

Biopelículas

Blanca M. Rosales y Silvia E. Rastelli

- *Formación y desarrollo de biopelículas*
- *Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas*
- *Casos de estudio*
- *Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas*
- *Bibliografía*

Formación y desarrollo de biopelículas.

Una gran variedad de microorganismos están presentes en todos los ambientes acuáticos (o muy hidratados), tanto naturales como industriales. Estos microorganismos constituyen y viven en comunidades multicelulares y presentan gran tendencia a fijarse y crecer sobre superficies bióticas o abióticas inmersas en el agua y formar las denominadas *biopelículas* (1). En ambientes naturales es frecuente encontrar microorganismos eucariotas como algas, protozoos y hongos junto a las bacterias, mientras que en ensayos de laboratorio o ambientes naturales extremos se encuentran biopelículas constituidas casi exclusivamente por procariotas (2).

La transición de microorganismos que se desplazan en ambientes líquidos como células libres a fijados en superficies como parte de comunidades en biopelículas, procede en diversas etapas, que culminan en la formación de estructuras complejas de células: planctónicas, adheridas, estructuradas en microcolonias o macrocolonias o desprendidas (3).

Si bien existen varios modelos y descripciones, el desarrollo de una biopelícula puede generalizarse en las siguientes etapas (4):

- a) **Acondicionamiento:** se produce la instantánea adsorción de productos orgánicos con los cuales los microorganismos no están relacionados (película condicionante).
- b) **Adhesión de especies bacterianas pioneras:** algunas bacterias se adhieren a la superficie sumergida en cuestión de horas.
- c) **Colonización de otros microorganismos:** otras bacterias y hongos comienzan a asociarse a la superficie luego de la colonización de las pioneras en cuestión de días.
- d) **Acumulación:** se produce el agregado de partículas, células muertas y compuestos de metales. Estos pueden encontrarse como productos de corrosión o como iones en solución.

En la Figura 1 puede observarse un esquema de formación de una biopelícula sobre un sustrato según Jenkinson and Lappin-Scott, 2001 (5). Su formación comienza con la **adhesión** de bacterias a una superficie previamente acondicionada, es decir, donde ya se ha producido la adsorción de materia orgánica proveniente del medio acuoso. Luego se produce la **colonización** de la superficie debido a la división de las células adheridas y a la liberación de material polimérico extracelular (MPE) (ver detalles mas adelante), posteriormente comienzan a **acumularse** hasta llegar a formar una comunidad en equilibrio o "**comunidad clímax**", en la que pueden distinguirse microorganismos sésiles (pegados a la superficie e inmóviles) y planctónicos (los que se mueven

con el flujo de agua). La biopelícula madura, ya establecida, no se mantiene estática sino que es una entidad dinámica y una vez alcanzado un tamaño crítico se produce su **dispersión**: una parte de ella puede ser desprendida por el movimiento del líquido y redepositarse en otra zona donde el proceso se reiniciará.

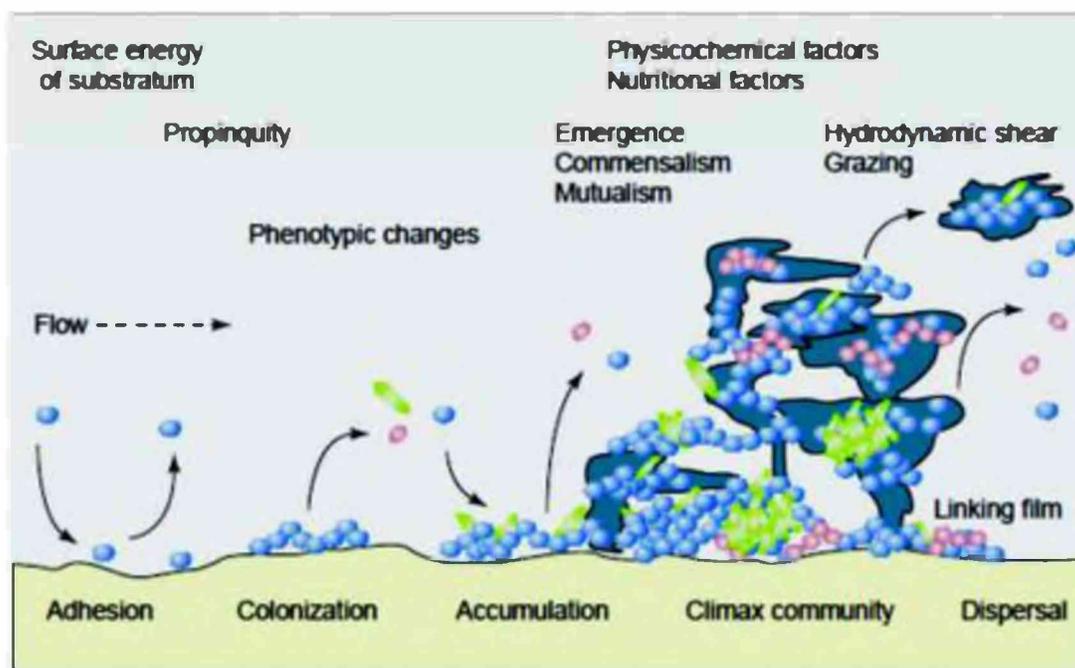


Figura 1. Etapas de desarrollo de una biopelícula. Extraído de Jenkinson and Lappin-Scott, 2001 (5).

En el inicio de la formación de la biopelícula las células se adhieren a un sustrato, y un sustrato al cual no se pueden adherir las células tiene todavía que ser descubierto. La falta de comprensión o al interpretar la información de la superficie de la célula, tal como su hidrofobicidad o carga, ha resultado al menos en lo que a las células bacterianas concierne, en una falta de consenso sobre la importancia de factores físico-químicos en la adherencia no-específica. Una perspectiva sostiene que la distinción entre la adherencia específica (mediada por el receptor) y no-específica es artificial (2). Sin embargo, está claro que en la adherencia no-específica una combinación de todos los rasgos conduce a un conjunto célula-superficie que establece la afinidad por el sustrato. Si la composición de la superficie de la célula o del sustrato cambia, la afinidad puede cambiar. Organismos modelo, tales como cepas con definidas mutaciones en la pared celular o composición conocida de exopolímero, y sustratos modelo cuyas características físico-químicas superficiales fueran conocidas podrían usarse para predecir su tendencia a adherirse no-específicamente.

