

01475

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Estudio del papel de la proteína RpoS en la
formación de biofilms en *Escherichia coli*.

T E S I S
QUE PRESENTA EL ALUMNO
FLAVIA PAOLA CORONA IZQUIERDO
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TUTOR: DR. JORGE MEMBRILLO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F. CIUDAD UNIVERSITARIA

2002





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

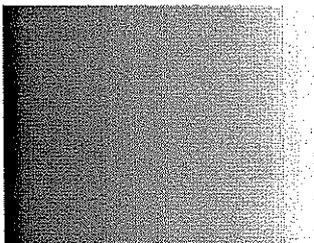


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dedicada a la Investigación
Odontológica y a todos los
Odontólogos que creen y se
forman en la investigación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	9
I. I. Biología Bucal	9
I. I. I. Microorganismos presentes	10
I. I. II. Enfermedades	11
I. I. III. Biofilms bacterianos en la cavidad bucal.....	12
I. II. Biofilms	14
I. II. I. Importancia de los biofilms	14
I. II. II. Estructura de los biofilms.....	17
I. II. II. I. Fisiología de los biofilms	18
I. II. III. Factores físicos que afectan la formación de biofilms.....	22
I. II. IV. El pH en el biofilm	23
I. II. V. El O ₂ en el biofilm	24
I. II. VI. Factores genéticos	24
I. II. VI. I. El regulador global <i>rpoS</i>	25
I. II. VII. Disgregación de biofilms	27
I. II. VIII. Intercambio genético en biofilms.....	28
I. III. Comunicación celular	29
I. III. I. Mecanismos moleculares de quórum sensing	31
I. III. I. I. Sistema de bioluminiscencia de <i>Vibrio fischeri</i> LuxI/LuxR	32
I. III. I. II. Sistema de comunicación celular en bacterias gram-positivas.....	34
I. III. I. III. Sistema de bioluminiscencia de <i>Vibrio harveyi</i>	35
I. IV. <i>Escherichia coli</i> como modelo de estudio para la formación de biofilms	37
I. V. Propósito de ésta tesis	39
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	40
II. I. Técnicas bacteriológicas	40
II. I. I. Cepas bacterianas.....	40
II. I. II. Medio y Condiciones de crecimiento.....	40
II. I. II. I. Selección por antibióticos.....	41
II. I. II. II. Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos.....	42
II. I. II. III. Condiciones de crecimiento	42
II. II. Técnicas bioquímicas.....	42
II. II. I. Purificación de sobrenadantes	42
II. II. II. Determinación de concentración de proteína.....	43
II. II. III. Medición de actividad de β -galactosidasa	44
II. II. IV. Técnicas espectrofotométricas	46
II. III. Manipulación y análisis de proteínas.....	46
II. III. I. Preparación de las células para cuantificación de proteínas	46
II. III. II. Análisis de proteínas (gel de proteínas).....	46
II. III. III. Marcado de proteínas con metionina	48
II. IV. Ensayo de formación de biofilm	49
II. IV. I. Formación de biofilm.....	49
II. IV. II. Tinción y cuantificación del biofilm.....	49

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

II. V. Manipulación y análisis de DNA	49
II. V. I. Purificación de DNA cromosomal	49
II. V. II. Purificación de plásmidos de DNA	51
II. V. III. Modificaciones enzimáticas del DNA	53
II. V. III. I. Digestión con endonucleasas de restricción	53
II. V. III. II. Electroforesis con geles de azarosa	53
II. V. IV. Análisis de DNA por hibridización tipo Southern	54
II. V. IV. I. Procesamiento del gel de agarosa	54
II. V. IV. II. Transferencia del DNA por capilaridad	55
II. V. IV. III. Fijación del DNA a la membrana	56
II. V. IV. IV. Marcado de la sonda	56
II. V. IV. V. Hibridización	56
II. V. IV. VI. Lavado de membrana	57
II. V. IV. VII. Generación y detección de señal luminosa	58
II. VI. Técnicas genéticas	59
II. VI. I. Técnica de transducción por P ₁ vir	59
II. VI. II. Preparación de lisados	59
II. VI. II. I. Transducción por P ₁ vir	59
II. VII. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	60
II. VII. I. Síntesis de primers de oligo-nucleótidos	60
II. VII. II. Amplificación del DNA	61
II. VII. III. Purificación del PCR	61
CAPÍTULO III Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J. (2002)	
Biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> is affected by 3-(N-Morpholino) propane sulfonate (MOPS). <i>Research in Microbiology</i> 153 , 181-185.	63
CAPÍTULO IV Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J. (2002)	
A mutation in <i>rpoS</i> enhances biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> during exponential phase of growth. <i>FEMS Microbiology letters</i> 211 , 105-110.	69
CAPÍTULO V RESULTADOS ADICIONALES	76
V. I. La formación de biofilm es aparentemente dependiente de la presencia de oxígeno	76
V. II. La formación de biofilm es mayor en presencia de pH ácido	77
V. III Diferencias en los patrones protéicos de la cepa silvestre y la mutante <i>rpoS</i>	80
CAPÍTULO VI AMPLIACIÓN DE LA DISCUSIÓN	82
BIBLIOGRAFÍA	85
AGRADECIMIENTOS	92



ÍNDICE TABLAS

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	9
Tabla I. I. Resumen de los factores que influyen la formación de biofilms en diferentes fases.....	22
Tabla I. II. Ejemplos de sensores de quórum de acil HSL.....	32
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	40
Tabla II. I. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en ésta tesis.....	41
Tabla II. II. Concentración de antibióticos usados en los medios de cultivo	42
Tabla II. III. Secuencia de oligo-nucleótidos usados en éste trabajo.....	61
CAPÍTULO IV Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J. (2002) A mutation in <i>rpoS</i> enhances biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> during exponential phase of growth. <i>FEMS Microbiology letters</i> 211 , 105-110.	69
Table 1 Strains used in this study.....	72
CAPÍTULO V RESULTADOS ADICIONALES	76
Tabla V. I. Formación de biofilm en tres diferentes medios de cultivo	78
Tabla V. II. Formación de biofilm a diferentes pHs.....	79

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE FIGURAS

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	9
Figura I. I. Modelo del desarrollo del biofilm	19
Figura I. II. Esquema de la señalización por comunicación celular en <i>Vibrio fischeri</i>	33
Figura I. III. Esquema de la señalización por comunicación celular en bacterias gram positivas	35
Figura I. IV. Esquema de la señalización por comunicación celular en <i>Vibrio harveyi</i>	36
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	40
Figura II. I. Diagrama del protocolo de purificación de PCR.....	62
CAPÍTULO III Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J. (2002) Biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> is affected by 3-(N-Morpholino) propane sulfonate (MOPS). <i>Research in Microbiology</i> 153 , 181-185.	63
Figure 1 Effect of 100mM MOPS on the formation of biofilm in <i>Escherichia coli</i>	65
Figure 2 Biofilm formation of cells subcultured into fresh media with or without MOPS.....	66
Figure 3 Effect of the supernatants of cells grown in LB-MOPS on the biofilm formation by cells grown previously in LB.....	67
Figure 4 Effect of added MOPS on biofilm formation of cells growing in LB medium.....	67
CAPÍTULO IV Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J. (2002) A mutation in <i>rpoS</i> enhances biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> during exponential phase of growth. <i>FEMS Microbiology letters</i> 211 , 105-110.	69
Figure 1 Construction of <i>rpoS::Tn10</i> mutants and biofilm formation by strains MC4100 and JMH00039 (<i>rpoS::Tn10</i>) after 48 h of incubation in LB medium	72
Figure 2 Bacterial growth, biofilm formation and β – galactosidase activity of a Φ (<i>rpoS-lacZ</i>) fusion in strain MC4100	73
Figure 3 Biofilm formation of strains MC4100 and JMH0039 growing under different culture conditions	74
CAPÍTULO V RESULTADOS ADICIONALES	76
Figura V. I. Formación de biofilm en la interfase con el oxígeno	76
Figura V. II. Formación de biofilm en presencia y ausencia de oxígeno	77
Figura V. III. Gráfica de formación de biofilms a diferentes pHs en la cepa silvestre y mutante en <i>rpoS</i>	80
Figura V. IV. Formación de proteína en cepa silvestre y mutante <i>rpoS</i> en fase estacionaria.....	81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Los "biofilms" se han descrito como la adherencia de una comunidad bacteriana a una superficie, éste fenómeno esta regulado por múltiples factores físicos, químicos y biológicos. Los biofilms son de gran importancia debido a la implicación médica y odontológica, como en el caso de la endocarditis bacteriana o la placa dental bacteriana. Los biofilms se llegan a desarrollar como ciudades microbianas donde la cooperación entre diferentes especies es una de sus características principales. La regulación genética de la formación de los biofilms, es muy diversa, actuando para tal fin genes encargados de la síntesis de flagelina, del metabolismo de carbohidratos, así como el regulador general de estrés *rpoS* entre otros. *rpoS* es un gen que regula más de 40 genes diferentes y se encuentra expresado principalmente en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano. Para la formación de biofilm utilizamos la técnica de O'Toole y Kolter, la cual consiste en cultivar las células en placas de microtitulación de PVC y en la tinción con cristal violeta al 0.1%. En éste trabajo se utilizaron cepas de *Escherichia coli* silvestres y mutantes deficientes en el gen *rpoS* y se demostró que la formación de biofilm en *E. coli* es mayor en la cepa mutante durante la fase exponencial de crecimiento y que si el biofilm se desarrolla en medio de cultivo con 100mM MOPS [3-(N- morfolino) propano sulfonato] se desarrolla un biofilm mayor.

Palabras clave: biofilm, fase estacionaria, RpoS, MOPS, *Escherichia coli*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Bacterial communities attached to a surface are commonly known as biofilms. The formation and detachment processes of a biofilm are affected by several physical and chemical factors. The importance of biofilms has been recognized just recently. Development of these sessile communities is important in medicine and industrial settings. A good example is de bacterial endocarditis of dental plaque. The microbial life inside a biofilm resembles the life of a city where every member has a specific function and cooperation is required for full development. Recent discoveries have given light on the genetic determinants of biofilm formation, mutations in genes involved in the synthesis of flagellin and pili render the cells unable to form biofilms. RpoS is a global regulator that affects the transcription of more than 40 genes mainly at the onset of stationary phase of growth. Recent reports have suggested that RpoS may have a regulatory role during exponential phase and that RpoS-regulated genes are involved in the responses to a wide variety of cellular stresses. To study biofilms, O'Toole and Kolter have developed a simple assay to determine and quantify the biofilm formation using crystal violet to stain PVC microtiter dishes where a culture has been set up. In this work we report on the studies of biofilm formation using an *rpoS* mutant to analyze the role this regulatory protein might have in biofilm formation. We observed that a mutation in *rpoS* causes an increase in biofilm formed in comparison to that of the wild type. In addition we report that the use of 100mM MOPS [3-(N-morpholine) propane sulfonate] increases biofilm formation.

Keywords: biofilm, stationary phase, RpoS, MOPS, *Escherichia coli*

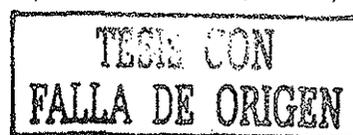
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

I. I. Biología bucal

La cavidad bucal, es un hábitat complejo donde se agrupan e interaccionan una gran cantidad de elementos bióticos y abióticos, éste tipo de relaciones son estudiadas por la Ecología, término introducido en 1869 por Ernest Haeckel para definir a "...la parte de la Biología que estudia las relaciones entre los organismos y el medio en que viven...". Sabemos que para poder sobrevivir, todas las especies necesitan adaptarse al medio ambiente con la finalidad de atender sus necesidades básicas de energía, nutrición, defensa y reproducción; en nuestro caso particular, entenderemos ecología bucal como el estudio de las interacciones entre los microorganismos y el medio bucal (González *et al.*, 1993).

La cavidad bucal contiene una de las poblaciones microbianas más variadas y concentradas de todo el cuerpo humano (Xie *et al.*, 2000), se considera que la adquisición de la flora microbiana bucal pionera inicia en el paso por el canal vaginal al momento del nacimiento, siendo que a las pocas horas de nacimiento o inmediatamente ya se encuentran microorganismos como: estreptococos del grupo viridans, estafilococos, neumococos, coliformes, lactobacilos, neisserias y *Candida albicans*, entre otros. Las modificaciones en la microflora bucal, se llevan a cabo cuando ocurren los cambios propios de las estructuras bucales, es decir, ésta microflora se modifica primordialmente a partir de la erupción dental y de los cambios en la dieta (Murray *et al.*, 1995; González *et al.*, 1993; Perrone *et al.*, 1997).



I. I. I. Microorganismos presentes.

La colonización y presencia de diversas especies microbianas es muy diversa, debido a esto, es importante mencionar los microorganismos presentes en cada hábitat de la cavidad bucal:

- ☞ Microbiota del surco gingival. En los tejidos periodontales sanos la flora microbiana está localizada casi siempre supragingivalmente, predominan los microorganismos gram-positivos: *Streptococcus viridans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, y entre los gram-negativos: *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium fusiformis*, espiroquetas y ocasionalmente los géneros *Neisseria* y *Veillonella*, la mayoría de éstos microorganismos son anaeróbicos o facultativos.

- ☞ Microbiota de la lengua. El mayor porcentaje de las bacterias en lengua, corresponde a estreptococos facultativos entre los que se encuentran *Streptococcus salivarius*, con cocos anaeróbicos gramnegativos: *Veillonella alcalescens* y *Bacteroides parvula*; bastones facultativos gram-positivos differoides y anaeróbicos como: *Fusobacterium*, *Bacteroides melaninogenicus* y *Campylobacter sputorum* (González et al., 1993).

- ☞ Microbiota de la placa dental. Se encuentran principalmente bacterias como estreptococos del grupo mutans, lactobacilos, *Bacteroides melaninogénicos*, y *Veillonella* entre otros. En la placa dental incluimos la microbiota de la caries

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dental, la cual además de las bacterias ya mencionadas, también puede presentar *Actinomyces* sp., *Propionibacterium* sp., *Eubacterium* sp. y *Capnocytophaga gingivalis*, los cuales se encuentran asociados a caries aunque en menor escala que el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp. (Perrone *et al.*, 1997).

I. I. II. Enfermedades

Las enfermedades más comunes por la presencia de estos microorganismos en boca son la caries, y la enfermedad periodontal, aunque también se encuentran estos microorganismos involucrados en otras enfermedades de ámbito sistémico muy importantes, como la endocarditis bacteriana (Darveau *et al.*, 1997).

La microbiología de la caries dental es variada dependiendo de la localización de la caries o inclusive del curso clínico de ésta.

- ☞ Caries de Esmalte. En el inicio de la lesión cariosa los Estreptococos del grupo *mutans* se encuentran presentes provocando la desmineralización temprana, mientras que los *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus* sp. comienzan a hacerse presentes en las etapas tardías de la lesión.

- ☞ Caries de Dentina. En ésta entidad patológica, se encuentran presentes muchas bacterias anaerobias estrictas, las cuales pertenecen a los géneros *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, aparecen con menor frecuencias los Estreptococos.



☞ Caries Radicular. En éste tipo de caries se agregan nuevos géneros como: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichis* y *Capnocytophaga* (Schupbach *et al.*, 1995).

I. I. III. Biofilms bacterianos en la cavidad bucal

La forma natural de vida bacteriana no es de forma aislada, sino en asociación formando comunidades, las cuales se adhieren a superficies formando una biocapa, conocida también como biofilm (Watnick *et al.*, 2000). La cavidad bucal no es la excepción, siendo así la placa dental bacteriana una compleja biocapa que comprende cientos de especies microbianas organizadas en comunidades en ambientes orales fluctuantes.

La formación de placa dental en la cavidad bucal, se desarrolla en las superficies rígidas o mucosas orales y es un componente integral de la salud o la enfermedad de ésta (Burne *et al.*, 1997). El estilo de vida, en forma de biocapas, que poseen la mayoría de las bacterias bucales, permite una sobrevivencia y adaptación al ecosistema presentándose cambios genéticos, (Li Y-H *et al.*, 2000) y la optimización de recursos -para la obtención de energía- a partir de un metabolismo celular lento (Marsh *et al.*, 1997).

La forma más generalizada para estudiar las comunidades bacterianas bucales asociadas al periodonto es a partir de sondas de DNA, clasificando a las

bacterias en cinco diferentes grupos (por colores) asociado con las propiedades clínicas de la enfermedad periodontal en relación con la presencia de la bacteria. Los grupos descritos son:

- ☞ Rojo. Comprende a las siguientes bacterias implicadas en la periodontitis juvenil *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*.

- ☞ Naranja. Comprende a: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum* implicadas en la periodontitis del adulto.

- ☞ Púrpura. *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus* que principalmente se encuentran en caries radicales y no implican una lesión periodontal.

- ☞ Amarillo. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis* relacionados con la caries dental y no con la enfermedad periodontal.

- ☞ Verde. Contiene tres especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo A, involucrados en la periodontitis juvenil y relacionados junto a otras bacterias con la gingivitis necrozante aguda (GUNA) (Kolenbrander 2000).

