. Royal Society, MS. L.1.69, 1683.
- VULLO, D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2 (3): Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>.
- WILLIAMS, A., WIMPENNY, J.W.T. (1977). Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J Gen Microbiol* 102:13-21. 1977.
- WHO, the world health report (2007). A safer future: global public health security in the 21st century. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2007/en/index.html>
- YEAMAN, M.R., YOUNT, N. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*. 55 (1): 27-55

Recibido : 22-7-2008

Aceptado: 25-11-2008