En el laboratorio, el sistema en estudio se mantiene generalmente limpio para evitar errores que puedan derivarse de contaminantes, especialmente moléculas orgánicas. Sin embargo, en sistemas naturales no existen sustratos limpios: son rápidamente (en minutos) cubiertos con una delgada película de contaminantes orgánicos designados como película condicionante. La composición de esta película puede ser influenciada por las propiedades físico-químicas del sustrato.

Las biopelículas constituyen un modo de crecimiento que permite a los microorganismos sobrevivir, aún en ambientes hostiles, siendo sus fenotipos, fisiología y comportamiento significativamente diferentes de sus contrapartes planctónicas (6,7). Las características estructurales, químicas y fisiológicas de una biopelícula dependen tanto de los microorganismos que la constituyen como de las condiciones ambientales locales. Las bacterias en biopelículas no sólo difieren de las planctónicas de su misma especie, sino además en biopelículas mono-específicas demuestran vasta heterogeneidad en términos de metabolismo, expresión de genes y fisiología debido a las diferentes condiciones o microubicaciones. En la última década se han logrado grandes progresos en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de adhesión bacteriana, comprensión de la estructura y

composición de las biopelículas (3,8).

Las biopelículas son dinámicas con respecto a su estructura y composición, pero pocos estudios se han ocupado de las consecuencias del crecimiento de las biopelículas o de las últimas etapas de su desarrollo. Por lo tanto, se sugiere que las biopelículas deberían ser estudiadas desde un punto de vista diferencial espacio/temporal similar al del desarrollo de la biología. Esquemas generalizados del desarrollo de biopelículas deben ser comprendidos y se los debe investigar en condiciones que sean equivalentes a las que experimenta esa particular biopelícula cuando se desarrolla en la naturaleza. Aunque esta revisión provee visiones espaciales y sobre la composición de ciertos momentos en el desarrollo de biopelículas, debe tenerse en cuenta que el desarrollo es un proceso continuo.

Como ya se ha mencionado, un componente muy importante que mantiene la integridad estructural de la biopelícula lo constituye el MPE, también llamado matriz extracelular, generado en su mayor parte por los mismos microorganismos que la componen (5,7,9). Esta matriz tiene un aspecto de gel y está constituida por proteínas, iones Ca^{+2} , cadenas de polisacáridos y agua que permiten la cohesión entre las células y las protegen de las condiciones hostiles del medio.

La masa de material polimérico se comporta como una membrana de intercambio iónico debido a su alto grado de hidratación. La estructura total de la biopelícula puede asimilarse a un sistema dinámico gobernado por diversos mecanismos de transporte que tienen lugar en su espesor.

Este comportamiento social llevado a cabo por las bacterias para formar las biopelículas es debido a una interacción molecular, que funciona como un sistema de comunicación célula-célula, denominado *quorum sensing* (Figura 2). En este sistema, las bacterias se "comunican" su presencia entre sí, liberando y respondiendo a la acumulación de "señales" mediante compuestos químicos autoinductores. Actualmente, se ha introducido el término sociomicrobiología para el estudio de este comportamiento (10,11).

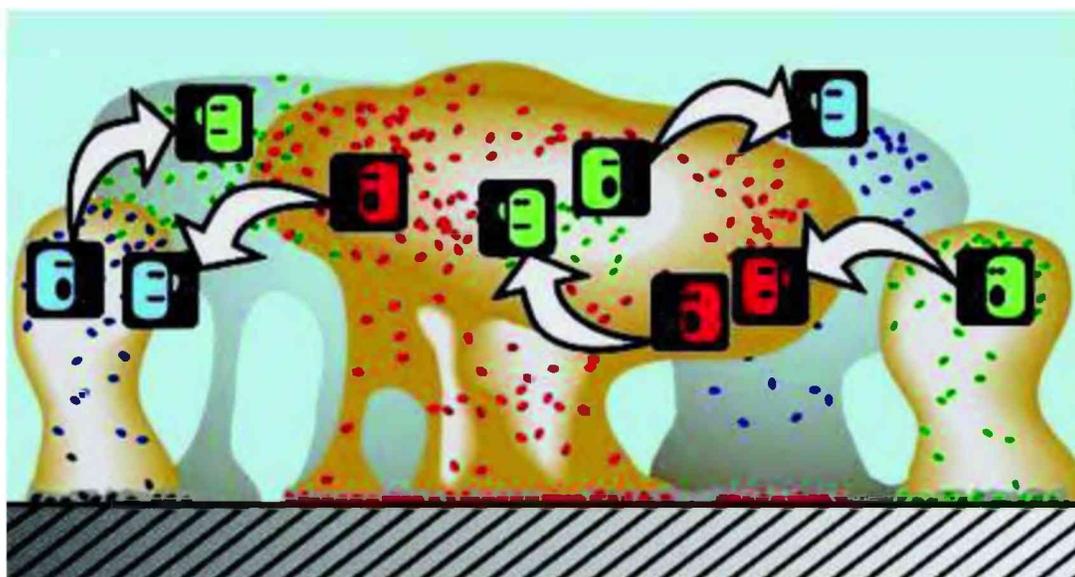


Figura 2. Representación esquemática del sistema de comunicación célula-célula en una biopelícula (13).

Además de la formación de biopelículas existen otros procesos fisiológicos regulados por el *quorum sensing*, entre los que pueden citarse la virulencia, la resistencia a antibióticos y metales pesados y la conjugación (12).

El exponencial incremento experimentado en las investigaciones sobre biopelículas refleja la reciente disponibilidad de nuevas herramientas para encarar estas investigaciones en los últimos años. Un importante concepto en esta tarea es el de ecosistema. Aunque muchas biopelículas son perjudiciales, como la placa dental, las asociadas a implantes quirúrgicos, la resistencia y persistencia de microorganismos patógenos en sistemas de distribución de agua potable y las biopelículas corrosivas en diversas industrias, otras biopelículas son aprovechadas por el ser humano. Plantas de tratamientos de aguas y procesos industriales basados en el uso de lodos activados revelan la

utilidad de las biopelículas. Es la ecología de estas biopelículas la responsable de la efectividad de los procesos y si por algún cambio en las condiciones ambientales la composición de la biopelícula se alterara, disminuiría la efectividad de los procesos y podría aún colapsar ^(2, 14).