I. II. Biofilms

Para los fines de éste trabajo, se entenderá como biofilm a una comunidad bacteriana adherida a una superficie, espacial y temporalmente heterogénea que puede presentar mecanismos específicos para la adherencia a un área determinada (Wimpenny *et al.*, 2000). En una biocapa, la producción de exopolisacáridos facilita las interacciones en la comunidad bacteriana y determina la forma tridimensional de un biofilm (Danese *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que estructuras superficiales como el pili tipo IV (Pratt *et al.*, 1998) y el flagelo (O'Toole *et al.*, 1998), son necesarios para los pasos iniciales en la formación de biofilms y que existen mecanismos que determinan el desarrollo y maduración de biofilms como son las señales moleculares bacterianas (Davies *et al.*, 1998).

I. II. I. Importancia de los biofilms

El estudio de éste tipo ecológico de sociedades microbianas es de especial importancia debido a sus implicaciones como problema de salud y en la industria. Se sabe que algunas bacterias que forman biofilms son inherentemente resistentes a los agentes antimicrobianos por encontrarse menos expuestas siendo por ende más resistentes a la terapéutica (Costerton *et al.*, 1999). También se sabe que se desarrollan comunidades infecciosas latentes, en cualquier momento pueden desencadenar una infección a partir del biofilm, siendo una causa común de infecciones persistentes (Stewart *et al.*, 2001).

La repercusión e importancia médica de la formación de biofilms es evidente debido a que los biofilms se encuentran desde la expresión más leve hasta la más

grave. La placa dental bacteriana –biofilm bucal– puede desencadenar desde una gingivitis incipiente hasta una periodontitis generalizada con la subsecuente pérdida de todos los dientes. Dentro de éstos ejemplos podemos mencionar también a las placas de *Candida albicans* formadas dentro de las prótesis totales bucales y que favorecen la formación de un tejido bucal frágil y resiliente. En el aspecto médico podemos mencionar un sin número de entidades patológicas formadas a causa de biofilms formados no solamente sobre catéteres médicos, sino sobre las mismas estructuras corporales a consecuencia de una lesión como en el caso de la endocarditis bacteriana. La disgregación de células o de los agregados celulares, la producción de endotoxinas, el aumento de la resistencia al sistema inmune del hospedero, la provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes son procesos del biofilm que pueden inicial un proceso de enfermedad (Donlan *et al.*, 2002). La formación de biofilms en implantes o en tejidos dañados, es una causa de infecciones persistentes (Khatib *et al.*, 1995) y debido a que se encuentran asociados con la naturaleza crónica de infecciones subsecuentes y con la resistencia a la quimioterapia por antibióticos. Muchas infecciones nosocomiales como las relacionadas con el uso de catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, válvulas cardiacas protésicas y algunos aparatos ortopédicos se encuentran asociados con los biofilms debido a la adherencia bacteriana en la superficie del biomaterial (Passerini *et al.*, 1992; Hyde *et al.*, 1998)

En cuanto a la resistencia a los antibióticos en el biofilm existen tres hipótesis, la primera es que se forma una barrera física en la que el agente antimicrobiano, penetra en el biofilm muy lentamente o no pueda penetrar, no ejerciendo su acción

en bacterias de este; esto fue demostrado por Anderl *et al.*, (2000), utilizando *Klebsiella pneumonia*, la cual es altamente sensible a la ampicilina. Cuando el crecimiento de *K. pneumonia* fue en suspensión o de forma libre (planctónica), ésta especie bacteriana mostró una alta susceptibilidad al agente antimicrobiano, sin embargo, cuando el crecimiento de la misma bacteria se realizó en forma de biofilm, 60% de las bacterias pudieron sobrevivir a un tratamiento con ampicilina.

La segunda hipótesis es que existe una alteración química del microambiente dentro del biofilm debido a los gradientes en las concentraciones de nutrientes, la cantidad de oxígeno en las profundidades del biofilm, o las diferencias de pH en el exterior y el interior del biofilm (de Beer *et al.*, 1994).

Una tercera hipótesis es que los biofilms se comportan en forma de resistencia única como un estado fenotípico, parecido a una diferenciación celular como la formación de esporas (Stewart *et al.*, 2001).

En la industria los biofilms son igualmente importantes ya que muchos de los problemas actuales son ocasionados por biofilms, así tenemos la acumulación bacteriana en los ductos petroleros, o en los rodillos de la fabricación del papel, o en los drenajes, todos éstos problemas que semejan a la arterosclerosis en las arterias, son generados por bacterias que viven en comunidades llamadas biofilms (Costerton *et al.*, 1999).

I. II. II. Estructura de los biofilms

Los biofilms pueden estar formados por bacterias u hongos o una combinación de ambos, éstos pueden llegar a desarrollarse desde una fina capa, hasta gruesos complejos de microorganismos y elementos metabólicos provenientes de éstos. Por lo regular, en la naturaleza se encuentran biofilms formados por múltiples especies microbianas, *in vitro*, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento, utilizan sólo un tipo bacteriano, y pocos estudian las interacciones inter-especies.

La estructura de un biofilm, puede ser afectada por propiedades de la superficie donde se desarrolla y de los elementos que pueden interactuar con ella, así como de la disponibilidad de nutrientes, la composición de la comunidad microbiana, y la hidrodinámica (Wimpenny *et al.*, 2000; Busscher *et al.*, 1997). Inclusive los biofilms y muy particularmente los de composición gruesa, pueden ser los que suministren a las células bacterianas un ambiente único para poder expresar completamente sus mecanismos de adaptabilidad y sobrevivencia (Li *et al.*, 2001).

La estructura del biofilm se ha estudiado con diversos métodos:

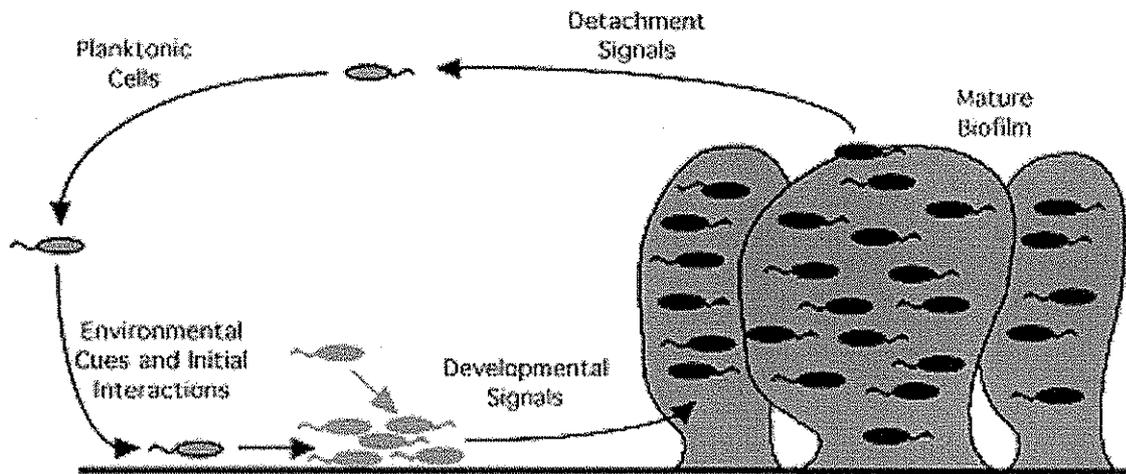
- ☞ El primero que es el tradicional, con una vista plana, homogénea, el cual se describe en investigaciones dentales con la técnica de Microscopía por transmisión de electrones al examinar muestras de placa dental (Nyvad *et al.*, 1997).

- ☞ El segundo fue descrito por Keevil *et al.*, (1992) utilizando microscopio de contraste diferencial de interferencia al examinar muestras en superficies dentro de los sistemas de distribución de agua. Llamado mosaico heterogéneo, consiste en una base de células de alrededor de 5µm de espesor adheridas al sustrato y sobre ellas unos elementos protozoarios adheridos en forma de columnas.

- ☞ El tercero es actualmente el icono del biofilm, conocido como modelo hongo o tulipán, la microscopía confocal por escaneo con láser, ha permitido observar éste tipo de estructuras en los biofilms formados, en los cuales la base se encuentra delgada y sostiene o retiene elementos más grandes en su extremo axial, a partir de éste modelo se han descrito canales por donde pasan nutrientes y permiten el paso de oxígeno a través de ellos (Wimpenny *et al.*, 2000).

I. II. II. I. Fisiología de los biofilms

El comportamiento bacteriano como biofilm es distinto del que poseen las bacterias bajo una vida libre (también se les conoce a las bacterias en vida libre como “planctónicas”) (Kolter *et al.*, 1999), ésta divergencia, forma parte de un proceso desarrollado durante la formación del biofilm el cual inicia con una comunicación celular, misma que modifica al microorganismo para permitirle adherirse a una superficie, desarrollarse y coagregarse en ella y finalmente disgregarse para colonizar nuevos sitios (Fig. I. I.; Costerton *et al.*, 1999; Kolenbrander 2000; Davey *et al.*, 2000).



Tomada de O'Toole *et al.*, 2000

Figura I. I. Modelo del desarrollo del biofilm.

La formación de los biofilms inicia a partir de células libres que se encuentran en el medio y se comunican entre sí, para determinar, junto con las interacciones ambientales el inicio de la formación del biofilm, a partir de una adherencia inicial y la formación de microcolonias. O'Toole *et al.* (1999), han desarrollado una técnica para identificar la formación de biofilms; ésta técnica consiste en la observación y posterior cuantificación de la formación de biofilms en placas de 96 pozos de PVC (cloruro de polivinilo), éste método fue utilizado para la obtención de mutantes deficientes en la formación de biofilms (mutantes sad, surface attachment defective, O'Toole *et al.*, 2000). El protocolo consiste en el crecimiento de las cepas en medio líquido en pozos de PVC a temperatura ambiente durante un tiempo determinado, posteriormente el medio de cultivo se desecha y los pozos de PVC son lavados vigorosamente y teñidos con una preparación de cristal violeta al 0.1% con la finalidad de hacer evidente la formación de biofilms. Para cuantificar las bacterias adheridas se destiñe el biofilm lavando con alcohol-acetona entonces es posible

cuantificar la cantidad de bacterias adheridas mediante la determinación de la absorbancia a 570 nm.



En la naturaleza, la formación de biofilms es influenciada por muchos más factores que sólo un medio rico y una superficie, esto debido a que es aceptado que una superficie completamente limpia, es rápidamente recubierta por una película de moléculas orgánicas, los tipos de interacciones físicas que se presentan entre ésta película y las células, así como factores nutricionales y de metabolismo propios de la bacteria, son determinantes para la formación del biofilm. Asimismo, se han encontrado evidencias de que para la formación de biofilm es requerida una señal específica conocida como sensor de quórum, tanto en fases iniciales de la formación, como en la maduración y disgregación del biofilm (Costerton *et al.*, 1999). Un experimento que permitió demostrar lo anterior fue el desarrollado por Davies *et al.*, (1998), donde monitorearon la formación de biofilm de una cepa silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* y una mutante la cual no podía formar ninguna señal de quórum (*lasI*⁻ – *rhlI*⁻), al paso de dos semanas observaron que el biofilm formado por la mutante fue mucho menor en cuanto a grosor que el biofilm formado por la cepa silvestre. El grupo de trabajo de Davies, también realizó experimentos para determinar la calidad de la formación de biofilm en función a una señal molecular externa [que para *P. aeruginosa* es N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona], donde se sometió a evaluación la formación de biofilm de una mutante que no era capaz de producir ésta molécula, y la formación de biofilm de la misma mutante pero en un medio suplementado con la molécula señal, y observaron que la señal de sensor de quórum, es requerida para la maduración normal del biofilm, y que los

gradientes de concentración de la señal en el medio, no eran significativos dentro de la maduración.



Algunos de los factores conocidos que tienen influencia en la formación de biofilms en sus diferentes fases se enumeran en la Tabla I. I.

Tabla I. I. Resumen de los factores que influyen la formación de biofilms en diferentes fases

Factores genotípicos	El genotipo específico del organismo Expresión de los genes que codifican propiedades de superficie Expresión de los sistemas de señalización Formación de sustancias poliméricas extracelulares. Dinámica del crecimiento del microorganismo: Tasas de crecimiento específicas, periodo de latencia, afinidad por sustratos. Expresión de factores genéticos no directamente conectados a la formación de biofilm, (motilidad, quimiotaxis, genes de represión catabólica)
Factores fisico-químicos	Interfase (combinaciones de sólido, líquido y gaseoso) Composición de sustratos y rugosidad Gradiente y concentración del sustrato Temperatura, pH, potencial de agua, presión demandada y suplementación de oxígeno, efectos de la radiación.
Procesos al azar	Colonización inicial: adherencia, disgregación Cambios al azar en los factores bióticos y abióticos
Fenómenos determinantes	Interacciones específicas entre microorganismos: competencia, neutralismo, cooperación y depredación.
Procesos mecánicos	Condiciones de flujo laminar o turbulento, abrasión, restricciones logísticas.
Importar-exportar	Adición o remoción de componentes bióticos o abióticos al sistema de biofilm.
Cambios temporales	Cambios diurnos o anuales periódicos en el ambiente biótico y abiótico ej. Luz, temperatura pH, Po ₂ , Cambios irregulares junto con eventos imprevistos.

Tomada de Wimpenny *et al.*, 2000.

El comportamiento celular en la formación de biofilm es muy complejo. Los microorganismos en vida libre (planctónicos) liberan al medio diversas moléculas propias del metabolismo. Al acumularse éstos se desencadenan una serie de

fenómenos que dan como resultado la adherencia de las bacterias a una superficie, es decir, la formación de un biofilm. En ésta estructura ecológica, y como consecuencia del cambio del entorno, las bacterias modifican el metabolismo que venían desarrollando, permitiendo así la maduración del biofilm. Al llegar a un grado de diferenciación, algunas de las células que se encontraban conformando al biofilm, se liberan del mismo para volver a formar parte de los microorganismos de vida libre y así cerrar el ciclo.

Los mecanismos genéticos conocidos que permiten que estas bacterias se comporten de ésta forma, se discutirán más adelante.

I. II. III. Factores físicos que afectan la formación de biofilms

Elementos fundamentales en la organización y formación del biofilm son los factores físico-químicos, por ejemplo, las interacciones moleculares básicas como las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones que permiten el reconocimiento específico como adhesinas microbianas y algunos componentes del hospedero (por ejemplo, la película adquirida del esmalte; Busscher *et al.*, 1997).



Dentro de éstos determinantes ecológicos, también debemos mencionar, el flujo del medio en el que se encuentran los microorganismos y los factores físicos asociados como la abrasión, el flujo turbulento, y la localización específica del futuro biofilm, es decir, por lo regular no colonizan superficies perfectamente lisas, sino que

hay superficies rugosas que les permiten una mejor adhesión y una ventaja mayor como es el evitar el desplazamiento mecánico del lugar donde es formado el biofilm.

I. II. IV. El pH en el biofilm

La formación de biofilms, se encuentra estrechamente asociada a la densidad celular y por ende a la fase estacionaria. Al ingresar en éste estadio, la acumulación de elementos extracelulares como ácidos producto del propio metabolismo, pueden ser un factor que influya la formación de biofilms.

Estudios de Li *et al.*, (2001), reportan que biofilms de *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mutans*, son formados más eficientemente a bajo pH y que la proporción de células planctónicas en sus experimentos fue mucho menor en cultivos en crecimiento a valores de pH bajo. Lo que nos hacer pensar que la acidez les confiere un tipo de estrés y como consecuencia de él, se asocian para formar un biofilm, sin embargo Zhu *et al.*, (2001), han realizado estudios sobre la resistencia ácida inducida por inanición o formación de biofilm en *S. mutans*, encontrando que aunque se sabe que el fenómeno de inanición ("starvation"), protege a los *S. mutans*, tanto en vida libre como en biofilm del choque ácido producido por ácido láctico o durante el consumo de sacarosa, la formación de biofilm sólo protege a las bacterias cuando el choque ácido es inducido por buffer lactato, mas no por el consumo de sacarosa, lo cual nos deja dudas sobre los productos metabólicos de las bacterias que se encuentran relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

TRABAJE CON
FALLA DE ORIGEN

I. II. V. El O₂ en el biofilm

En términos generales la formación de biofilm ha sido estudiado en condiciones aeróbicas por diversos investigadores, principalmente dedicados a la investigación de biofilms bucales, los cuales como es el caso de Bradshaw *et al.*, (1996), ha utilizado la simbiosis bacteriana como modelo de formación de biofilms, en donde bacterias anaerobias estrictas, y facultativas, se han cultivado en quimiostatos en formación de biofilm, donde observa que las bacterias anaerobias estrictas, son capaces de persistir en altas concentraciones, siempre y cuando existan bacterias anaerobias facultativas, las cuales presumiblemente les ayudan a sobrellevar el estrés que les confiere la presencia de oxígeno. En estudios posteriores el mismo grupo de Bradshaw (1997), encontró que las especies anaerobias estrictas son capaces de sobrevivir tanto en biofilm como en vida libre.

I. II. VI. Factores genéticos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro de los factores genéticos estudiados en la formación de biofilms, podemos considerar, aquellos que modifican directamente a los elementos estructurales externos bacterianos los que le confieren a la bacteria cierta movilidad hacia el sitio en el que debe adherirse y a aquellos que regulan directamente las señales de comunicación celular.