La acción de los polímeros presentes en el MPE depositados sobre los sustratos metálicos es la clave para entender los fenómenos de corrosión microbiológica.

Los cambios en el tipo y concentración de iones, en los valores de pH y niveles de oxígeno pueden modificar el estado pasivo del metal o la composición o distribución de los procesos de corrosión induciendo importantes modificaciones en los parámetros usados para evaluar la velocidad de dicho proceso.

Un modelo simplificado de una interfase metal / solución en presencia de bioensuciamiento implica la transferencia de protones y oxígeno a través de la estructura mixta película pasiva / biopelícula. Ambas especies son importantes reactivos en las reacciones catódicas del proceso de corrosión. Si se tiene en cuenta que los microorganismos pueden alterar en gran medida la concentración o la difusión de esas dos especies mediante la respiración (consumo de oxígeno) o la producción de metabolitos ácidos (producción de protones) se puede entender fácilmente la importancia de las biopelículas en los procesos de corrosión (Figura 3).

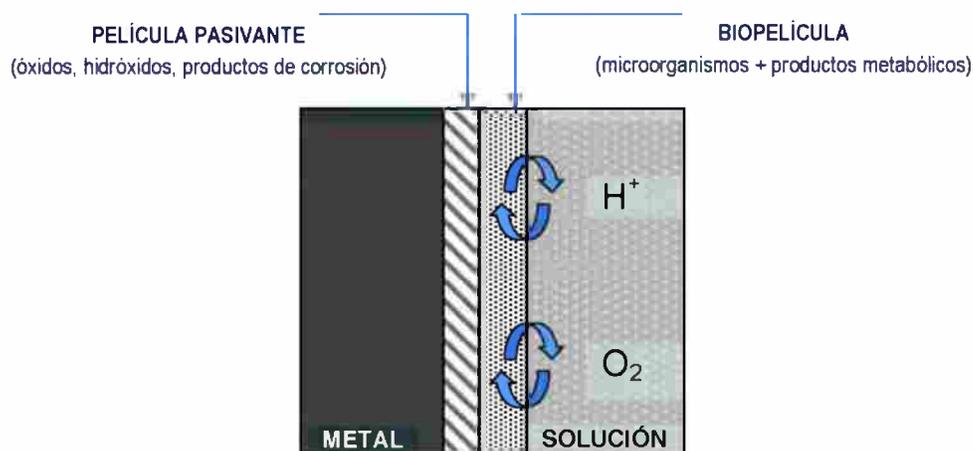


Figura 3. Alteración de la doble capa eléctrica causada por la formación de una biopelícula.

Muchos son los factores que pueden influir en la formación de biopelículas. Entre los más importantes se pueden destacar: fuerzas iónicas, tipo y concentración de cationes presentes en el medio (valencia y carga) y características superficiales del sustrato.

Numerosas reacciones biológicas y físico-químicas tienen lugar en los sistemas de distribución de agua potable, las que generan modificaciones en las características organolépticas y bacteriológicas del agua distribuida. En estos sistemas hay compuestos orgánicos biodegradables designados genéricamente carbono orgánico asimilable (COA) que proporcionan el recurso primario para la formación de una cadena trófica dentro de la tubería ⁽¹⁵⁾. Además, el material de la cañería, los desinfectantes utilizados (principalmente clorados), la velocidad del flujo de agua y otros parámetros que se controlan periódicamente afectan el desarrollo de la biopelícula ⁽¹⁶⁾.

El ataque interior de las cañerías que forman una red de distribución de agua potable es principalmente debido a la corrosión influenciada por microorganismos (CIM). Es típica de sistemas naturales e industriales en los que se desarrollan biopelículas microbianas sobre metales o aleaciones en contacto con el agua. Esta influencia de los microorganismos sobre la corrosión es debida a su capacidad de cambiar variables ambientales como el pH, el poder oxidante, vinculado a su vez a otros compuestos como el O_2 y otros más complejos, controlantes en conjunto de la "capacidad redox" del medio acuático, la velocidad de flujo y la concentración de especies químicas en la superficie del metal. Esto puede resultar en el inicio de un proceso de corrosión, en el cambio del mecanismo de corrosión -de uniforme a localizado- o en un aumento o disminución de la tasa de corrosión. Existen también microorganismos capaces de inhibir la corrosión, Nagiub y Mansfeld, 2001 ⁽¹⁷⁾ observaron la

inhibición de la CIM del Al 2024, de acero de bajo carbono y de cartuchos de latón en agua de mar artificial. Por lo tanto los procesos de formación de biopelículas tienen gran importancia tanto en la CIM como en su inhibición^(1,18,19).

Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas.

Los efectos de la interacción entre los más variados materiales estructurales y los microorganismos presentes en aguas ya se reflejaban en la literatura internacional desde la década de 1970 ⁽²⁰⁾. Las investigaciones se dirigían a la constatación de hechos de validez general, como la secuencia de formación de biopelículas, basadas en la adsorción de biopolímeros, seguidas de colonización y crecimiento de células o animales y finalmente mineralización. Aunque la naturaleza de este proceso de bioensuciamiento parece ser universal, el tiempo que toma la ocurrencia de estos eventos varía desde minutos hasta días, dependiendo de los sistemas y de la concentración de la biomasa en el fluido.

La magnitud del bioensuciamiento depende de la conformación macromolecular predominante del biopolímero inicial, si bien se desconoce la naturaleza exacta de la película condicionante. Estudios mediante microcalorimetría y otras técnicas de análisis superficial demostraron en diversos sistemas que los eventos de adsorción resultaban termodinámicamente favorecidos.

Las investigaciones de biopelículas se desarrollan siguiendo dos tipos de procedimientos: *in situ*, mediante técnicas de química superficial, biofísica, bioquímica, inmunología e ingeniería de transferencia de calor, o *ex situ*, sobre biopelículas removidas de la superficie mediante raspado, tratamiento ultrasónico, remoción con solventes, etc. Se considera el primero como el más seguro ya que permite resguardar la integridad y orientación originales de la película sobre el sustrato.

Para tal tipo de estudios se han empleado exitosamente técnicas como la reflexión interna de espectroscopia infrarroja (FTIR), elipsometría, medidas de potencial superficial, determinaciones de ángulo de contacto, microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis elemental dispersivo en energía (EDS) y difracción de rayos X. Aunque cada una de ellas da un muy variado tipo de información en conjunto proveen un fructífero enfoque cuando se las aplica complementariamente.

Posiblemente la más rápida y sensible técnica conocida para identificar cambios en la constitución superficial de cualquier material está basada en la medida de ángulo de contacto. Los métodos ampliamente desarrollados durante varias décadas por Zisman y coautores en el *Naval Research Laboratory*, EEUU, dieron lugar a una vasta literatura sobre propiedades de líquidos y sólidos que constituyen valiosos aportes a las investigaciones sobre biopelículas.

Los espectros infrarrojos de reflexión interna (IR signature) son otro ejemplo que muestra los estadios más incipientes de formación de biopelículas como la primera evidencia de adsorción sobre materiales. La secuencia de espectros durante diversos tiempos de inmersión en agua revela el crecimiento de la biomasa depositada sobre determinado sustrato luego de variados tiempos de inmersión, desde una proteína detectable en la película seca, pasando por un incremento del espesor en la respectiva banda, debido a su acumulación, hasta los cambios asociados a su hidratación o a un subsiguiente estado hidroxilado. Al cabo de un mayor período de seguimiento se detectan adicionalmente bacterias aisladas y posterior engrosamiento del depósito por incremento en el número de células, así como la presencia de flagelos y de nuevas estructuras de anclaje al sustrato.

Entre las más difundidas técnicas de estudio de biopelículas cabe señalar su caracterización mediante diversas microscopías ⁽²¹⁻³⁰⁾. Tales estudios se encararon para investigar las posibles causas de la alarmante velocidad de corrosión de tuberías de metales en instalaciones industriales y municipales de agua. Picaduras formadas en las paredes de cañerías de cobre pueden perforarlas al cabo de unos pocos meses en sitios cubiertos por biopelículas formadas por abundantes poblaciones bacterianas. La dificultad para caracterizar tales procesos resulta del alto grado de hidratación de las biopelículas que recubren las superficies. Las técnicas analíticas en microscopía de fuerza atómica (AFM) desarrolladas para estos estudios permitieron apreciar notables detalles en la visualización de poblaciones bacterianas heterogéneas asociadas a biopelículas sobre metales ⁽³¹⁻³⁶⁾. Comparada con la microscopía ambiental de barrido (ESEM) esta técnica provee una visión más realista y en la escala de los nanómetros, de la superficie celular y del ordenamiento espacial del material extracelular que lo envuelve. La AFM muestra el recorrido de la superficie en los 3 ejes x, y, z, dando el máximo nivel de detalle

topográfico de la configuración celular, del material polimérico y la ubicación espacial de las fallas que provoca en el sustrato metálico.

La microscopía de epifluorescencia confirma que ciertas especies bacterianas son capaces de adherirse y multiplicarse sobre una superficie de cobre. La heterogénea conformación de esas biopelículas sería responsable de formar celdas de aireación diferencial y variaciones en pH, responsables del incremento de la velocidad de corrosión localizada bajo los depósitos.

La predicción del riesgo y la velocidad de desprendimiento de biopelículas debido a los esfuerzos mecánicos de corte durante la circulación del fluido ha sido una prioridad en la comprensión del bioensuciamiento de redes de distribución de agua en cualquier industria. Tales desprendimientos constituyen la base de la propagación del fenómeno a lo largo de la red además de reducir la calidad del producto transportado e incrementar los costos de producción. En agua potable, en especial constituyen una causa de pérdida de calidad y el grave riesgo de distribución de gérmenes patógenos en poblaciones.

Desde el descubrimiento de la omnipresencia de las biopelículas y del amplio rango de sus efectos sobre estructuras industriales se desarrollaron diversos proyectos internacionales para investigar y comprender sus consecuencias negativas en sistemas acuosos ⁽³⁷⁾. Uno de los puntos focales encarados fue la aparente discrepancia entre la simple estructura de una biopelícula y la complejidad de los variados problemas que origina. El concepto inicial de células bacterianas embebidas en matrices homogéneas de sus exopolímeros difícilmente permitía explicar cómo las más profundamente alojadas en la red accedían a los nutrientes del seno de un fluido. Tampoco resultaba comprensible cómo ciertos agentes antibacterianos podían penetrar hasta la superficie colonizada sin matar las bacterias ubicadas más superficialmente en la biopelícula, como se demostró mediante espectroscopia atenuada de reflectancia total-transformada de Fourier (ATR-FTIR).

La comprensión de mecanismos que permitieran explicar tales hechos fue considerada esencial para desarrollar soluciones a los problemas de ingeniería debidos a las biopelículas microbianas, en el Centro de Ingeniería en Biopelículas de la Universidad de Montana, EEUU. La tarea de desarrollar un apropiado concepto y modelo de la estructura de biopelículas fue encarada en prácticamente todos los proyectos y estudios de ese Centro. Como resultado de tales investigaciones llevadas a cabo en los años 90 mediante aplicación de diversas técnicas microscópicas (SEM, ESEM, CSLM) se revelaron estructuras de notable complejidad y heterogeneidad. En combinación con sofisticado instrumental y novedosos procedimientos los avances científicos logrados permitieron dilucidar características de las biopelículas que permitieron evitar y/o minimizar numerosos de los problemas industriales, ambientales y médicos detectados.

Casos de estudio.

La red de distribución de agua potable de la Ciudad de Buenos Aires es similar y contemporánea de su homóloga de la Ciudad de Londres ⁽³⁸⁾. Al cabo de unos 80 años de servicio, ambas presentaron dos tipos de fallas que parecían colocarlas al límite de sus respectivas vidas útiles. Las cañerías de fundición de hierro desnudo de 8 a 12 cm de diámetro habían acumulado tanto depósito interior de color marrón rojizo, que bloqueaba el transporte del fluido y se producían frecuentes perforaciones. Ambas fallas causaban la interrupción del servicio para reemplazar los tramos afectados.