En éste sentido numerosos estudios se han llevado a cabo para determinar que en *Pseudomonas aeruginosa*, son necesarias la motilidad flagelar y el

movimiento bacteriano repentino (llamado en inglés: "twitching" movimiento mediado por el flagelo de las bacterias) para el desarrollo de biofilms (O'Toole *et al.*, 1998), y que proteínas de superficie en *Staphylococcus aureus*, se encuentran involucradas en la formación de biofilm (Cuccarella *et al.*, 2001), así como que señales de sensor de quórum son requeridas en *P. aeruginosa* para la diferenciación de un biofilm en condiciones habituales (Davies *et al.*, 1998).

I. II. VI. I. El regulador global *rpoS*

El crecimiento bacteriano se divide en diferentes fases en función a la cantidad y disponibilidad de nutrientes en el medio.

En el ambiente natural las bacterias se encuentran bajo condiciones que les permiten desarrollar periodos de crecimiento exponencial. El crecimiento bacteriano se caracteriza por largos periodos de falta de nutrientes junto con cortos periodos que permiten un crecimiento rápido.

Cuando las bacterias crecen en un cultivo en matraz ("batch"), llegan a un punto en el que la tasa de crecimiento disminuye, indicando el inicio de la fase estacionaria. El inicio de ésta fase, se presume, se debe a la disminución de nutrientes en el medio, en especial se ha propuesto se debe a la falta de un elemento como el fosfato que induce una disminución en la tasa de crecimiento. En la fase estacionaria se alcanza un equilibrio entre el número de células que mueren y las que se dividen. Muchas de las funciones inducidas durante la fase estacionaria, son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

iniciadas cuando las células son cultivadas por un periodo largo. Genéticamente, muchos promotores inducidos durante la fase estacionaria, muestran una expresión inversamente proporcional a la función en la tasa de crecimiento.

Al terminar el crecimiento, se induce la síntesis de ciertas proteínas. Muchas de las funciones que se necesitan para mantener la viabilidad máxima pueden funcionar específicamente en fase estacionaria y son dispensables durante el crecimiento. La expresión de muchos genes inducidos en fase estacionaria se encuentra controlada por un factor sigma alternativo conocido como σ^S o σ^{38} . Cuando menos la síntesis de 30 proteínas se encuentra influenciada por la presencia de RpoS en la fase estacionaria. La regulación de la expresión del gen *rpoS* es compleja y se da a varios niveles, transcripcional, post-transcripcional (mediante un RNA antisentido DsrA) y postraducciona (mediante un factor antisigma) (Repoila *et al.*, 2001). Muchos tipos de estrés incrementan los niveles celulares del sigma S, mediante la inhibición de su proteólisis, ya que bajo una condición de no estrés, es una proteína inestable.

Estudios de Adams *et al.*, (1999), han aportado conocimiento sobre la influencia de RpoS en la formación de biofilms en *Escherichia coli*, utilizando condiciones de cultivo en fase exponencial y verificando si la síntesis de proteínas es la misma de células en estado planctónico y de células en biofilm, encontraron que la ausencia de RpoS resultaba en la disminución de la formación de biofilm y que la expresión de *rpoS* fue similar en células planctónicas que en células en biofilm, cabe

mencionar, que su estudio fue realizado en quimiostatos siendo cuantificado el biofilm en vidrio, y que la cuantificación de RpoS fue realizada durante la fase exponencial de crecimiento, siendo que ésta proteína se sintetiza principalmente en fase estacionaria. Otros estudios del papel de RpoS en biofilms han descrito que ésta proteína es indispensable en la resistencia al estrés oxidativo producido por peróxido de hidrógeno en *Pseudomonas aeruginosa*, e inclusive que el gen *rpoS* se encuentra involucrado en la morfología y en la susceptibilidad de las células a algunos antibióticos.

Whiteley *et al.*, (2001) han reportado también que *rpoS* se encuentra involucrado en la morfología y sensibilidad a antibióticos en biofilms.

I. II. VII. Disgregación de biofilms

A la fecha los reportes de elementos moleculares que determinan o se encuentran involucrados en la disgregación de los biofilms son pocos, uno de ellos en *Escherichia coli* es el gen *csrA* (Jackson *et al.*, 2002), el cual se ha involucrado directamente con éste fenómeno, en éste estudio, se reportó que la formación de biofilm se estimulaba cuando era mutado el gen *csrA* y que la inducción de *csrA* en un biofilm ya formado, provocaba su dispersión bajo una variedad de distintos genotipos. Es interesante que la adición de glucosa al medio, detenga ésta dispersión.

Dentro de la fisiología general del biofilm, la disgregación es uno de los pasos poco estudiados (o tal vez muy estudiados pero con pocos resultados), el cual se da

en las fases más avanzadas de la formación del biofilm. Muy probablemente se deba a la falta de fuentes de carbono disponibles, sin embargo, es un fenómeno que merece ser estudiado más a fondo.

I. II. VIII. Intercambio genético en biofilms

La transformación genética es un proceso en el cual la bacteria es capaz de tomar e integrar a su genoma DNA exógeno libre del ambiente. Este proceso permite al los organismos adquirir genes nuevos o heredados para promover el inicio de resistencia a antibióticos y variaciones genéticas y la, rápida evolución de factores virulentos (Davidson 1999).

Se han estudiado las bacterias que forman biofilms tan comunes como las de cavidad oral. Respecto al grupo mitis del género *Streptococcus* se ha demostrado que estas bacterias entran en un estado fisiológico llamado competencia génica que permite transportar e incorporar DNA exógeno. La inducción de ésta competencia genética en éstos estreptococos es mediada por quórum sensing, el que depende de una señal que en éste caso es un péptido estimulador de competencia (Håvrestein *et al.*, 1997; Kleerebezem *et al.*, 1997; Ghigo 2001)

Investigaciones en bacterias que forman biofilms como *Streptococcus mutans*, han permitido demostrar, que las bacterias muertas dentro del biofilm pueden actuar como donadores de resistencias cromosomales codificadas para antibióticos (Li, Y-H *et al.*, 2001).

I. III. Comunicación celular

En general, las bacterias no viven aisladas o ajenas a su medio, actúan en respuesta a los elementos que las rodean ya sean nutrientes, disponibilidad de oxígeno o agentes químicos. Cabe mencionar que no sólo a éstos elementos reaccionan, sino que también lo hacen a la presencia de otras bacterias, ya sean de su misma especie, o de especies distintas. Al fenómeno en el cual las bacterias regulan su expresión genética en respuesta a fluctuaciones en la densidad de población celular, se le denomina "quorum sensing" (Miller *et al.*, 2001). Las bacterias son capaces de comunicarse entre sí utilizando señales químicas que funcionan como palabras. Específicamente, ellas pueden liberar, detectar y responder a la acumulación de éstas moléculas que vamos a conceptualizar como autoinductores. El que una especie bacteriana desarrolle el fenómeno de quórum sensing, le permite a toda la población comunidad bacteriana modificar coordinadamente el control de la expresión genética, así se obtienen beneficios que no podrían presentarse como individuos comportándose de modo parecido a seres pluricelulares (Schauder *et al.*, 2001).

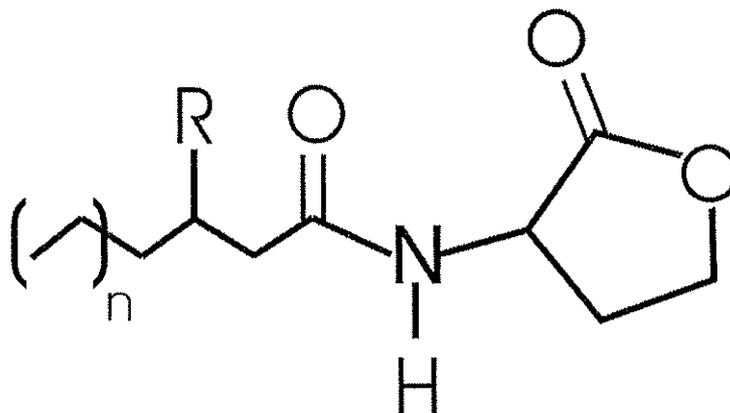
El quorum sensing fue descrito por primera vez hace 25 años en dos especies bacterianas marinas bioluminiscentes: *Vibrio harveyi* y *Vibrio fischeri* (Hastings *et al.*, 1977). Estas bacterias gram-negativas, colonizan los órganos luminosos de una variedad de peces abisales y calamares marinos. Dichos hospederos permiten que

las bacterias crezcan a altas densidades, y como consecuencia de ello generan la producción de luz a través del quórum sensing.

En *V. fischeri* la producción de luz es debida a un complejo de enzima luciferasa iniciándose cuando el *V. fischeri* se encuentra a una densidad celular alta. La señal molecular de producción de luz esta dada por la producción y acumulación de una molécula específica de la familia de las acil-homoserina lactonas (acil-HSL) (Schauder *et al.*, 2001).

Los procesos fisiológicos regulados por quorum sensing de la acil-HSL (en el caso de bacterias gram-negativas) son muy diversos, desde la bioluminiscencia a la síntesis de antibióticos o virulencia. De hecho, se conocen más de 50 especies que producen acil-HSL para regular diversos procesos bacterianos como se muestra en la Tabla I. II.

Tabla I. II. Ejemplos de sensores de quorum de acil HSL



Bacteria	Reguladores	Longitud de cadena (n)	grupo R	Función blanco
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxR-LuxI	6(1)	=O	Bioluminiscencia
	AinR-AinS	8(2)	-H	Bioluminiscencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR-LasI	12(4)	=O	Interacción
	RhlR-RhlI	4(0)	-H	Hospedero
	QscR	?	?	Ramnolipidos
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraR-TraI	8(4)	=O	Interacción hospedero
				Transferencia Conjugación
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaR-EsaI	6(1)	=O	Exopolisacárido
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerR-CerI	14(5)	-H	Agregación
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanR-VanI	10(3)	=O	Proteasas
<i>Yersenia enterocolitica</i>	YenR-YenI	6(1)	-H,	Desconocida
			=O	

Tomado de Fuqua *et al.* 2001.

I. III. I. Mecanismos moleculares de quórum sensing

En 1981, fue identificada la primera acil-HSL (Acil-homoserina-lactona), en *V. fischeri*, desde entonces a la fecha se han identificado a 10 diferentes acil-HSL en diferentes especies bacterianas. Todas éstas estructuras tienen el anillo de homoserina lactona en común, la cadena lateral acilo de los

diferentes acil HSL pueden variar en longitud, grado de sustitución y saturación (Tabla I. II).

Las bacterias que emplean múltiples sistemas distintos de quórum-sensing como *Pseudomonas aeruginosa*, deben mantener especificidad por acil-HSLs diferenciales. En el caso de las dos acil-HSL producidas por *P. aeruginosa*, son estructuralmente distintas, presumiblemente limitando la interacción entre éstos dos sistemas. La tetradecanoil-HSL con 14 C en su cadena lateral producida por *Rhizobium leguminosarum* y *Rhodobacter sphaeroides* tienen las cadenas laterales de acil-HSL más grandes identificadas a la fecha.

I. III. I. I. Sistema de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* LuxI/LuxR

El sistema más estudiado de quórum sensing es precisamente el de *V. fischeri*. Esta bacteria, como ya lo hemos comentado anteriormente, vive en asociación simbiótica con un número de hospederos eucarióticos. En cada caso el hospedero ha desarrollado un órgano luminoso especial que es habitado por la especie de *V. fischeri* a muy altas densidades celulares en asociación con eucariontes proveedores de un ambiente rico en nutrientes en el que pueda vivir. El papel de *V. fischeri* es proveer a su hospedero de luz, y cada hospedero utiliza la luz provista por la bacteria para un propósito específico (atraer presas, evitar predadores, o encontrar a un compañero; Miller *et al.* 2001).

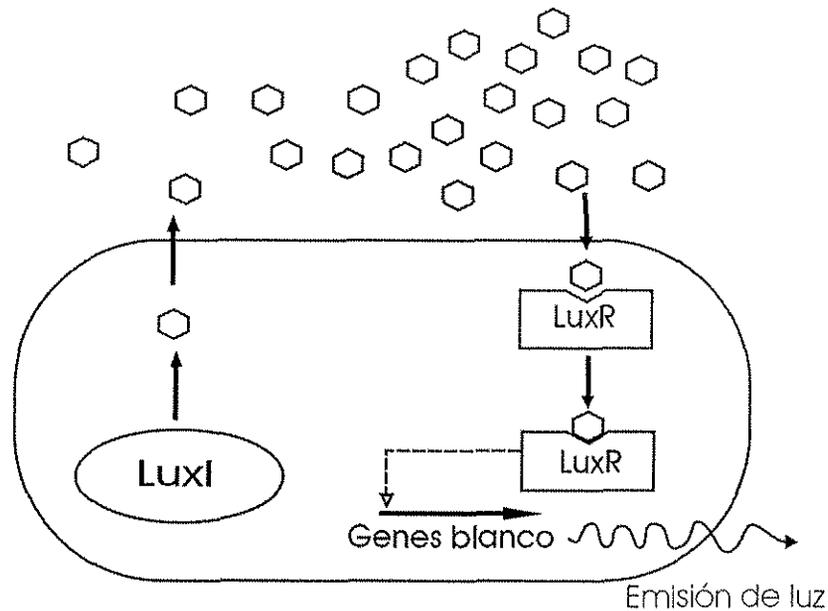


Figura I. II. Esquema de la señalización por comunicación celular en *Vibrio fischeri*

En *V. fischeri*, la emisión de luz se encuentra relacionada con la densidad bacteriana, y éste fenómeno es controlado por quórum sensing. En el órgano luminoso del pez hospedero el cultivo de *V. fischeri* llega a densidades celulares extremadamente altas, llegando a 10^{11} células/ml (Nyholm *et al.* 1990). Mientras el cultivo va creciendo, *V. fischeri* va produciendo y excretando una "hormona" a la que se le conoce como autoinductor, éste, al llegar a una concentración determinada, es reconocido por el mismo *Vibrio fischeri*, e inicia una cascada de señalizaciones que concluyen con la emisión de luz. Como se mencionó antes, las enzimas de luciferasa que se requieren para la producción de luz en *V. fischeri*, son codificadas por los genes *luxCDABE*, que existen como parte del operón

luxICDABE. Principalmente dos proteínas reguladoras llamadas LuxI y LuxR comprenden el aparato de quorum sensing.

Las proteínas tipo LuxI, son catalizadores de la formación de la acil-HSL, a partir de aquí, éste autoinductor, es excretado por difusión libre al medio, posteriormente, al llegar a un cierto gradiente, la homoserina lactona, puede volver a ser detectada por la bacteria, y modificar a la proteína LuxR para formar un complejo, éste complejo se une al promotor de *luxICDABE* y activa la transcripción del operón. También se une al promotor de *luxR* pero en éste caso reprime su transcripción (Schauder *et al.* 2001, Miller *et al.* 2001).

I. III. I. II. Sistema de comunicación celular en bacterias gram-positivas

En general se entiende que los mecanismos de comunicación en éste caso de bacterias gram-negativas, se lleva a cabo por medio de éste proceso antes mencionado, aunque hay bacterias principalmente gram-positivas, que no producen Homoserinas Lactonas, las cuales utilizan otras moléculas como medios de comunicación celular. Como por ejemplo, podemos encontrar a péptidos los cuales son activos gracias a una modificación post-traduccional. El modelo de éste fenómeno se encuentra en la Fig. I. III.

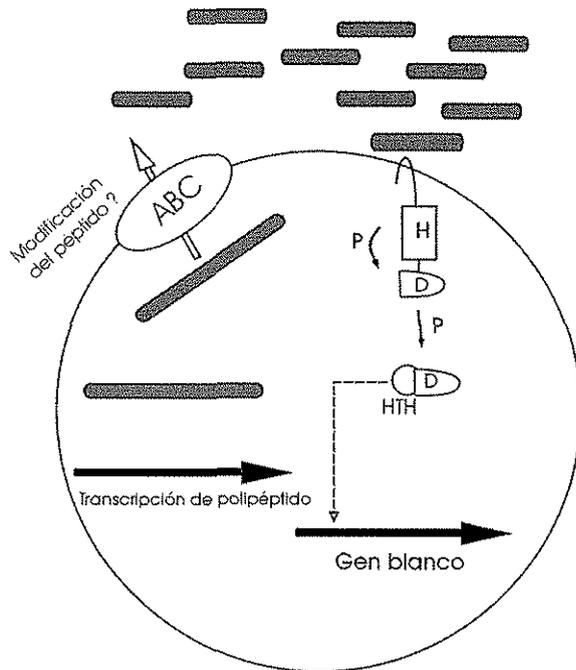


Figura I. III. Esquema de la señalización por comunicación celular en bacterias gram-positivas.

La comunicación celular en bacterias gram-positivas involucra oligopéptidos que son modificados y secretados al medio y acumulados a altas concentraciones de densidad celular como señales moleculares. Los detectores para estas señales son sistemas de dos componentes, los cuales le permiten detectar fluctuaciones de los estímulos ambientales y manejar ésta información para modificar el patrón de expresión genética.

I. III. I. III. Sistema de bioluminiscencia de *Vibrio harveyi*

Se han descrito sistemas de comunicación no solamente entre bacterias de una misma especie, sino entre varias especies, al parecer el lenguaje bacteriano rebasa la comunicación intra-específica. El primer sistema descrito como tal fue en *Vibrio harveyi*, en el cual existen dos moléculas (mensajes) de comunicación celular, uno muy parecido al de *V. fischeri*, y otro en el que se utiliza como molécula de comunicación una furanona, la cual le

permite no sólo “sentir”, la cantidad de células de su misma especie, sino que también de otras especies e inclusive géneros bacterianos (Fig. I. IV).