En Londres se procedió a la remoción mecánica del material acumulado y se aplicó en el interior de la red pintura epoxi bajo agua, con un costo aproximado de 350 millones de dólares.

Para Buenos Aires se implementó un control periódico basado en análisis de las películas formadas dentro de tramos retirados de servicio. Se encontraron depósitos interiores de muy variado espesor desde pocos mm hasta varios cm, que se analizaron mediante técnicas complementarias.

A diferencia de lo supuesto, se determinó que el material acumulado no provenía de la corrosión de la cañería, cuya velocidad de corrosión había sido muy baja durante toda la vida útil de la red, y por el contrario los depósitos analizados presentaban apreciable poder protector contra su corrosión interior. Evaluada la evolución del problema con el tiempo se decidió conservar los depósitos.

En base a los resultados de las diferentes técnicas se decidió cada intervención local necesaria, tanto para la protección anticorrosiva de la red como para el control microbiano del agua potable.

En posteriores estudios, se analizó en laboratorio el efecto de las biopelículas que se forman en el interior de redes de distribución de agua potable y cuáles pueden o no ser causantes de CIM ⁽³⁹⁾. La fuente microbiana

utilizada fue la existente en la red de agua potable de la ciudad de La Plata. Los ensayos se diseñaron para caracterizar las etapas iniciales de colonización, adherencia y ataque microbiano sobre 4 materiales utilizados para cañerías (Fe, Zn, Cu y polipropileno (PP)). Las especies bacterianas recolectadas de cada sustrato se caracterizaron a través de conteo del número total por unidad de área (UFC.cm⁻²), determinación del fenotipo, tinción de Gram y capacidad de formación de biopelículas (CFB).

La comparación entre materiales reveló variable susceptibilidad a la colonización y a la corrosión por la comunidad microbiana presente en la red. La abundancia relativa de biopelículas concordó con los conteos microbianos totales determinados sobre los distintos sustratos.

El número total de microorganismos sésiles (UFC.cm⁻²) dependió del sustrato. Sobre Zn se determinaron los máximos números totales de UFC, adherencia y diversidad de fenotipos. La menor colonización bacteriana se encontró sobre PP. Este resultado podría deberse a la falta de oligoelementos para las bacterias y a una menor rugosidad superficial en el PP.

La estructura, química y fisiología de una biopelícula depende de los microorganismos que la constituyen, del ambiente en el que se forma y de las características físico-químicas del sustrato. Diferentes mecanismos de formación de biopelículas son de gran importancia, así como sus posibles efectos inhibidores sobre la corrosión del material de una red.

La presencia de contaminantes químicos, antropogénicos y de origen natural como el arsénico (As), es un creciente problema sanitario y social en todo el Planeta (40,41).

Sorprendentemente, los 5.000 µg.l⁻¹ de As⁺⁵ adicionados a uno de los circuitos de agua potable en este estudio no sólo permitieron el crecimiento de todos los fenotipos, sino que estimularon el desarrollo de biopelículas más abundantes, gruesas o compactas sobre todos los sustratos. Estos resultados concordarían con el concepto de la formación de biopelículas como un mecanismo de defensa o resistencia de los microorganismos, en este caso en particular, contra el As.

Se midió la absorbancia de bacterias adheridas y de las planctónicas por el método de cristal violeta a 600 nm. Se calculó la capacidad formadora de biopelículas (CFB) = DO adheridas / DO planctónicas. Una *Sphingomonas* sp aislada de las muestras de Cu arrojó el mayor valor de capacidad formación de biopelícula.

Se observaron a simple vista diferencias de distribución en las biopelículas formadas sobre los 7 replicados de cada material expuesto en los circuitos cerrados de agua potable en ausencia y en presencia de As⁺⁵. Sobre cada metal los microorganismos y las biopelículas que forman se mezclan con los productos de corrosión y con material espurio aportado por el agua de río. Sobre Cu y sobre PP se detecta una única y delgada fase de biopelícula que permite observar las bacterias sobre la superficie (mediante SEM, ESEM). Las biopelículas formadas sobre los sustratos metálicos más corroídos, Fe y Zn presentan varias fases, por lo que en la mayoría de los casos los productos de corrosión dificultan la observación de las bacterias.

La aleatoria vista panorámica de los 7 replicados así como la muy heterogénea distribución y cantidad de biopelículas desarrolladas sobre cada sustrato sugirió la necesidad de profundizar el análisis estructural del estudio previo, mediante las más diversas microscopías (SEM, ESEM, CLSM) (42). El objeto de este trabajo fue investigar el efecto de las estructuras interna y externa de las biopelículas sobre la susceptibilidad de colonización y corrosión de los sustratos ensayados, mediante diversas técnicas de microscopía, analíticas y de biología molecular. El desarrollo de técnicas moleculares permitió el estudio de comunidades microbianas. La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es comúnmente usada para identificar genéticamente la composición, diversidad y dinámica de una comunidad microbiana (43).

Los resultados mostraron correlación entre las morfologías de ataque de los sustratos, la estructura 3-D de las biopelículas y el perfil genético de las comunidades establecidas.

Las diferentes técnicas aplicadas proveyeron visiones complementarias del crecimiento de biopelículas sobre los distintos sustratos.

Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas.

Si bien lo ideal sería poder prevenir la formación de biopelículas sobre los sustratos, aún no se conoce una técnica que impida o controle satisfactoriamente este proceso, sin causar efectos indeseables.

Una de las principales estrategias es la limpieza y desinfección periódica antes de que los microorganismos puedan fijarse definitivamente a un sustrato. Hay sensores capaces de detectar tempranamente la presencia de una biopelícula y de estimar cuándo desinfectar y cuánto desinfectante adicionar para proteger una superficie.

Es muy importante tener en cuenta el acabado de la superficie, ya que defectos y rugosidades no sólo favorecen la formación de biopelículas sino que dificultan su limpieza y eliminación (2, 44).

El intento de inhibir la formación de biopelículas mediante la limitación de la fuente de C, ha resultado inadecuado, ya que se ha detectado la presencia de biopelículas hasta en sistemas con agua ultra pura.

La primera oportunidad de afectar el desarrollo de una biopelícula es sobre el sustrato. Modificar el sustrato o su capacidad de adherencia no-específica es un atractivo y simple enfoque para impedir la iniciación de una biopelícula en condiciones controladas. Sin embargo, cuando la diversidad de los microorganismos relevantes aumenta, la posibilidad de limitar el crecimiento de la biopelícula disminuye. Como la alteración de la composición de la película condicionante puede afectar la adherencia de microorganismos específicos, modificar el sustrato para inhibir la adsorción de ciertas clases específicas de moléculas es otra forma de controlar la adhesión. Alternativamente, una sustancia puede ser aplicada para aumentar la adherencia de un organismo en particular, reduciendo por lo tanto la eficiencia de adhesión de un microorganismo indeseable (2). Estos simples enfoques no funcionan en situaciones naturales complejas (como en corrosión marina), pero pueden resultar exitosos en condiciones más controladas a las cuales están expuestas catéteres y prótesis médicas.

Intentos por combatir los estadios iniciales de formación de la biopelícula se podrían realizar sabiendo que la adherencia resulta de la interacción entre la química de la célula y la del sustrato, y que la interacción puede ser modificada por una delgada película orgánica (película condicionante). Eventos de reconocimiento célula-célula que influyen la formación de biopelículas con especies mixtas ofrecen una oportunidad de intervenir en la composición de comunidad, y una mayor comprensión de cómo interactúan metabólicamente los microorganismos dentro de la biopelícula resultará en una estrategia de intervención basada en la fisiología de la comunidad.

Otra manera es incorporar productos antimicrobianos a las superficies mediante la aplicación de recubrimientos antimicrobianos o cambiando las propiedades físico-químicas de la superficie. Está demostrado que el agregado de amonio cuaternario, plata, y una amplia variedad de surfactantes modifica la capacidad de adhesión de las células disminuyendo la formación de biopelículas.

También son utilizados, los denominados “químicos verdes” (44), entre los que se encuentran enzimas, fagos, metabolitos. Dada la heterogeneidad del material presente, suele ser necesario adicionar una mezcla de enzimas para lograr la degradación de una biopelícula. Además se ha encontrado un efecto sinérgico cuando se aplican enzimas proteolíticas y glucolíticas junto con ondas ultrasónicas, así como también en combinación con detergentes, surfactantes y antimicrobianos fenólicos. Lamentablemente estas técnicas aún no son tan usadas debido a su elevado costo respecto de otros químicos convencionales. Los fagos son virus que infectan bacterias y proporcionan una natural, altamente específica y no tóxica manera de controlar varios microorganismos involucrados en la formación de biopelículas. La actividad infecciosa de los fagos es altamente influenciada por la composición química de la biopelícula, de factores ambientales como la temperatura, su concentración y fase de crecimiento. Si el fago posee enzimas degradadoras de polisacáridos y/o logra la lisis de una considerable cantidad de células, la integridad de la biopelícula es rápidamente reducida. La tercera de estas “estrategias verdes” es la producción -por parte otras especies bacterianas- de algún metabolito que interfiera en el desarrollo y formación de la biopelícula. Muchas bacterias son capaces de sintetizar y excretar biosurfactantes con propiedades anti-adherentes. Cepas específicas de *E.coli* liberan al ambiente polisacáridos capaces de inducir alteraciones físico-químicas de la superficie previniendo la formación de biopelículas de una amplia variedad de bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas. También se ha demostrado que la producción de sideróforos por algunas bacterias puede ejercer biocontrol al actuar como agentes quelantes de hierro.

Como se mencionó al principio de este capítulo las bacterias usan para comunicarse entre sí un sistema de señales químicas denominado “*quorum sensing*” que les confiere la capacidad de formar biopelículas. Una mejor identificación de estos procesos, así como de los productos que actúan como señales célula-célula, permitiría desarrollar una nueva y más eficiente forma de control de las biopelículas mediante la identificación de productos que pudieran actuar como antagonistas del *quorum sensing* para la formación de biopelículas.

Para llevar adelante un efectivo control de biopelículas es fundamental comprender el tipo y la naturaleza de los residuos contaminantes (hidratos de carbono, grasas, proteínas, sales minerales) y de los microorganismos que

hay que desprender de las superficies. Además, la selección de detergentes y desinfectantes debe hacerse en base a su efectividad, seguridad y facilidad de eliminación, en especial en función de la naturaleza corrosiva de los posteriores tratamientos químicos y los efectos sensoriales en los productos finales ^(45,46). La mejor remoción de residuos en los enjuagues previos contribuye en los posteriores esfuerzos al reducir la cantidad de productos de limpieza usados. El diseño de los equipos y la elección de los materiales superficiales son importantes para prevenir la formación de biopelículas.

El material más conveniente para el equipamiento de procesos es el acero inoxidable, el cual debe tener una adecuada terminación superficial, pulidos, cepillado, "lapping" y pulido electrolítico o mecánico. Un requisito previo para un eficiente programa sanitario es que el diseño de los equipos se haya sido realizado teniendo en mente elevados estándares de higiene. Espacios muertos, esquinas, grietas, juntas, empaquetaduras, válvulas y juntas son puntos especialmente vulnerables a la acumulación de biopelículas ⁽⁴⁷⁾.

La fabricación de productos para consumo doméstico/cosméticos, a diferencia de los sistemas de enfriamiento de agua y de elaboración de papel -que son principalmente procesos continuos con un relativamente elevado nivel de consumo de agua-, se basa en procesos en bateas estancas sin recirculación de agua ⁽⁴⁸⁾. La elaboración de este tipo de productos consiste esencialmente en la mezcla de ingredientes químicos con variables contenidos de agua, almacenamiento y envasado del producto final. El principal problema de estos productos es su potencial contaminación con agua en la que los bactericidas o fungicidas hayan resultado en una deficiente prevención debido al desarrollo de resistencia a los preservantes comúnmente utilizados, adicionados al producto final. Se ha demostrado que microorganismos que forman biopelículas se pueden localizar en diferentes sitios dentro de la planta productora, generalmente dentro de cañerías, en zonas estancas y en tanques de almacenamiento resultando ser los causantes de contaminación microbiana. Las cañerías son consideradas las mayores fuentes de problemas en una planta. No es posible abrirlas para observarlas por dentro, y la cantidad de contaminantes de las cañerías es generalmente significativa. Una vez contaminada, es la parte más difícil de limpiar y de mantener libre de infección.