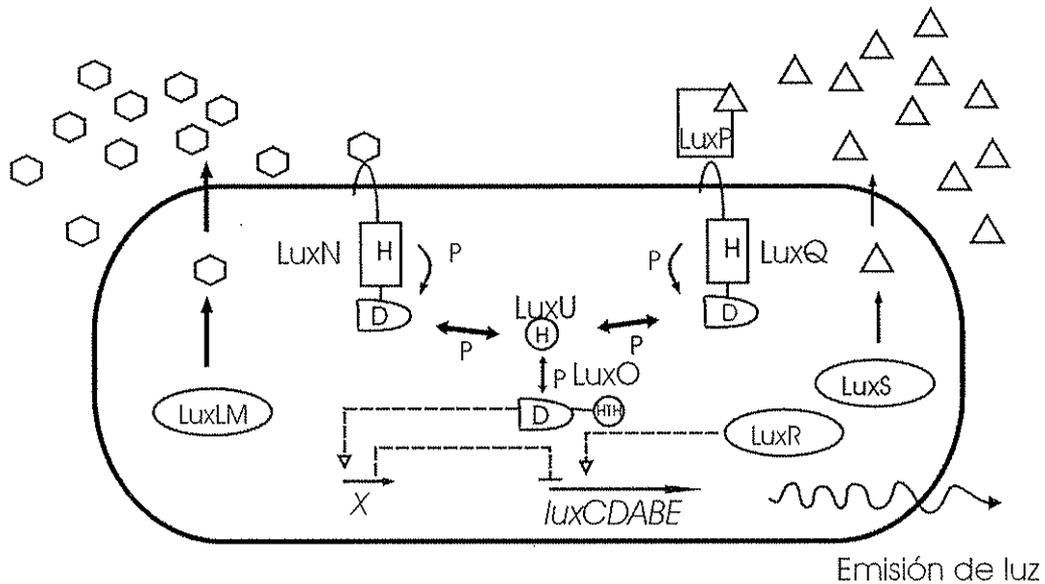


Figura I. IV. Esquema de la señalización por comunicación celular en *Vibrio harveyi*

Este fenómeno, amplía la visión del comportamiento microbiano dentro de comunidades, así como ahora surgen muchas preguntas sobre los mecanismos moleculares de emisión, recepción y transducción de señales no solamente intra-específicamente sino también entre diversas comunidades de microorganismos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I. IV. *Escherichia coli* como modelo de estudio para la formación de biofilms.

Escherichia coli, es un bacilo gram-negativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, es la bacteria más abundante en el tubo digestivo del hombre y, por su facilidad de cultivo, ha sido tomada como modelo de estudio de las células procariotas, siendo probablemente el ser vivo mejor conocido desde el punto de vista biológico (estructura, fisiología y genética), constituye parte de la microbiota normal del tubo digestivo del hombre, y algunas han desarrollado factores de enteropatogenicidad, comportándose como patógenas primarias. Este fascinante microorganismo ha permitido desarrollar un estudio exhaustivo de la genética, debido principalmente a que su genoma fue el primero en ser secuenciado completamente, y a partir de él se conocen una gran cantidad de genes, y algunos de los elementos que regulan (es una labor ardua y minusciosa), es por ello, que a ésta bacteria se le conoce como el pilar de la biología molecular, habiendo una gran cantidad de armas genéticas y metodológicas para el estudio genético-molecular de los fenómenos que desarrolla (Liébana *et al.* 1996).

Es por ello que muchos científicos alrededor del mundo utilizan a ésta bacteria para entender los fenómenos que se desarrollan en la naturaleza, siendo los biofilms uno de ellos, en *Escherichia coli* se han realizado estudios en biofilms, (Adams *et al.* 1999; Prigent-Combaret *et al.* 2000), en los cuales

se identifican los patrones de desarrollo de la formación de biofilm en cepas de *Escherichia coli* estudiando principalmente la producción de ácido colánico, el papel de los flagelos y de los pilis, en éste estudio aislaron mutantes en la formación de pilis, flagelos y ácido colánico, mediante la inserción de genes que codifican para resistencia a antibióticos dentro de los genes que quieren deletar en el cromosoma, y obtuvieron como resultado, que la motilidad flagelar, no fue requerida para la adhesión inicial ni para la formación de biofilm, y que el ácido colánico (el exopolisacárido específico de *Escherichia coli*), no era crítico para la adherencia bacteriana, sino más bien un contribuyente en la arquitectura del biofilm y que su presencia permite la formación de biofilms voluminosos.

Genevaux *et al.* (1996), han realizado una colección de mutantes en *E. coli* las cuales son defectuosas en la formación de biofilm, y ellos han clasificado en dos grupos en función a la severidad del defecto, y realizando un análisis fenotípico, encontraron que las mutantes aisladas fueron defectuosas en la motilidad mediada por flagelo.

Los métodos utilizados para la formación y cuantificación de biofilms, son muy diversos, sin embargo uno de los más aceptados, es el desarrollado por O'Toole *et al.* (1999), el cual se encuentra basado en el crecimiento y formación de biofilm en placas de microtitulación de PVC (cloruro de polivinilo), son su posterior tinción con cristal violeta, lo cual permite una cuantificación posterior, mediante el lavado del colorante con etanol acetona y puede ser medido espectrofotométricamente. Mediante éste método se han

encontrado diversos genes responsables de la formación de biofilm no sólo en *E. coli*, sino en otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt *et al.* 1999).

I.V. Propósito de ésta tesis.

El objetivo del presente estudio fue el análisis del papel de RpoS en la formación de biofilm, así como el mejoramiento de los métodos conocidos para el estudio de la formación de biocapas. Esto sentaría las bases para estudios posteriores y análisis moleculares más profundos.

El propósito de ésta tesis es descifrar la posible interacción que tiene el factor Sigma de la RNA polimerasa σ^S , ya que durante la expresión de éste gen, es que se desarrollan la mayoría las interacciones de la formación del biofilm. Y si es que esa interacción existe, cómo es que se lleva a cabo en las células

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

II. I. Técnicas Bacteriológicas

II. I. I. Cepas bacterianas.

Se muestran los genotipos de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo en la Tabla II. I.

Tabla II.I. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en esta tesis

Cepa	Propiedades relevantes del genotipo	Procedencia
CF1648	MG1655 (F <i>lam^r rph-1</i>)	Dra. Carmen Gómez Eichelmann
CFG02	CF1648 <i>rpoS::Tn10</i>	P1 (JMH0039) X CF1648
DS386	MC4100 λ RZ5: <i>rpoS742::lacZ</i>	Dr. Deborah Siegle
MC4100	F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 flb-5301 deoC1 pts F25</i>	Colección del laboratorio
JMH0039	MC4100 <i>rpoS::Tn10</i>	Colección del laboratorio
MX614	F ⁻ Δ (<i>lac-pro</i>) <i>galE ilv-680 thi-1</i>	Dr. Fernando Bastarrachea.
MXG02	MX614 <i>rpoS::Tn10</i>	P1(JMH0039) X MX614
W3110	F ⁻ <i>lam- ln(rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	Dra. Carmen Gómez Eichelmann
WG01	W3110 <i>rpoS::Tn10</i>	P1(JMH0039) X W3110
ZK408	<i>flaI, araD ΔlacU169 strA thi pyrC46 nslA thyA his</i>	Dr. Erick Zinser

II. I. II Medio y Condiciones de Crecimiento

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 °C con 15 psi durante 20 min antes de ser vertidos en las cajas Petri. Los medios sólidos se prepararon agregando agar bacteriológico al 1.5 % (p/v) al medio líquido antes de entrar al proceso de autoclave.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB). Para caldo se disolvieron Bacto-Tripton (10 g), Extracto de Levadura (5 g) y NaCl (10 g) en 1 l de agua desionizada ajustando el pH a 7.0 con 1 ml de NaOH 2.5 N. Para placas de cultivo, a la mezcla anterior se le añadieron 20 g de agar bacteriológico. También se utilizó una modificación al medio LB, agregándole 100 mM de MOPS (3- N-morfolino propano sulfonato).

II. I. II. I. Selección por antibióticos

Las concentraciones utilizadas en este trabajo se dan en la Tabla 2.2, mismas que fueron utilizadas tanto en medios líquidos como sólidos, a menos que se establezca lo contrario. Para el agar, el volumen apropiado de la solución stock de antibiótico se mezcló con el medio recién esterilizado a una temperatura menor a 50 °C. Todas las soluciones de antibiótico fueron esterilizadas por filtración usando filtros de membrana MFTM (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm

Tabla II.2. Concentración de Antibióticos usados en los medios de cultivo

Antibióticos	Stock	Concentración Final
Ampicilina	200 mg/ml	200 µg/ml
Kanamicina	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetraciclina	15 mg/ml (50% etanol)	15 µg/ml

II. I. II. II. Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en placas de agar a 4 °C hasta por 1 mes. Fueron subcultivadas rutinariamente para propagar la cepa. Para almacenamientos a largo plazo, se utilizaron viales con medio y 15 % de glicerol y almacenado a -70 °C. Los lisados de P1 se mantuvieron a 4 °C.

II. I. II. III. Condiciones de crecimiento

Los cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer o en tubos de ensayo, a 200 rpm a 30 °C. El volumen de los cultivos varía entre 1/25 a 1/10 del volumen del matraz. La incubación anaeróbica se llevó a cabo en jarras anaeróbicas a 1 atmósfera de H₂ y CO₂ en sistemas anaeróbicos de GasPak™ (BBL Microbiology Systems).

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

II. II Técnicas Bioquímicas

II. II. I. Purificación de sobrenadantes

Para obtener el sobrenadante de los medios de cultivo se realizó primeramente un cultivo de toda la noche, a partir de éste fueron centrifugadas las células y el sobrenadante se filtró con filtros Millipore con un

tamaño de poro ya fueran 0.45 μm ó 0.22 μm según el caso. Estos sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente después de ser obtenidos.

II. II. II. Determinación de concentración de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Markwell *et al.* (1978), con las variaciones propuestas por Lowry. Este método cuantifica el color obtenido por la reacción del reactivo de Fenol Folin-Ciocalteau con los residuos tirosil de una proteína desconocida, comparándola con albúmina de suero bovina (BSA) a 750 nm. Este método está diseñado para cuantificar de 1 a 20 μg de proteína. Las determinaciones de proteína de 5 a 100 ng deben llevarse a cabo incrementando todos los volúmenes 5 veces.

Para llevar a cabo la cuantificación se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A, conteniendo 1 ml de Tartrato de Sodio y Potasio (2%), 1 ml CuSO_4 (1 %), llevado a 25 ml con una solución de sosa carbonatada: Na_2CO_3 (2 %), NaOH (0.1 N) (Solución sensible a la luz).

Solución B, Fenol Folin-Ciocalteau (Merck) diluido 1:1 con agua destilada el mismo día que se usó. La albúmina de suero bovina, fue utilizada a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ como curva estándar.

Se hicieron las siguientes diluciones para la curva estándar:

BSA μ l	0	5	10	15	20	30
H ₂ O μ l	50	45	40	35	30	20

Antes de utilizar la muestra, fue diluida 1:20 y se realizaron posteriormente nuevas diluciones:

Muestra μ l	5	10	20	50
H ₂ O μ l	45	40	30	0

Se le agregó a cada muestra y a la curva estándar 100 μ l de SDS al 20% y se calentaron por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

A cada muestra se le añadió 1 ml de la solución A. Después de mezclar con vórtex se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A cada muestra se le agregó 50 μ l de la solución B y fue mezclada nuevamente con vórtex. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura de las muestras a 750 nm. De acuerdo a la curva patrón fue calculada la concentración de proteína por muestra.

II. II. III. Medición de actividad de β -galactosidasa

El producto del gen *lacZ*, la β -galactosidasa, ha sido utilizado para estudiar muchos aspectos de la regulación genética. Para esto se construye una fusión genética entre un operón *lac* sin promotor, y el promotor del gen de interés. La concentración de la enzima, y por lo tanto la expresión de gen, puede medirse con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

(ONPG), que aunque es incoloro, el producto de su hidrólisis con la β -galactosidasa es de color amarillo.

El ensayo se llevó a cabo como está descrito por Miller (1972) por triplicado, para cada muestra. Se separaron entre 25 y 100 μ l del cultivo líquido o suspensión celular y se mezcló con solución amortiguadora Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mM β -mercaptoetanol, pH 7.0) hasta un volumen final de 1 ml. Se permeabilizaron las células. Esto se logra al agregar 40 μ l de cloroformo y 20 μ l de SDS al 0.1 % a la mezcla de cada ensayo y se agitan por vórtex durante 10 segundos. Se dejan incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Se inició la reacción al agregarse 0.2 ml de ONPG (4 mg/ml) a cada tubo, se mezclaron nuevamente durante 5 segundos y se incubaron a temperatura ambiente hasta que la mezcla del ensayo incoloro (control) cambió a un suave amarillo. Para detener ésta reacción se agregaron 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M y se obtuvo una coloración amarilla, fue registrado el tiempo de reacción. Se midió previamente la densidad óptica del cultivo celular a 600nm. Y para cada ensayo la OD_{420} y OD_{550} . La OD_{420} mide la absorbancia debida a la hidrólisis de ONPG; la OD_{550} mide la dispersión de la luz debida a los escombros celulares y la turbidez. Se utiliza la siguiente fórmula para calcular la actividad de β -galactosidasa (Miller, 1972):

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 (\text{OD}_{420} - (1.75 \cdot \text{OD}_{550}))}{t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}}$$

OD₄₂₀ y OD₅₅₀ son las medidas de absorbancia.

t = Tiempo de incubación de la mezcla de reacción, en minutos.

v = Volumen del cultivo celular usado, en ml.

OD₆₀₀ = Densidad óptica a 600 nm de la suspensión celular.

II. II. IV. Técnicas Espectrofotométricas

El espectro de absorción electrónica se midió usando un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech).

II. III. Manipulación y análisis de proteínas

II. III. I. Preparación de las células para cuantificación de proteínas.

Las proteínas se obtuvieron de extractos celulares completos, a cada muestra, se le añadió un cocktail de inhibidor de proteasas (Complete™ Mini EDTA-free de Roche ®), para evitar la degradación de las mismas.

II. III. II. Análisis de proteínas (gel de proteínas).

Previo a la realización del gel, se realizaron las pruebas para determinar la concentración de proteína como previamente se ha descrito.

Las muestras, fueron tratadas con colorante de Laemmli (glicerol 10 %, SDS 2.3 %, Tris-HCl pH 6.8 0.0625M, β mercaptoetanol 5.0 %, azul de

bromofenol 0.001 %, antes de ser cargados en el gel fueron calentados durante cinco minutos.

Se realizó un gel de acrilamida de manera discontinua con las siguientes concentraciones: para el gel resolvidor al 9 % se utilizaron 3 ml de Acrilamida/Bis 30 % , 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.9, 100 μ l de SDS 10 %, 4.3 ml de H₂O, 80 μ l de persulfato de amonio 10 % y 5 μ l de TEMED; para el gel concentrador al 5 % se utilizaron 1 ml de acrilamida/Bis 30 % , 1.5 ml de Tris 0.5 M pH 6.5, 60 μ l de SDS 10 %, 3.4 ml de H₂O, 40 μ l de persulfato de amonio 10 % y 5 μ l de TEMED.

La preparación del gel fue realizada en los casetes provistos mediante el sistema de Mini-PROTEAN[®] 3 cell de Bio-Rad. El gel fue corrido en solución amortiguadora de Tris - glicina (trizma base 3.02 g, glicina 16.55 g, SDS 10 % 10 ml y H₂O desionizada c.b.p. 1000 ml)

La tinción del gel fue realizada mediante azul de Coomassie, para ello se disolvieron 0.25 g de Azul de Coomassie en 90 ml de metanol:H₂O (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial. Se filtró la solución con papel Whatman No.1 para eliminar cualquier partícula.

Se sumergió el gel en cinco volúmenes de la solución de tinción y se colocó en una plataforma de rotación lenta durante toda la noche a temperatura ambiente.

Se retiró la solución de tinción y se colocó el gel en una solución de metanol con ácido acético para desteñirlo en una plataforma con agitación lenta durante 4 – 8 horas, y se cambió ésta solución tres o cuatro veces.

Después de desteñir el gel, fue observado bajo luz blanca para observar la presencia de bandas de proteínas. Una foto para su análisis posterior fue tomada utilizando el sistema KODAK EDAS.

II. III. III. Marcado de proteínas con metionina.

Se utilizó la técnica de pulso y caza, mediante ésta técnica, podemos identificar las proteínas sintetizadas en un periodo específico de tiempo, la marca utilizada fue [S^{35}] metionina, el procedimiento por medio del cual fue utilizada es: las células de las cepas mutante y silvestre en RpoS, fueron medidas a crecimientos microbianos diferentes, esto es en densidades de crecimiento 0.5 y 2 OD_{600nm} , se tomaron 500 μ l del cultivo y fueron sometidos a una concentración de 25 μ Ci durante 20 minutos a 37°C, posteriormente fueron añadidos 100 μ g de L-metionina, dejando incubar 5 minutos más, al terminar el proceso, las muestras fueron centrifugadas y la pastilla fue almacenada a -20°C. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE.