No hay prácticamente referencias en la literatura técnica disponible sobre biopelículas en los procesos de manufactura. El mayor énfasis en el control de biopelículas en esta aplicación es evitar la contaminación mediante el mantenimiento de la limpieza y la higiene en la planta. Se recomienda el continuo monitoreo del estado de la higiene de la planta, incluyendo la inspección visual y el muestreo periódico para efectuar conteos bacterianos. Los niveles específicos aceptables de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml varía entre empresas y entre plantas, pero 10^3 UFC/ml es considerado un número generalmente correspondiente a una relativa limpieza de la planta.

El agua purificada es la más empleada materia prima en la industria farmacéutica. El deterioro de la calidad microbiológica del agua puede afectar la calidad y seguridad de los productos ⁽⁴⁴⁾. Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales o pueden adherirse a las superficies, donde crecen en comunidades altamente organizadas de biopelículas multicelulares. Las biopelículas son la forma predominante de vida microbiana en la naturaleza, así como en enfermedades crónicas persistentes. Las infecciones por biopelículas en prótesis o en implantes son difíciles de erradicar porque encuentran muy superior protección contra macrófagos y antibióticos, comparada con células aisladas, conduciendo a severas complicaciones clínicas generalmente con riesgos de vida.

En sistemas acuosos las biopelículas actúan como reservorios de microorganismos- incluidos los patógenos que pudieran estar presentes en el agua- que al liberarse esporádicamente, causan gran incremento de la densidad celular. Los factores biológicos, químicos y físicos que provocan el desprendimiento son complejos y no completamente comprendidos. Son probablemente múltiples los factores asociados a los procesos de adhesión y desprendimiento, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, esfuerzos de corte, control ambiental de la biosíntesis de exopolisacáridos, y procesos erosivos en los cuales células individuales se pierden del cluster de biopelículas, etc ⁽⁴⁹⁾.

Recientemente se han reportado cambios en la estructura de biopelículas durante su crecimiento que afectan fuertemente el proceso de desprendimiento, siendo responsables del deterioro de la calidad del agua.

Se sabe que las células en las biopelículas desarrollan creciente resistencia a agentes antimicrobianos y a factores ambientales, causando contaminación microbiana del agua en instalaciones industriales. La mayoría de los estudios consideran desinfección de agua potable pero pocos se ocupan del agua purificada a temperatura ambiente. Biopelículas presentes en sistemas de almacenamiento y distribución de agua purificada son difíciles

de detectar, inactivar y eliminar.

Estudios realizados por Florjanic y Krist (2006) ⁽⁵⁰⁾ reportan el impacto de dos regímenes para la desinfección de un sistema de agua purificada con ozono en función de la concentración y el tiempo 70 ± 20 ppb en el reservorio en uno de los regímenes de producción y 250 ± 20 ppb en el sistema total, durante desinfecciones semanales. Se medían los conteos heterotróficos en placa (HPCs) y la concentración total de compuestos orgánicos (TOC). Sobre un periodo de cuatro años, 94-98% de las muestras de agua exhibían HPC entre 0-5 UFC/ ml, y ninguna ≥ 50 UFC/ml. A pesar del aumento del TOC al ingreso del agua hasta 40 ppb, el conteo microbiano del agua purificada en el circuito de distribución resultó inafectado. Se destacó que los aspectos críticos frente a la contaminación microbiana del sistema de agua purificada fueron las válvulas y tuberías usadas para transferir agua a los equipos. Los niveles especificados de ozono previenen el crecimiento de microbios y la formación de biopelículas en el sistema de distribución hasta una medida en que pueden poner en riesgo la calidad del agua y aún esporádicamente liberar microbios al agua.

La actual comprensión de la fisiología y microecología son resultado de estudios *in vitro* en los que se usan modelos de biopelículas. Tales modelos se pueden utilizar para replicar condiciones de laboratorio o enfocar el efecto de diversas variables, como el impacto de la hidrodinámica, concentración de nutrientes y antimicrobianos en el crecimiento de biopelículas.

Consecuentemente, el enfoque para diseñar un sistema y sus características operacionales debe ser desarrollado para cada caso en particular. Un relativamente nuevo método de laboratorio para investigar biopelículas en agua potable es el reactor anular de biopelículas, (BAR). No hay aún estudios publicados sobre bioestabilidad de agua purificada empleando este dispositivo.

La biología de biopelículas es un joven campo que requiere de muy básicas y extremadamente cruzadas disciplinas y a veces investigaciones esotéricas. Sin embargo, esa investigación sentará las bases de la verdadera comprensión de complejos problemas tales como la corrosión influenciada por microorganismos y enfermedades orales y contribuirá grandemente a nuestra comprensión de los más significativos estilos de vida en la tierra.

Bibliografía

1. Dexter S.C. ASM Handbook. *Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection*, Vol.13, A, p. 398-416, 2003.
2. Palmer R.J. Jr. and White D.C. *Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control*. Trends in Microbiology, Vol. 5, (11), p. 435-440, 1997.
3. Monds, R.D., O'Toole, G.A. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. Trends in Microbiology Vol. 17, p. 73-87, 2009.
4. *Metals handbook* vol. 13, p. 492, 1987.
5. Jenkinson, H.F and Lappin-Scott, H.M. *Biofilms adhere to stay*. Trends in Microbiology, Vol. 9, (1), p. 9-10, 2001.
6. Branda S.S., Vik A., Friedman L. and Kolter R. *Biofilms: the matrix revisited*. Trends in Microbiology Vol.13 (1), p. 20-26, 2005.
7. Shirliff M.E, Mader J.T. and Camper A.K. *Molecular Interactions in Biofilms*. Chemistry & Biology, Vol. 9, p. 859-871, 2002.
8. Karen, O. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. Res. Microbiol. Vol. 159, p. 415-422 , 2008.
9. Beech I.B., Sunner J.A. and Hiraoka K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. International Microbiology, Vol.8, p.157-168, 2005.
10. Parsek M.R. and Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in Microbiology, Vol.13, (1), p.27-33, 2005.