II. IV. Ensayo de formación de biofilm.

II. IV. I. Formación de biofilm

Se utilizó la técnica descrita por George O'Toole y Roberto Kolter. Para el cultivo de los biofilms se utilizaron placas de 96 pozos, de PVC (Falcon 3911 placas flexibles de microtitulación) en cada pozo se colocó 150 μ l del cultivo en medio líquido de células y se dejaron a diferentes tiempos aeróbicamente o anaeróbicamente a 37 °C. Las placas de microtitulación, fueron cubiertas con cajas plásticas para prevenir la evaporación.

II. IV. II. Tinción y cuantificación del biofilm

Posterior a la formación de biofilm, fue retirado el medio de cultivo y teñido el biofilm con cristal violeta al 1 % (Sigma). Ésta tinción es importante, porque a partir de ella se realiza la cuantificación del biofilm.

Para la cuantificación de la formación de biofilm, fue eluido el cristal violeta agregándole a cada pozo 200 μ l de etanol acetona (80/20) durante cinco minutos y esto fue posteriormente medido espectrofotométricamente a 570 nm.

II. V. Manipulación y Análisis de DNA.

II. V. I. Purificación de DNA cromosomal.

La purificación fue realizada con el kit de Promega Wizard ® Genomic DNA Purification kit.

Llevando a cabo el siguiente protocolo:

Se puso un cultivo de toda la noche de la cepa en cuestión, de ella se realizó la purificación de DNA, de éste cultivo se tomaron 1 ml y se centrifugó a 13,000-16,000 g durante 2 minutos para obtener una pastilla de células (pellet), y se eliminó el sobrenadante, se le añadieron 600 μ l de la solución de lisis (10 mM Tris Cl, pH 7.5 1 mM EDTA, pH 8.0), mezclando las células con suavidad hasta resuspenderlas completamente, ésta suspensión fue incubada a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células, y después fueron enfriadas a temperatura ambiente. Se añadieron 3 μ l de solución de RNasa (10 mg/ml) al lisado celular, invirtiendo el tubo de 2 – 5 veces para mezclar, posteriormente se incubó a 37 °C durante 15 - 60 minutos y se enfrió la muestra a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de solución de precipitación de proteínas (acetato de potasio 3 M), al lisado celular tratado con RNasa. Se realizó una agitación con vórtex vigorosamente a velocidades altas durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular, seguido a ello se incubó la muestra en hielo durante 5 minutos. Y se centrifugó a 13,000 – 16,000 g durante 3 minutos, de éste centrifugado, se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml con 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente, mezclando por inversión hasta que hebras de DNA formaron una masa visible y se centrifugó nuevamente durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y fue secado el tubo sobre un papel absorbente, Se añadieron también 600 μ l de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se agitó por inversión con gentileza el tubo para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lavar la pastilla de DNA. Se volvió a centrifugar durante 2 minutos más y se aspiró el etanol con cuidado. El tubo se secó sobre un papel absorbente y se utilizó el Savant (Speed Vac Concentrator) durante 2 horas aproximadamente. Ya completamente seco se añadieron 100 μ l de Solución de rehidratación de DNA al tubo y se rehidrató incubando a 65 °C durante 1 hora. Periódicamente se mezcló la solución cuidadosamente. Para finalmente almacenarlo de 2 a 8 °C

II. V. II. Purificación de plásmidos de DNA

Este procedimiento está basado en el protocolo dado en el Kit de Qiagen-Plasmid, diseñado para purificar hasta 20 μ g de DNA de plásmidos multicopia provenientes de cultivos de *E. coli* hasta de 5 ml crecidos en medio LB (Luria Bertani). Se cosechan células de un cultivo de 5 ml de toda la noche por centrifugación a 13 000 rpm por 5 minutos. Se resuspendió la pastilla obtenida en 250 μ l de amortiguador P1 (100 μ g/ml RNasa A; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA) hasta obtener una solución homogénea. La RNasa A digiere el RNA liberado durante la lisis alcalina. Los fragmentos de RNA resultantes no se unen a la resina de QIAGEN bajo las condiciones de pH y sal presentes en el lisado. Se agregaron 250 μ l de amortiguador P2 [200 mM NaOH, 1% SDS (p/v)] a la suspensión celular, se mezcló suavemente hasta obtener una solución clara. El SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteínicos de la membrana celular, permitiendo la lisis y liberación del contenido celular. El NaOH desnaturaliza tanto el DNA cromosomal y de plásmido, como las proteínas. El tiempo óptimo de lisis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

permite la máxima liberación del DNA de plásmido de la célula sin permitir la salida del DNA cromosomal, minimizando a su vez la exposición del plásmido a una desnaturalización irreversible. Es por esto que la reacción de lisis no debe durar más de 5 minutos. Se obtuvo un lisado viscoso, el que es neutralizado con 350 μ l de amortiguador N3 (3.0 M acetato de potasio, pH 5.5). La alta concentración de sales precipita al KDS (Dodecíl sulfato de potasio), y tanto las proteínas desnaturalizadas, como el DNA cromosomal y los restos celulares quedan atrapados en el complejo de sales-detergente. El DNA de plásmido, al ser más pequeño y cerrado covalentemente, se renaturaliza correctamente, manteniéndose en solución. Como cualquier remanente de SDS inhibiría la unión del DNA a la resina de QIAGEN, la solución debe mezclarse perfectamente de manera suave, asegurando así la completa precipitación del detergente. El precipitado se removió con una centrifugación a alta velocidad por 10 minutos. Se pasó el sobrenadante al tubo con la resina de QIAGEN por decantación. Se centrifugó de 30 a 60 segundos, donde se une el DNA del plásmido a la resina QIAGEN. La resina de intercambio aniónico de QIAGEN, hecha de Dietilaminoetanol (DEAE), en condiciones ácidas está cargada positivamente, interactuando entonces con los grupos fosfatos del DNA. Se lavó el DNA del plásmido con 750 μ l de amortiguador PE (80% etanol) y se centrifugó de 30 a 60 segundos. En este paso el DNA adherido a la columna fue lavado con etanol, volátil y fácil de remover. Se volvió a centrifugar durante 2 minutos para evaporar el etanol. La elusión del DNA se realizó con 50 μ l de amortiguador EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). Los plásmidos obtenidos se guardaron a -20 °C.

II. V. III. Modificaciones Enzimáticas del DNA

II. V. III. I. Digestión con endonucleasas de restricción

La digestión de DNA con endonucleasas de restricción se llevó a cabo con amortiguadores y enzimas comerciales (GIBCO BRL y Promega). Se agregó al menos 1 unidad de enzima por 1µg de DNA por cada sitio de restricción, tal que el volumen de enzima agregado fue de un décimo del volumen de la reacción total. La digestión se incubó por 1 -1.5 h, a las temperaturas recomendadas por el fabricante. Un amortiguador universal se utilizó cuando se usaron dos o más enzimas con diferentes requerimientos de sal. Se analizaron las digestiones con gel de electroforesis.

II. V. III. II. Electroforesis con geles de agarosa

La electroforesis en gel de DNA se llevó a cabo de acuerdo a Maniatis *et al.* (1982). Típicamente, se agregó polvo de agarosa al 1.0 % (Bio-Rad) a un amortiguador 1 X de TBE (8.9 mM Tris base, 8.9 mM ácido bórico, 0.2 mM EDTA, pH 8.0). Se disolvió la agarosa en el horno de microondas a la mitad de la potencia (sin llegar a ebullición) por 1.5 minutos; se mezcló la solución a homogeneizar y se vertió en el conformador de geles de electroforesis. Se dejó solidificar previo al procedimiento. La electroforesis se realizó mediante el sistema de Bio-Rad (subcell GT®) a un voltaje constante (100 V por 45 minutos), en solución amortiguadora 1 X TBE. Se preparó amortiguador de carga (6 X) que contiene 0.25 % de azul de bromofenol, 0.25 % cianol xileno y 40 % de sucrosa (p/v) en agua destilada. Éste se agregó a muestras de DNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

antes de ser corridas, tal que el volumen del amortiguador de carga fuera 1/5 del volumen total corrido en el gel al terminar la electroforesis, fue sumergido durante por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ ml). Después de la tinción, las bandas de DNA fluorescen a la luz UV (Hoefer), se fotografiaron usando una cámara digital DC290 ZOOM (Kodak) y se manipularon con el programa 1D versión 3.5.4. Se utilizaron patrones de peso molecular de DNA de 100 bp (pares de bases) o de 1 kb (1 000 bases), de Bio-Rad o Bethesda Research Laboratories (Gibco BRL).

II. V. IV. Análisis de DNA por hibridización tipo Southern

El método de Southern utilizado es de la casa comercial Amersahm Pharmacia Biotech® y el kit se llama ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system. Se basa en un ensayo de quimioluminiscencia:

II. V. IV. I. Procesamiento del gel de agarosa

Previa digestión del DNA blanco y realización de la electroforesis utilizando el sistema KODAK EDAS en un gel de agarosa al 1 %, se procedió a la toma de fotografía del mismo, cuidando de marcar con una regla el inicio de los pozos en el gel y la subsecuente medición del gel completo. Posteriormente, el gel se puso en un recipiente de vidrio sobre un agitador, y fue cubierto con una solución de depurinización (HCl 250 mM) y se inició la agitación, nos aseguramos de que el gel se moviera libremente por el recipiente. Este procedimiento se detuvo en cuanto el bromofenol marcado de color azul, se tornó completamente amarillo, proceso que duró

aproximadamente 12 minutos. Se tiró la solución depurinizadora y fue lavado el gel con agua bidestilada. Se cubrió el gel con solución desnaturalizadora (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) y se inició la agitación. El tiempo de agitación fue, a partir de que el bromofenol recuperó su color azul, durante 25 minutos. Se retiró la solución y el gel fue nuevamente lavado con agua bidestilada. Como utilizamos una membrana de nylon cargada positivamente, tuvimos que neutralizar para lo que utilizamos una solución neutralizadora (NaCl 1.5 M, Tris HCl 0.5 M, ajustando el pH a 7.5) y se agitó durante 30 minutos.

II. V. IV. II. Transferencia del DNA por capilaridad

Se montó una cámara de capilaridad en un recipiente de vidrio, el cual fue llenado hasta la mitad con 20X SSC (citrato Na_3 0.3M, NaCl 3M, pH 7.0), se colocó en medio una plataforma sobre la cual se puso un puente de papel Whatman™ 3MM, sobre éste papel fue montado el gel de agarosa ya tratado teniendo cuidado de no atrapar burbujas de aire entre el papel y el gel, se cortó una hoja de membrana Hybond-N⁺ (Amersahm) de nylon del tamaño del gel, misma que se coloca sobre el gel sin atrapar burbujas de aire, sobre la membrana se colocan tres hojas de papel Whatman™ 3MM del tamaño del gel y sobre éste toallas desechables de papel (alrededor de 5 - 7 cm de papel), sobre las toallas desechables, se coloca un peso de aproximadamente 750 g y se deja toda la noche para que se haga la transferencia por capilaridad del DNA -en el gel- hacia la membrana.

II. V. IV. III. Fijación del DNA a la membrana

La cámara de capilaridad se desmontó y en la membrana se marcaron los carriles que correspondieron al gel, hicimos notar el primer carril con un número 1. Posteriormente, se coloca la membrana en una hoja de papel Whatman™ con el DNA hacia arriba y la transferencia del DNA fue fijada por luz UV a 120 mJ (UV1800 Stratalinker, Stratagene).

II. V. IV. IV. Marcado de la sonda

El DNA que fue utilizado para sonda, fue previamente amplificado y purificado, el marcaje de la sonda se realizó con el kit de Amersahm Pharmacia Biotech®: ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system. Se desnaturalizaron 100 ng de la muestra de DNA (10 µl) por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, inmediatamente se enfrió el DNA en hielo durante 5 minutos, fue centrifugado brevemente para concentrar el contenido en la base del tubo, fue añadido el agente marcador en un volumen equivalente al del DNA (10 µl) y mezclado con la pipeta. Después se le añadió la solución de glutaraldehído utilizando también un volumen equivalente al volumen del agente marcado (10 µl), se mezcló y posteriormente fue incubado durante 10 minutos a 37 °C.

II. V. IV. V. Hibridización

La solución amortiguadora de hibridización fue preparada de la siguiente manera, a temperatura ambiente tomamos el volumen requerido del

amortiguador de hibridización, añadimos cloruro de sodio sólido en una concentración de 0.5 M, Se puso en agitación, y se le añadió agente bloqueador para una concentración final del 5% (p/v), Se continuó mezclando a temperatura ambiente con un agitador magnético, posteriormente se calentó a 42°C durante 30min a 1 hora mezclándolo ocasionalmente. El volumen del buffer de hibridización, fue equivalente a 0.25 ml/cm².

La solución amortiguadora de hibridización fue colocado en un contenedor junto con la membrana. La prehibridización se llevó a cabo con agitación a 42 °C durante 1 hora, posteriormente, se colocó la sonda marcada, cuidando que no estuviera en contacto directo con la membrana, es decir, fue mezclada en el buffer, ésta mezcla fue incubada y agitada durante toda la noche.

II. V. IV. VI. Lavado de la membrana

En un contenedor limpio la membrana fue lavada dos veces durante 10 minutos con amortiguador de lavado primario (SDS 0.4%, SSC 0.5X) precalentado a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente, se colocó la membrana en un contenedor limpio y se le añadió un exceso de amortiguador de lavado secundario (SSC 2X) y lavado en agitación a temperatura ambiente dos veces durante cinco minutos.

II. V. IV. VII. Generación y detección de señal luminosa.

El exceso del amortiguador de lavado fue eliminado y se colocó la membrana con el DNA hacia arriba sobre una hoja de papel Whatman™ 3MM antes de la detección durante unos segundos. Posteriormente la membrana fue transferida a un nuevo contenedor. Fueron mezcladas en cantidades iguales el agente de detección 1 (que tiene H₂O₂, el sustrato para la peroxidasa) y el agente de detección 2 (que contiene luminol). La mezcla de éstos dos agentes de detección fue colocada directamente sobre la zona del DNA de la membrana, y se dejó incubar durante exactamente 1 minuto - durante éste tiempo se lleva a cabo la reducción de peróxido por peroxidasa, la cual provoca una oxidación del luminol y consecuentemente la producción de luz azul-. Se eliminó el exceso de reactivo y se colocó la membrana entre dos acetatos evitando que se formasen burbujas, éstos se colocaron en un cassette para exposición de películas, donde fue expuesto a una película sensible a luz azul Hyperfilm-ECL® durante toda la noche. Posteriormente, la película fue revelada.

II. VI. Técnicas Genéticas

II. VI. I. Técnica de transducción por P_{1vir}

Las transducciones se llevaron a cabo usando P_{1vir} como está descrito por Silhavy *et al.* (1984). P_{1vir} es una variedad de P_1 , que no puede formar lisógenos.

II. VI. II. Preparación de lisados.

Se crece la cepa receptora toda la noche (O.N.) en LB suplementado con CaCl_2 5 mM y sus correspondientes antibióticos. Se centrifugó el cultivo y resuspendimos la pastilla en la mitad del volumen del MgSO_4 10 mM. A 200 μl de células resuspendidas se les agregó igual cantidad de bacteriófago. Se incubaron a 37 °C sin agitación por 20 minutos. Se agregaron 200 ml de LB + CaCl_2 5 mM, y fueron agitados con vórtex. Se incubaron a 37 °C y 300 rpm de 2 - 4 h. Se observó que el control crecía, mientras que los otros cultivos fueron lisados. Se removieron los restos celulares por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min. Se colocó el sobrenadante a tubos nuevos sin tocar la pastilla. Se agregaron 200 μl de CHCl_3 y se agitó durante 30 segundos (vórtex). Y fueron guardados a 4 °C.

II. VI. II. I. Transducción por P_{1vir}

La cepa receptora creció en un cultivo durante toda la noche en LB suplementado con CaCl_2 5 mM. Se centrifugó el cultivo y fue resuspendida la pastilla en la mitad del volumen en MgSO_4 10 mM. El lisado fue diluido en

MgSO₄ 10 mM de 10⁻⁰ a 10⁻⁴. A tubos con 100 µl de células, les fueron añadidos 100 µl del fago diluido. Al mismo tiempo fueron incubados como controles a dos tubos más, uno sin células y otro sin fago. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 20 minutos. Fueron centrifugados y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue lavada al menos 3 veces mediante la adición de 1 ml de LB y resuspendiendo las células. Después de lavar, se le agregó a la pastilla 1 ml de LB y fue resuspendida. Incubadas a 37 °C y 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 80 µl de MgSO₄ 10 mM para ser plateados en el medio selectivo apropiado.

II. VII. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

II. VII. I. Síntesis de primers de oligo-nucleótidos

Se diseñaron primers de oligo-nucleótidos de aproximadamente 30 bp de longitud, con las secuencias de los extremos del gen *rpoS*, la secuencia de los primers fue revisada con el programa Amplify V. 1 para Macintosh para evitar posibles errores de reconocimiento del primer. El fabricante de los primers fue la casa comercial Gibco-BRL. En la Tabla 2.3 se muestran los primers usados en este estudio.