11. Blackwell H. E. Bacterial Crowd. *Control with Iron*. Chemistry & Biology, Vol. 12, (7), p. 721-723, 2005.
12. Atlas R.M y Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. Capítulo 3, p. 59-92. Pearson Educación S.A. Madrid, España, 2002.
13. <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter002/section006/blue/page001.html>. Permiso de la imagen para la página web: P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman.
14. Berry D., Xi Ch. and Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Environmental biotechnology*, Vol 17, p. 297–302, 2006.
15. Dukan S., Levi Y., Piriou P., Guyon F. and Villon P. Dynamic modelling of bacterial growth in drinking water networks. *Water Research*, Vol. 30, (9), p. 1991-2002, 1996.
16. Lehtola M.J., Laxander M., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Research*, Vol. 40, p. 2151-2160, 2006.
17. Nagjub A. and Mansfeld F. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition using electrochemical noise analysis. *Corrosion Science*, Vol.43, p. 2001-2009, 2001.
18. Rosales B.M., Cabezas A.C., Chichizola S.E and Fernández A. MIC corrosion of babbitt alloys. 3rd. Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium, Florianópolis, Brazil, 1998.
19. Rosales B.M. Electrochemical, metallurgical and biochemical aspects of the microbially influenced corrosion. 5th. LABS Campeche, México, 2004.
20. Goupil, D.W., De Palma, V.A. and Baier, R.E., Physical/Chemical characteristics of the macromolecular conditioning film in biological fouling, V International Congress of Marine Corrosion and Fouling, Marine Biology, p.401-410, Barcelona, 1980.
21. A microscopic view of corrosion. Center for Interfacial Microbial Process Engineering News, Montana State University, Bozeman, p. 1-6, Spring, 1992.
22. Gamby J., Pailleret A., Boucher C.C., Pradier C.M., Tribollet B. In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods. *Electrochimica Acta*, 54, p.66–73, 2008.
23. Beech, I.B. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms - an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* PII 0964-8305, p.141-149, 1996.
24. Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K. and Holden, P.A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 68 (3) p.577–587, 2007.
25. Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R. and Scheetz, R. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal Ind Microbiol* 8 (4) p. 213–221, 1991.
26. Walker, J.T., Verran, J., Boyd, R.D., and Percival, S. Microscopy methods to investigate structure of potable water biofilms. *Methods Enzymology*. 337, p. 243–255, 2001.
27. Stewart P.S., Murga R., Srinivasani R. and de Beer D. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research* 29, (8), p. 2006-2009, 1995.
28. Wagner, M., Ivlevab N.P., Haischb C., Niessnerb R. and Horna H. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Research* 43 (1) p. 63–76, 2009.
29. Lewandowski Z. Notes on biofilm porosity. *Water Research* 34 (9) p. 2620-2624, 2000.
30. Pitts, B. and Stewart, P. Confocal laser microscopy on biofilm: Successes and limitations. *Microscopy today*, p. 18-22, 2008.
31. Bremmer. P. J. Geesey, G. G. and Drake, B. Atomic force microscopy examination of the topography of a

- hydrated bacterial biofilm on a copper surface. *Current in Microbiology*, 24, p. 223-230, 1992.
32. Steele A., Goddard D.T. and Beech I.B. An atomic force microscopy study of the biodeterioration of stainless steel in the presence of bacterial biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 34 (1), p. 35-46, 1994.
 33. Saa A., Teschke O. Extracellular polymeric bacterial coverages as minimal area surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 304, p. 554–557, 2006.
 34. van der Aa B.C., Dufrene Y.F. In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, p.173–182, 2002.
 35. Núñez M.E., Martín M.O., Chan P.H., Spain E.M. Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42, p. 263–271, 2005.
 36. Núñez M.E., Martín M.O., Chan P.H., Duong L.K., Sindhurakar A.R. and Spain E.M. Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities. *Methods in Enzimology*. Vol.397, p. 256-268, 2005.
 37. Biofilm heterogeneity. Finding the link between structure and function. Center for Biofilm Engineering News, Montana State University, Bozeman, Vol.2, N° 1, Sept. 1994.
 38. Rosales, B.M. *Environmental change and rational water use*, Ed. O.E. Scarpati and J.A.A. Jones, Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, ISBN 978-987-9260-46-3, 2007.
 39. Rastelli S.E., Rosales B.M, Elsner C.I and Pujol E.M. Microbial biofilm interactions with drinking water network materials. 7th. Latinamerican Biodegradation and Biodeterioration Symposium (LABS), Quito, Ecuador, Plenary Lecture. 2009.
 40. Masud Karim M.D. Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Water Research*. Vol. 34, No. 1, p. 304-310, 2000.
 41. Katsoyiannis Ioannis A. and Zouboulis Anastasios I. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Water Research* Vol. 38 p. 17–26, 2004.
 42. Rastelli, S.E., Viera, M. and Rosales,B.M. Microscopy Applied to Biofilms in Drinking Water Closed Loop. 18th. International Corrosion Congress, Perth, Australia, Paper 198, 2011.
 43. Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 2 (3) p.317-322, 1999.
 44. Simões M., Simões L.C. and Vieira M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* Vol. 43, p. 573–583, 2010.
 45. Mosteller, T. M., & Bishop, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, p.34–41, 1993.
 46. Wirtanen, G., Saarela, M., & Mattila-Sandholm, T. Biofilms – impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), *Biofilms II: Process analysis and applications*, p. 327–372, 2000.
 47. Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 39, p.11–19, 2006.
 48. Ludensky M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 51, p. 255 – 263, 2003.
 49. Florjanić M., Kristl J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 405, p. 16–22, 2011.
 50. Florjanić, M., Krist, J. Microbiological quality assurance of purified water by ozonization of storage and distribution system. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* Vol. 32, p. 1113–1121, 2006.