Tabla II.3 Secuencia de oligo-nucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen de alineamiento
Oli 1	GCC GCA GCG ATA AAT CGG CGG AAC C	<i>rpoS</i>
Oli 2	GTC AGA TAA AGT TTT AAC GCT ATA TCC G	<i>rpoS</i>
LacZ- rev	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC AAC G	<i>lacZ</i>

II. VII. II. Amplificación del DNA.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer). Se agregaron a un tubo estéril de PCR: el DNA purificado (1 µl), 2 µM de cada primer (40 pM), 22 µl de PCR supermix (Gibco) que contiene enzima Taq, dNTPs y amortiguador, y se mantuvo en hielo hasta entrar al termociclador.

Programa utilizado:

Ciclos	Temperatura	Función
1 ciclo	94 °C 5 min.	Separar las cadenas
40 ciclos	94 °C 1 min.	Desnaturalizar
	57 °C 1 min	Alineamiento
	72 °C 5 min	Extensión
1 ciclo	72 °C 10 min	Ultima extensión

Cada muestra (5 µl) se revisó en geles de agarosa a 1%.

II. VII. III. Purificación del PCR.

El fragmento de DNA obtenido se purificó utilizando el protocolo descrito por QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). La banda del fragmento de DNA obtenida previamente mediante PCR se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. A ésta, le fueron añadidos 5 volúmenes del amortiguador PB por

cada volumen de la reacción de PCR y mezcla. Colocamos una columna QIAquick spin® en un tubo colector, vertimos la muestra y centrifugamos de 30 a 60 s. La alta concentración de sales permite pasar los contaminantes a través de la columna mientras ésta adsorbe al DNA a la columna de QIAquick (membrana de sílica-gel). Descartamos el líquido y colocamos nuevamente la columna en el tubo. Lavamos con 750 µl de amortiguador PE (Etanol 96%) y centrifugamos de 30 a 60 s. Retiramos el líquido que queda en el tubo colector y centrifugamos la columna 1 min más a 10 000g, para remover completamente el etanol. Colocamos la columna QIAquick en un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio. Para eluir el DNA, agregamos 50 µl amortiguador EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) al centro de la columna y centrifugamos por 1 min. Ver Figura II.1.

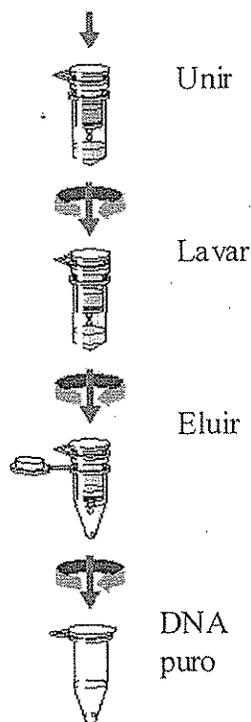


Figura II. 1 Diagrama de protocolo de purificación de PCR.

CAPÍTULO III

Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J.
(2002) Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by
3-(N- morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Research*
in Microbiology **153**, 181-185.

Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS)

F. Paola Corona-Izquierdo, Jorge Membrillo-Hernández *

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, Mexico City 04510, Mexico

Received 24 September 2001; accepted 4 January 2002

First published online 9 January 2002

Abstract

In most natural environments, association with a surface in a structure known as a biofilm is the prevailing microbial life-style. *Escherichia coli* has been a useful model for the study of biofilm formation. Here we analyzed the amounts of biofilm formed when *E. coli* was cultured in the presence of MOPS [3-(N-morpholino)propane sulfonate]. We used the “O’Toole and Kolter” method, which consisted of growing cells in PVC microtiter dishes and staining the formed biofilm with crystal violet. Our results showed that: 1) the addition of 100 mM MOPS to the rich Luria-Bertani (LB) medium increased the capacity of biofilm formation of several *E. coli* strains; and 2) the biofilm formed by cells growing in the presence of MOPS was more evident and well defined than that of cells cultured in LB-only medium. The improved ability of forming biofilms was maintained even for 60 h after removing MOPS from the medium, indicating that this improvement was due to a change in the metabolism of *E. coli* growing in the presence of MOPS or that, under these conditions, biofilm formation was favored. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Escherichia coli*; Biofilm; pH; MOPS

1. Introduction

Biofilms probably comprise the normal environment for most microbial cells in many natural and artificial habitats, and as such are complex associations of cells. Analysis of biofilms has revealed that they are relevant in medical, industrial and environmental settings. Biofilm-associated bacteria generally have an increased resistance to antimicrobial agents [11,12]. Biofilm formation has been reported in a wide range of microbial species [10,15,24,25]. All types of surfaces, including the leaves of parsley plants, prosthetic devices in the human kidney and even the aluminum basins used for the storage of spent nuclear fuel have been reported to be colonized by biofilms [18,23,26]. Biophysical, structural and chemical studies performed thus far have led to a model in which bacteria form microcolonies surrounded by copious amounts of exopolysaccharides. Between the microcolonies are water-filled channels that serve to promote the

influx of nutrients and the efflux of waste products [2]. Given the preponderance of biofilm communities in nature as well as their medical and industrial impact, it is clearly important to understand the molecular mechanisms that govern both the formation and dissolution of these sessile communities.

Initial experiments by Fletcher [6] and the elegant studies performed by O’Toole and Kolter [19,20] have led to the establishment of a standard technique for the quantification of bacterial biofilm formation known as the “O’Toole and Kolter method” where cells are first grown for either 24 or 48 h without shaking in PVC microtiter dishes. To remove any unattached cells, the microtiter dishes are rinsed thoroughly with water and subsequently stained with 1.0% crystal violet (CV) for 20 min. This staining procedure allows the visualization of cells that had attached to the surfaces as such cells are stained purple with CV, whereas abiotic surfaces are not stained with CV. This technique has been useful for the isolation of mutants defective in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* [4,19,20,22]. It has been reported that the ability to form such biofilms in *E. coli* is strongly influenced by the nutritional environment. Biofilm formation was evident

* Correspondence and reprints.
E-mail address: jmh@biomedicas.unam.mx
(J. Membrillo-Hernández).

when cells were grown in Luria-Bertani medium (LB) and minimal medium supplemented with casamino acids (MM-CAA) whereas no biofilm formation was observed in cells grown in MM without CAA [22]. This technique has also proven to be useful for qualitative analysis of biofilm formation [3–5].

Although the O'Toole and Kolter method gives generally good results for *E. coli* it seems to vary depending on the *E. coli* strain used [22], and in most cases, the formed biofilms are displayed as diffuse layers that are difficult to distinguish at first sight. Quantification by elution of CV with 80% ethanol 20% acetone is often required for the isolation of candidate mutants defective in biofilm formation. In this communication we report on the use of LB medium supplemented with 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS) to improve the quality of biofilm formation. We observed that the use of 100 mM MOPS is sufficient for maintaining a strong biofilm signal in several *E. coli* strains even after 60 h.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Bacteria used in this study were *E. coli* strains: MC4100 [F^- *araD139*, Δ (*argF-lac*)169, *rpsL*, *ptsF25*, *relA*, *flb5301*, *rbsR*, *deoC1*, *rpsL150*], W3110 [F^- *lam^-* IN (*rrnD-rrnE*)1 *rph-1*], MX614 [F^- Δ (*lac-pro*)*galE*, *ilv-680thi*], MG1655 (F^- *lam^-* *rph-1*), and ZK408 (*fthC*, *araD* Δ *lacU169* *strA* *thi* *pyrC46* *nsIA* *thyA* *his*).

2.2. Growth conditions

For overnight (ON) cultures, an isolated colony was inoculated in 3 ml of LB medium [17] or LB supplemented with 100 mM MOPS (LB-MOPS) and grown at 30 °C. Polyvinyl chloride dishes (PVC) microtiter wells containing 150 μ l of LB or LB-MOPS were inoculated with 15 μ l of ON cells. When spent media were used for bacterial growth, two sequential centrifugation steps at 14 000 *g* and a 0.45- μ m filtration step were performed before reinoculation with bacterial cells. Growth curves were determined by measuring the OD_{600nm}. Importantly, the growth curve of the different strains tested suffered no change by the addition of MOPS.

2.3. Biofilm assays

Biofilm assays were carried out using 96-well, non-tissue culture-treated PVC dishes using the O'Toole and Kolter method [21]. Every experiment was performed in triplicate at least three times to confirm the results. Microtiter dishes were covered with a plastic box to prevent evaporation. Visualization of attached cells was performed by removing the cell culture, staining the wells with 1.0% CV for

20 min, and rinsing the wells three times with water. Quantification was carried out spectrophotometrically at OD_{570nm} eluting the attached CV with 80% ethanol and 20% acetone [8]. Standard deviation (SD) was carried out for three independent experiments.

3. Results

3.1. The effect of MOPS on biofilm formation

The formation of bacterial biofilm is affected by numerous environmental signals such as availability of nutrients, oxygen and growth phase. It is widely accepted that a bacterial culture increases its pH as the growth curve develops [7,13]. In order to test whether the intrinsic pH change during a bacterial growth curve affects the formation of biofilm, we tested the ability of the *E. coli* W3110 strain to form biofilm in LB medium and LB medium supplemented with 100 mM MOPS (initial pH 7.0), we have previously seen that at this concentration, the initial pH is maintained up to 60 h after inoculation [16]. Seed cultures were grown in LB or LB-MOPS and diluted in fresh media. Samples were taken at different times, the pH was recorded and the biofilm formation was quantified as described in Material and Methods (Fig. 1). The amount of biofilm formed by cells grown in LB-MOPS was constantly higher than that of cells grown in LB only (Fig. 1B); moreover, it was evident that the biofilm formed in LB medium was diffuse in contrast to that formed

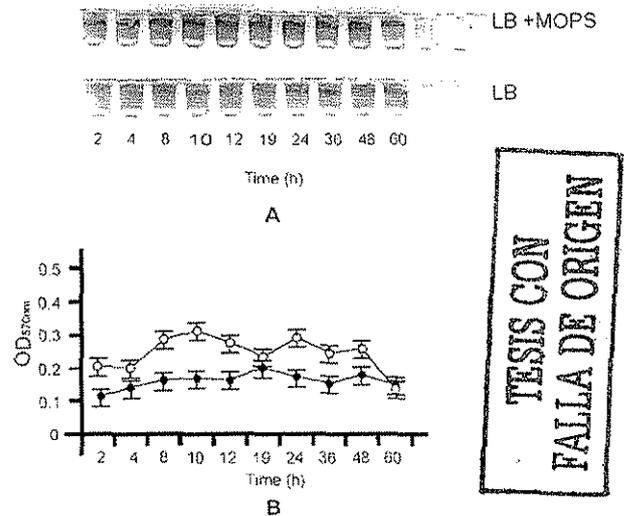


Fig. 1. Effect of 100 mM MOPS on the formation of biofilm in *Escherichia coli* W3110 strain cells were incubated in LB or LB-MOPS at 37 °C, samples were taken at the indicated time intervals and the visualization (A) and quantification (B) of formed biofilm were determined. The last two wells in A correspond to a 60 h culture of strain ZK408 as a negative control, results from a typical experiment are shown. In B, filled circles correspond to the quantification of biofilm formed by cells grown in LB and empty circles correspond to cells grown in LB-MOPS. Bars indicate SD of three independent experiments.

by cells grown in LB-MOPS medium. Similar results were found when strains MC4100 and MG1655 were used (data not shown). As a negative control we included strain ZK408, an *flhC* mutant defective in the production of flagellum, an essential component in the process of biofilm formation [1, 22] (Fig. 1A). It is noteworthy that under our experimental conditions the growth curves of the strains tested were almost identical in the presence or absence of MOPS (data not shown).

3.2. Cells grown in LB-MOPS maintain improved ability to form biofilm even when transferred to fresh LB

It is generally accepted that cell-cell communication through chemical signaling is one of the first steps in biofilm formation [14]. Our results would indicate that either: 1) cells grown in LB-MOPS produce higher amounts of signals for biofilm production or 2) the metabolism of cells grown in LB-MOPS is more adequate for biofilm production than that of cells grown in LB. To discern between these two possibilities, we inoculated microtiter dishes containing LB-MOPS with cells grown overnight in LB and vice-versa, microtiter dishes containing LB were inoculated with cells grown in LB-MOPS. Samples were taken at different times and the biofilm formation was quantified. As shown in Fig. 2, it was clear that cells arising from an LB-MOPS overnight culture that were transferred to LB, maintained an increased ability to form biofilm (Fig. 2). In contrast, cells which arose from an LB overnight culture that were transferred to LB-MOPS showed weaker biofilm formation (Fig. 2).

3.3. Analysis of the supernatants of cells growing in LB-MOPS

To test for the presence of released extracellular factors affecting biofilm formation by cells growing in LB or LB-MOPS media, we incubated cells grown in LB with filter-sterilized spent LB-MOPS medium and cells grown in LB-MOPS with filter-sterilized spent LB medium (Fig. 3). It was observed that the amount of biofilm formed in spent LB-MOPS medium by cells from LB cultures increased during the first 12 h of incubation and then reached a steady state (Fig. 3C and D). In contrast, the amount of biofilm formed in spent LB medium by cells arising from LB-MOPS cultures suffered a continuous decrease (Fig. 3C and D).

As control experiments we incubated cells from LB cultures with spent medium from a different culture also grown in LB (Fig. 3A and B). Under these conditions, the amounts of biofilm were similar to those observed with fresh LB medium. When cells from LB-MOPS cultures were incubated with spent media of another culture also grown in LB-MOPS, the amounts of biofilm formed were constantly higher than those for cells grown in the presence of spent LB medium (Fig. 3A and C).

3.4. Addition of MOPS to an LB growing culture: effect on biofilm formation

To determine whether MOPS per se was the signal for higher biofilm production, we added MOPS (100 mM) to a 25-h culture growing in LB. As shown in Fig. 4, the addition of MOPS did not change the amounts of biofilm produced in the subsequent 8 h of growth. Moreover, to

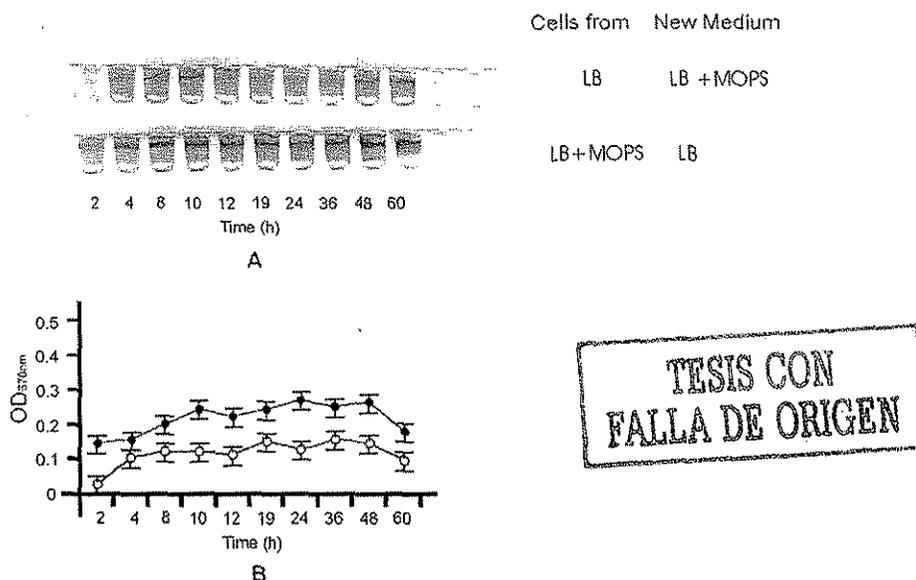


Fig. 2. Biofilm formation of cells subcultured into fresh media with or without MOPS. An overnight culture of strain W3110 grown in LB was diluted into fresh LB-MOPS medium (top part in A and empty circles in B). An overnight culture of strain W3110 grown in LB-MOPS was diluted in LB medium (bottom part in A and filled circles in B). Samples were taken at the indicated times and the biofilm formation determined as described in Fig. 1.

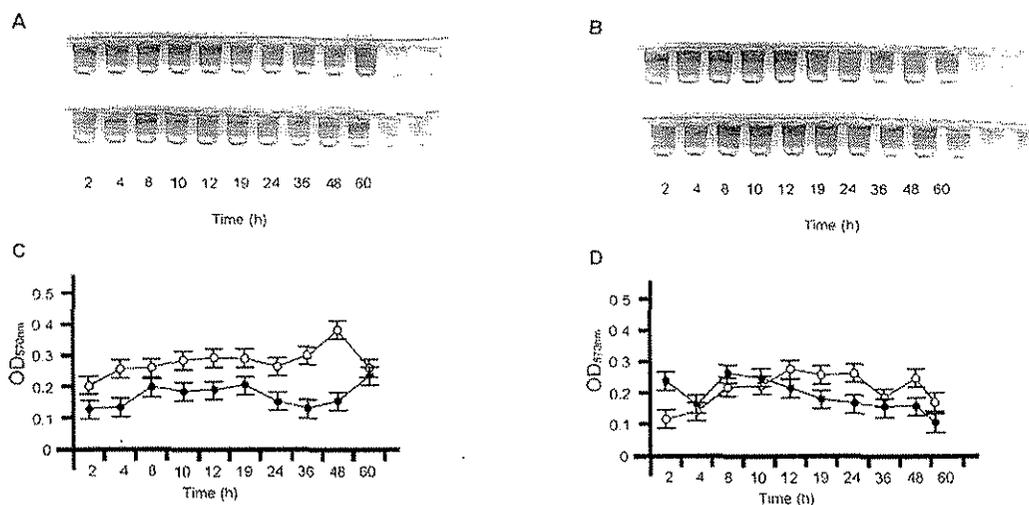


Fig. 3. Effect of the supernatants of cells grown in LB-MOPS on the biofilm formation by cells grown previously in LB. Spent media from overnight cultures of strain W3110 were collected as described in Material and Methods and inoculated with cells grown in different media. Cells grown in LB-MOPS mixed with a LB-MOPS supernatant (top in A and empty circles in C), cells grown in LB mixed with a LB supernatant (bottom in A and filled circles in C), cells grown in LB and mixed with a LB-MOPS supernatant (top in B and empty circles in D) and cells grown in LB-MOPS and mixed with a LB supernatant (bottom in B and filled circles in D). Samples were treated as described in Fig. 1.

check whether protein synthesis was involved in the increase in biofilm formed by the presence of MOPS, we added chloramphenicol (Cm, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) prior to the addition of MOPS to the 25-h culture growing in LB. We detected no change in biofilm production by the addition of MOPS in the presence or absence of Cm (Fig. 4). Similar results were observed when a 5-h LB culture was used (data not shown).

4. Discussion

The study of bacterial biofilms has become a prime area of microbiological research. It has been shown that many environmental factors such as temperature, nutrients and oxygen availability affect the formation of biofilms [22]. *P. aeruginosa* and *E. coli* have been very useful models for the study of biofilm formation, specifically for genetic

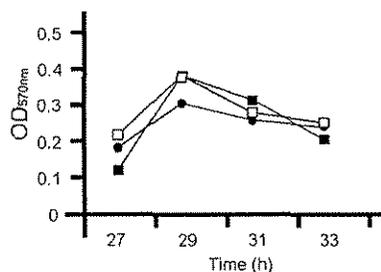


Fig. 4. Effect of added MOPS on biofilm formation of cells growing in LB medium. LB-containing PVC wells were inoculated with W3110 cells at 37 °C. After 25 h of incubation, 100 mM MOPS (filled squares), 100 mM MOPS and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cm (filled circles), or nothing (empty squares) was added and the biofilm formation quantified at the times indicated. Results from a typical experiment are shown.

studies that have led to the discovery of several genes involved in the process of bacterial adherence and biofilm maturation [19,20,22]. These studies have been performed using the novel O'Toole and Kolter method that involves the use of PVC microtiter dishes and the subsequent detection of biofilms by the addition of crystal violet [21]. Using the same method we report here that *E. coli* strains formed a more defined biofilm when cultured in LB containing 100 mM MOPS than when cultured in LB medium alone. Interestingly, as shown in Fig. 1, after 60 h of culture, it seems that both cultures form similar amounts of biofilm; this may be a result of the slow metabolism present at that period of time, as it has been previously reported that active metabolism is required for biofilm formation [22]. Our experiments suggest that this difference in biofilm formation is not due to the presence of MOPS per se, meaning that MOPS is not a direct inducer of biofilm formation (Fig. 4). It would appear that the change in environmental conditions is the cause of improved biofilm formation. In fact, we observed that cells grown in LB-MOPS retained their capacity to form higher amounts of biofilm even after 60 h of incubation in LB medium alone (Fig. 2); this could be explained by the hypothesis that cells grown under these conditions may have a different metabolism from those grown in LB alone. It is already known that bacteria are able to modulate their local pH, especially in biofilm, by upregulating genes involved with acid or base production [9]. An interesting possibility is that the effect of MOPS is to enhance initial adhesion of cells to the PVC, rather than subsequent development of biofilm. Experiments are under way to test this hypothesis.

Our experimental observations on the increase in biofilm formation when cells grown in LB were mixed with the

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

supernatants of cultures grown in LB MOPS would suggest the presence of an extracellular factor promoting biofilm formation that is produced by cells grown in LB-MOPS. Moreover, the fact that cells grown in LB-MOPS and then transferred to spent LB medium displayed a marked decrease in biofilm formation also suggests that the LB spent medium probably contained an inhibitor or lacked the promoting factor that may be present in cultures grown in LB-MOPS (Fig. 3). In addition, our finding that the biofilm formed by cells grown in the presence of MOPS is more clearly defined than that found in LB cultures could be very useful for the identification of mutants with altered characteristics of biofilm formation. Experiments are being performed in this laboratory on the identification of mutants affected in biofilm formation, using LB-MOPS as the culture medium.

Acknowledgements

We thank Drs. Roberto Kolter, Erik Zinser, Fernando Bastarrachea and Carmen Gómez-Eichelmann for the generous gifts of strains used in this study, and Mr. Miguel Paéz-Silva and Ms. Marisela Aguirre-Ramírez for technical assistance. We thank the anonymous reviewer for his comments and improvement of the discussion section. F.P.C.-I. holds a Msc. studentship from Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. This project was supported by grants J33369-N from CONACyT, Mexico, and IN205200 from PAPIIT, UNAM.

References

- [1] D.H. Barlett, B.B. Frantz, P. Matsumura, Flagellar transcriptional activators FlbB and FlaI: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and FlaI control, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 1575–1581.
- [2] J.W. Costerton, A. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 711–745.
- [3] P.N. Danese, L.A. Pratt, S.L. Dove, R. Kolter, The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 424–432.
- [4] P.N. Danese, L.A. Pratt, R. Kolter, Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 3593–3596.
- [5] P.N. Danese, L.A. Pratt, R. Kolter, Biofilm formation as a developmental process, *Methods Enzymol.* 336 (2001) 19–26.
- [6] M. Fletcher, The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene, *Can. J. Microbiol.* 23 (1977) 1–6.
- [7] J.W. Foster, Lower pH adaptation and the acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, *Crit. Rev. Microbiol.* 21 (1995) 215–237.
- [8] P. Genevaux, S. Muller, P. Bauda, A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties, *FEMS Microbiol. Lett.* 142 (1996) 27–30.
- [9] H.K. Hall, K.L. Karem, J.W. Foster, Molecular responses of microbes to environmental pH stress, *Adv. Microb. Physiol.* 37 (1995) 229–272.
- [10] L. Hall-Stoodley, H. Lappin-Scott, Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 168 (1998) 77–84.
- [11] B.D. Hoyle, W.J. Costerton, Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog. Drug. Res.* 37 (1991) 91–105.
- [12] T. Ichimiya, T. Yamasaki, M. Nasu, In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, *J. Antimicrob. Chemother.* 34 (1994) 331–341.
- [13] G.N. Jarvis, J.B. Russell, Differences in *Escherichia coli* culture conditions can have a large impact on the induction of extreme acid resistance, *Curr. Microbiol.* 43 (2001) 215–219.
- [14] D.G. Javics, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, E.P. Greenberg, The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science* 280 (1998) 295–298.
- [15] E.O. Kajanda, N. Çiftçioglu, Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (1998) 8274–8279.
- [16] J. Membrillo-Hernández, E.C.C. Lin, Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 7571–7579.
- [17] J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- [18] C.E. Morris, J.-M. Monier, M.-A. Jacques, A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4789–4795.
- [19] G.A. O'Toole, R. Kolter, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 295–305.
- [20] G.A. O'Toole, R. Kolter, Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 449–461.
- [21] G.A. O'Toole, L.A. Pratt, P.I. Watnick, D.K. Newman, V.B. Weaver, R. Kolter, Genetic approaches to study of biofilms, *Methods Enzymol.* 310 (1999) 91–109.
- [22] L.A. Pratt, R. Kolter, Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 285–293.
- [23] J.W. Santo Domingo, C.J. Berry, M. Summer, C.B. Fliermans, Microbiology of spent nuclear fuel storage basins, *Curr. Microbiol.* 37 (1998) 387–394.
- [24] D. Stickler, Biofilms, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 270–275.
- [25] S.N. Wai, Y. Mizunoc, A. Takade, S.-I. Kawabata, S.-I. Yoshida, *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance and biofilm formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3648–3655.
- [26] T.A. Wollin, C. Tieszer, J.V. Riddell, J.D. Denstedt, G. Reid, Bacterial biofilm formation, encrustation and antibiotic adsorption to ureteral stents indwelling in humans, *J. Endourol.* 12 (1998) 101–111.

CAPÍTULO IV.

Corona-Izquierdo, F.P. & Membrillo-Hernández, J.
(2002) A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in
Escherichia coli during exponential phase of growth.
FEMS Microbiology letters **211**, 105-110.

A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth

F. Paola Corona-Izquierdo, Jorge Membrillo-Hernández *

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, 04510 Mexico City, Mexico

Received 25 October 2001; received in revised form 4 April 2002; accepted 5 April 2002

First published online 2 May 2002

Abstract

Biofilm formation in *Escherichia coli* is a process that involves slow growth and stress conditions where several molecular signals and growth phase regulated genes are involved. Here we show that *rpoS* mutant strains (defective in the stress regulator σ^S) exhibit an increased production of biofilm, especially in the exponential phase of growth. Our results indicate that *rpoS* mutants produce an extracellular factor that promotes the production of biofilm during the exponential phase of growth. Thus, RpoS plays an important role in the regulation of the amount and initiation of biofilm formation in *E. coli*. © 2002 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

Keywords: RpoS; Stationary phase; Biofilm; Extracellular factor; *Escherichia coli*

1. Introduction

Bacterial lifestyle in natural environments occurs normally as a complex group of organisms attached to a surface called a biofilm [1]. Analysis of biofilms has revealed that they are relevant in medical, industrial and environmental settings. Biofilm-associated bacteria generally possess increased resistance to antimicrobial agents [2,3]. In addition, biofilms can be formed in industrial settings and could be a latent source of infection or promote the clogging of industrial pipes [4,5]. Biophysical, structural, and chemical studies performed thus far have led to a model where bacteria form microcolonies surrounded by copious amounts of exopolysaccharides. Between the microcolonies are water-filled channels that serve to promote the influx of nutrients and the efflux of waste products [5,6]. *Escherichia coli* has been a useful model for the study of genetic determinants of biofilm formation [7–9]. Mutant cells lacking flagella (type I pili) (*flhC* or *flhD*) or affected

in motility (*motAB*) are severely impaired in the first steps of biofilm formation [8]. However, little is known about the genes and signals involved in the expansion and disruption of biofilms in *E. coli*. Mutant strains of *Vibrio cholerae* El Tor, and *Staphylococcus epidermidis* affected in the synthesis of capsular polysaccharide/adhesins (PS/A) were shown to be defective in biofilm formation [10–12]. Interestingly, the expression of type I pili genes in *E. coli* and PS/A in *V. cholerae* El Tor and *S. epidermidis* is growth phase dependent [13].

The master regulator of stationary phase-specific gene expression in *E. coli* is the product of the *rpoS* gene, RpoS (σ^S), which controls the synthesis of more than 50 proteins during the transition from the exponential to the stationary phase of growth, starvation, and osmotic shock [14]. Increasing evidence has suggested that RpoS may have an important role during the exponential phase of growth and that it may also function as a negative regulator [15–18].

The importance of RpoS in biofilm formation by *E. coli* has been suggested previously [19,20]; however, the role σ^S may play in biofilm metabolism is still unclear. One report suggested that *rpoS* expression is enhanced during biofilm development [20], others found similar levels of expression in planktonic and biofilm-constituent cells [19]. In this communication, we report on the role of

* Corresponding author. Tel.: +52 (5) 55622 3840;
Fax: +52 (5) 55622 3891.
E-mail address: jmh@biomedicas.unam.mx (J. Membrillo-Hernández).

RpoS in biofilm formation of *E. coli* using the O'Toole and Kolter protocol [21]. Our results strongly suggest that RpoS plays a key role in controlling the amount of biofilm formed, in determining the initiation of biofilm formation, and in the prevention of the synthesis of an extracellular factor that apparently promotes the formation of biofilm during the exponential phase of growth.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The *E. coli* K12 strains used in this study are described in Table 1. Genetic crosses used to introduce the *rpoS::Tn10* mutation were performed using bacteriophage P₁^{vir}-mediated transduction [22].

2.2. Media, growth conditions and biofilm assays

Cells were grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) medium [22], with tetracycline (Tc, 25 µg ml⁻¹) when appropriate. Overnight cultures were grown in 10-ml test tubes containing 3 ml LB medium at 200 rpm. The presence of the *rpoS::Tn10* allele was confirmed by Southern hybridization [23] (Fig. 1). Growth curves were determined by subculturing an overnight culture of the relevant strain into fresh LB medium (1/100 dilution) and growing the culture at 37°C under the same conditions of biofilm assays. OD_{600nm} readings were taken over time using a Beckman DU-65 spectrophotometer.

Biofilm assays were carried out using 96-well, non-tissue culture-treated polyvinyl chloride dishes (Falcon 3911 microtest III flexible assay plates) using the O'Toole and Kolter protocol described previously [21]. Every experiment was performed in triplicate at least three times to confirm the results. Microtiter dishes were covered with a plastic box to prevent evaporation. Quantification of attached cells to the wells was performed as described previously using 1.0% Crystal violet (CV, Sigma) [7,21]. OD_{570nm} was determined using either a Bio-Rad 3550, microplate reader or a Beckman DU-65 spectrophotometer.

In the experiments involving the use of spent medium, an overnight culture of the relevant donor strain in LB medium was set up. Cells were spun down and the spent medium was retained, three additional centrifugation steps at 14 000 × g for 2 min and a 0.2-µm filtration step were carried out before using the media. Absence of cells in the medium was tested by plating 80 µl of the spent media on an LB plate. The use of 0.4- and 0.2-µm disk filters (Millipore) for sterilization of the spent media made no significant difference to the results presented. Receptor cells were washed three times with MgSO₄, 10 mM prior to placing them in contact with the spent medium. The OD_{600nm} of the starting cultures was in all cases 0.1.

2.3. β-Galactosidase assays

β-Galactosidase activity specified by the chromosomal Φ(*rpoS'-lacZ*) translational fusion of strain RO91 (Table 1) was measured as described by Miller [22]. Samples of cultures at different times were harvested and suspended in 2.5–4 ml of Z buffer [22] and stored on ice. β-Galactosidase activity in CHCl₃ and sodium dodecyl sulfate-permeabilized cells was measured by monitoring the hydrolysis of *o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside. Activities are expressed in terms of the OD_{600nm} of cell suspensions by the formula of Miller [18]. Each culture was assayed in triplicate; results were confirmed in at least three independent experiments.

2.4. Purification of chromosomal DNA and Southern hybridizations

Chromosomal DNA from bacterial cells of different strains was purified using the chromosomal DNA purification kit from Promega. Quantification of DNA was carried out spectrophotometrically at 260 nm. Twenty micrograms of DNA were then digested with *Bam*HI for 6 h at 37°C. Digested DNA was run on a 1% agarose TBE 1 × gel, transferred to a Hybond N⁺ membrane (Amersham) by capillary blotting [23] and then hybridized with a PCR-generated 700-bp DNA probe containing 500 bp of the 5' end of *rpoS* and 200 bp upstream from the translational start site (ATG) (Fig. 1). Hybridization was carried out using the ECL direct nucleic acid detection system from Amersham.

3. Results and discussion

3.1. *E. coli rpoS* mutants form higher amounts of biofilm

The formation of biofilm in *E. coli* has been described as a metabolic state where many stresses are present [6]. In order to determine whether or not the global stress regulator RpoS plays a key role in the biofilm formation in *E. coli*, we tested the ability of strain MC4100 and its isogenic *rpoS::Tn10* mutant counterpart (strain JMH0039, Table 1; Fig. 1A,B) to form a biofilm on PVC microtiter dishes following the standard O'Toole and Kolter protocol [21].

As shown in Fig. 1C, strain JMH0039 formed 3–5-fold greater amounts of biofilm than strain MC4100 after 48 h of incubation at 37°C. This was in contrast to a previous report where an *rpoS* mutant was shown to form less biofilm than its wild-type counterpart [19]; however, it is important to note that those experiments were carried out in cells grown in chemostats and the biofilm formation was tested on glass, additionally, the time of biofilm formation was not reported [19]. To try to clarify this phenomenon, and to test if our observations were true for



Table 1
Strains used in this study

Strain	Relevant genotype/properties	Ref. or source
CF1648	MG1655 (prototroph)	[17]
CFG02	CF1648 <i>rpoS</i> ::Tn10 P1(JMH0039)X CF1648	This work
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ <i>lacU169</i> <i>rpsL150</i> <i>relA1</i> <i>fb-5301</i> <i>deoC1</i> <i>pts F25</i>	Michael Casadaban
JMH0039	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10	Laboratory collection
W3110	F ⁻ <i>lam-In(rrnD-rnmE)1</i> <i>rph-1</i>	Genetic Stock Center
WG01	W3110 <i>rpoS</i> ::Tn10 P1(JMH0039)X W3110	This work
R091	MC4100 Φ (<i>rpoS</i> '-' <i>lacZ</i>)	[26]

other *E. coli* strains, we used two additional pairs of strains to test for their ability to form biofilms. The strains W3110 and CF1648, and their *rpoS*::Tn10 corresponding mutants (WG01 and CFG02 respectively, 1; Fig. 1A,B) showed a similar pattern of biofilm formation to that of the MC4100 and JMH0039 strains (their respective *rpoS* mutant produced approximately 3–6-fold more biofilm; data not shown). These results confirmed that, under our experimental conditions, an *rpoS* mutant produces more biofilm after 48 h of incubation than its wild-type counter-

part. It should be noted that Jishague and Ishihama [24] have reported variations in the σ^S subunit of the RNA polymerase in stocks of strain W3110; therefore, we tested several W3110 strains from 10 different laboratory stocks and found that seven of them are indeed *rpoS* mutants due to a deletion event (data not shown). However, the other three were *rpoS*⁺. The functionality of this gene was confirmed by monitoring a Φ (*bolA-lacZ*) fusion [25]. The W3110 strain used in this study was confirmed to be *rpoS*⁺. As expected, W3110 strains carrying an *rpoS* mu-

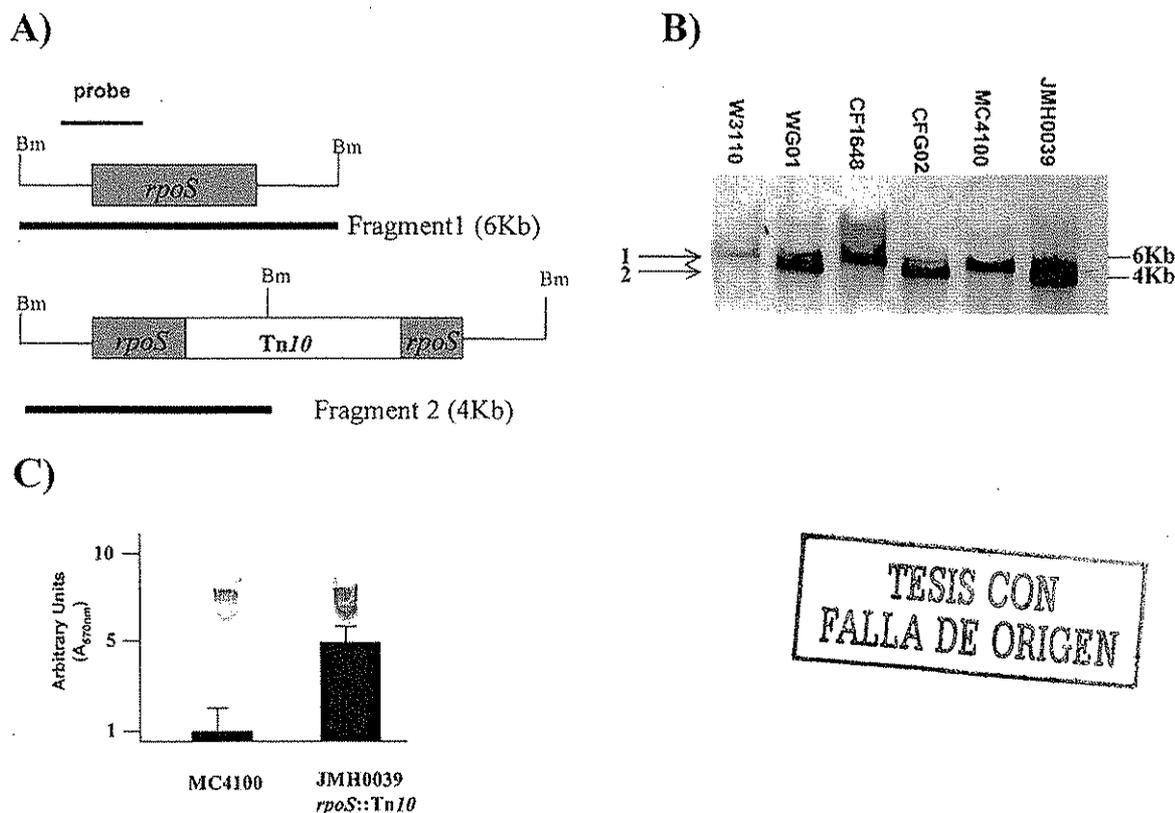
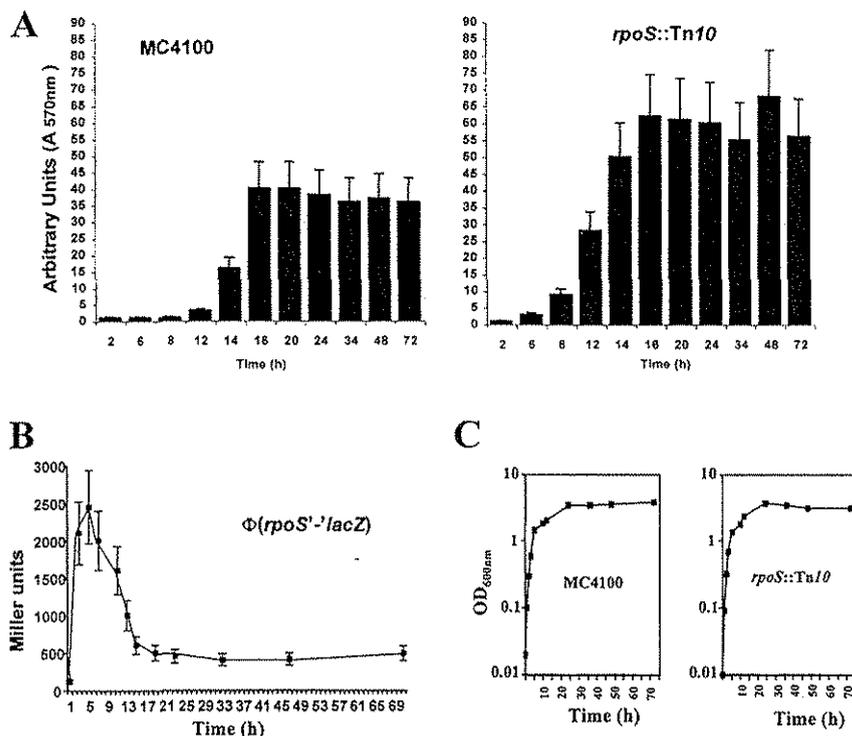


Fig. 1. Construction of *rpoS*::Tn10 mutants and biofilm formation by strains MC4100 and JMH0039 (*rpoS*::Tn10) after 48 h of incubation in LB medium. Chromosomal DNA from different strains and their *rpoS*::Tn10 derivatives was digested with BamHI (Bm), run on a 1% TBE agarose gel and then hybridized with a 700-bp probe containing 500 bp of the 5'-end of RpoS (A, Fragment 1). The presence of a Tn10 element was confirmed by a change in the hybridization pattern (B) indicating an insertion event (A, Fragment 2). Biofilm formation of strain MC4100 and its *rpoS*::Tn10 derivative was quantified by measuring the amount of CV attached to the surface of the PVC wells (C). One arbitrary unit corresponds to the biofilm formed by strain MC4100. The experiments were carried out in triplicate at least three times; the standard deviation (S.D.) is indicated. Wells from a typical experiment are shown.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Bacterial growth, biofilm formation and β -galactosidase activity of a $\Phi(rpoS-lacZ)$ fusion in strain MC4100 throughout the growth cycle. Strains MC4100 and JM0039 (*rpoS::Tn10*) were grown in LB medium. The OD_{600nm} (C) and biofilm formation (A) and the β -galactosidase activity specified by a $\Phi(rpoS-lacZ)$ fusion (B) were determined at the indicated times. In A, one arbitrary unit corresponds to the amount of biofilm formed at 2 h of culture for each separate strain. The experiments were carried out in triplicate at least three times; values of S.D. are represented by error lines.

tation displayed an increased (3–5-fold) formation of biofilm (data not shown).

3.2. An *rpoS* mutant forms biofilm earlier than the wild-type strain

It has been suggested that the main role of RpoS is the regulation of many genes at the onset of the stationary phase of growth [14]; however, growing evidence indicates that RpoS has a broader role in bacterial metabolism and that its regulatory role is not limited to the stationary phase [14,18]. In order to determine if the increased amounts of biofilm seen in an *rpoS* mutant was present only during the stationary phase of growth (48 h of incubation) we tested strains MC4100 and JM0039 for their ability to form biofilm throughout the growth cycle. As shown in Fig. 2, growth curves of both strains were indistinguishable (Fig. 2C).

Strain MC4100 exhibited a significant increase in biofilm formation after 14 h of growth (15 times higher than the amount seen after 2 h of incubation; Fig. 2A). The corresponding OD_{600nm} was 2.5 (Fig. 2C). By contrast, strain JM0039 displayed detectable biofilm formation after 6–8 h of incubation (4–8 times higher than the amount seen after 2 h of incubation; Fig. 2A). The corresponding OD_{600nm} was 0.8–1.0 (Fig. 2C). This suggests that the presence of RpoS could be preventing biofilm

formation during the exponential phase of growth. Negative regulation by RpoS has already been reported [16]. These results were later confirmed using different strains (Table 1). It is important to note that the starting time for biofilm formation differed in the several strains tested. However, in all cases, the *rpoS* mutant strains produced biofilm earlier (and always in the exponential phase of growth) than their parental wild-type strains. Additionally, in all cases *rpoS* mutant strains made more biofilm than their isogenic wild-type parental strain (data not shown). The variability of biofilm formation in different *E. coli* strains has already been reported [8].

In order to study the expression of *rpoS* under the biofilm-forming conditions tested here, we used merodiploid strain RO91 [26] that bears a chromosomal $\Phi(rpoS'-lacZ)$ translational fusion to monitor *rpoS* expression throughout the growth cycle under our experimental conditions. As shown in Fig. 2B, most β -galactosidase activity was observed at the onset of the stationary phase followed by an abrupt decrease. This is in good agreement with previous reports [26]. Taken together, these results suggest that the negative role of RpoS on biofilm formation is more evident during the exponential phase of growth and that other factors are involved in the increase of biofilm formation after 20 h of growth since the expression of *rpoS* is extremely low after this period of incubation (Fig. 2B).

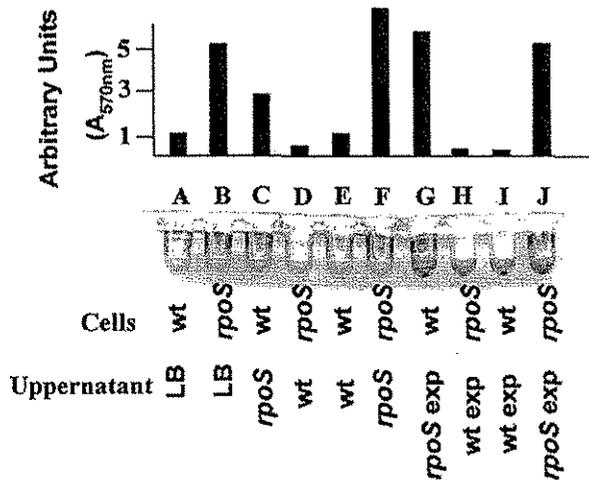


Fig. 3. Biofilm formation of strains MC4100 and JMH0039 growing under different culture conditions. Cells were cultivated with spent media from the indicated cultures. Biofilm formation was determined after 48 h of incubation. In this figure, one arbitrary unit corresponds to the amount of biofilm formed by strain MC4100 in LB medium (A). The experiments were carried out in triplicate at least three times with a variation of less than 20%. Results shown are those of a typical experiment.

3.3. An extracellular factor is produced in the *rpoS* mutant that increases the formation of biofilm in the exponential phase of growth

It is known that biofilm maturation can be regulated by molecular signals (quorum sensing) that regulate gene expression by a number of mechanisms, including modulating the activity of members of the LuxR family, interacting with two-component systems or inhibiting phosphatases [27,28]. In the light of our results, we wondered if the reason for the earlier production of biofilm in the *rpoS* mutants was due to the production of an extracellular factor or molecular signal that could be enhancing the production of biofilm. As shown in Fig. 3, after 48 h of incubation, the total amount of biofilm formed by the MC4100 strain was 5-fold less than that produced by JMH0039 (A and B respectively). When the spent medium from an overnight culture of the MC4100 strain was used, there was a fall in the amount of biofilm formed (compare D and E with A and B); by contrast, when the spent medium from an overnight culture of the JMH0039 strain was used, there was a 3-fold increase in biofilm formation for MC4100 and 1.6-fold for JMH0039 cells (compare C and F with A and B). These results were also tested in the two pairs of strains described in Table 1. In all cases, the spent medium from an overnight culture of the *rpoS* mutant strains increased the amount of biofilm formation (data not shown). Our results strongly suggest that the *rpoS* mutant strains produce an extracellular factor that promotes the formation of biofilm. In order to test whether or not this factor was produced during the exponential phase of growth, we used spent medium from cul-

tures of MC4100 and JMH0039 growing exponentially. As shown in Fig. 3, the spent medium from exponentially growing MC4100 cells showed an inhibitory effect on the formation of biofilm (compare H and I with A and B); strikingly, when the supernatant from JMH0039 cells growing exponentially was used, there was an important increase in biofilm formation (G and J). These results support the idea that an *rpoS* mutant is producing an extracellular factor even during the exponential phase of growth that promotes the formation of biofilm.

3.4. Conclusions

We have shown that an *rpoS* mutant produces higher amounts of biofilm than its wild-type counterpart. This could be due to a cumulative effect since we noted that an *rpoS* mutant starts to produce biofilms earlier in the growth curve. We still do not know the reason or the mechanism for negative regulation of biofilm formation exerted by RpoS during exponential growth; however, we note that RpoS has already been reported to be involved in negative regulatory processes [16]. A clue to the mechanism may be that the increased production of biofilm by the *rpoS* mutant seems to be mediated by an extracellular factor that is produced during the exponential phase of growth in an *rpoS* mutant. Several genes have been identified that are strongly induced by the accumulation of self-produced extracellular signals; interestingly, two of them were dependent on RpoS for growth phase expression and response to extracellular factors [29]. *rpoS* expression is itself stimulated by the presence of a factor in conditioned medium [30,31]. So far, we do not know the identity of the extracellular factor that increases the production of biofilm. Recent studies by Surette and Bassler [32] have revealed that *E. coli* produces a signal that can substitute for AI-2, one of two *Vibrio harveyi* signals that control luminescence gene expression. The *E. coli* signal was heat labile, produced at mid-exponential phase of growth, and degraded at stationary phase. Our results cannot rule out this possibility. In any case, our results suggest that RpoS prevents the production of a factor needed for the formation of biofilm during the exponential phase of growth.

Acknowledgements

This work was supported by Grants J33369-N from CONACyT and IN205200 from PAPIIT UNAM. F.P.C.-I. is a Msc. Scholar from PAPIIT and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. We are grateful to Dr. M.C. Gómez-Eichelmann for critical reading of the manuscript, useful advises and sharing unpublished data. We also thank Miguel Páez-Silva and Marisela Aguirre for technical support and Azucena Solís-Rocha for initial experiments. Special thanks to Drs. R. Kolter,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

M.C. Gómez-Eichelmann and D. Siegele for providing strains used in this work.

References

- [1] Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679.
- [2] Hoyle, B.D. and Costerton, W.J. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37, 91–105.
- [3] Ichimiya, T., Yamasaki, T. and Nasu, M. (1994) In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 34, 331–341.
- [4] Marshall, A.W. (1996) Adhesion to biomaterials. In: *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity* (Fletcher, M., Ed.). John Wiley and Sons, New York.
- [5] Costerton, J.W., Lewadowski, A., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.
- [6] O'Toole, G., Kaplan, H. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- [7] Genevaux, P., Muller, S. and Bauda, P. (1996) A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 27–30.
- [8] Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30, 285–294.
- [9] Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L. and Kolter, R. (2000) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 37, 424–432.
- [10] Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. and Gotz, F. (1996) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* 64, 277–282.
- [11] Muller, E., Hubner, J., Gutiérrez, N., Takeda, S., Goldmann, D.A. and Pier, G.B. (1993) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect. Immun.* 61, 551–558.
- [12] Yildiz, F.H. and Schoolnik, G.K. (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4028–4033.
- [13] Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Gotz, F. and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* 32, 345–356.
- [14] Loewen, P.C., Hu, B., Strutinsky, J. and Sparling, R. (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 44, 707–717.
- [15] Dove, S.L., Smith, S.G. and Dorman, C.J. (1997) Control of *Escherichia coli* type I fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Mol. Gen. Genet.* 254, 13–20.
- [16] Lindqvist, A., Membrillo-Hernández, J., Poole, R.K. and Cook, G.M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K-12 from oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 23–31.
- [17] Xu, J. and Johnson, R.C. (1995) Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodule growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 938–947.
- [18] Hengge-Aronis, R. (1996) Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887–893.
- [19] Adams, J.L. and Mclean, R.C. (1999) Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4285–4287.
- [20] Cochran, W.L., Suh, S.-J., McFeters, G.A. and Stewart, P.S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 546–553.
- [21] O'Toole, G., Pratt, L., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. and Kolter, R. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 91–109.
- [22] Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [23] Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [24] Jishage, M. and Ishihama, A. (1997) Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J. Bacteriol.* 179, 959–963.
- [25] Miksch, G. and Dobrowolski, P. (1995) Growth phase-dependent induction of stationary-phase promoters of *Escherichia coli* in different Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177, 5374–5378.
- [26] Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 49–59.
- [27] Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275.
- [28] Bassler, B.L., Wright, M. and Silverman, M.R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* 13, 273–286.
- [29] Baca-DeLancey, R.R., South, M.M.T., Ding, X. and Rather, P.N. (1999) *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4610–4614.
- [30] Mulvey, M.R., Switala, J., Borys, A. and Lowen, P.C. (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6713–6720.
- [31] Sitnikov, D.M., Schineller, J.B. and Baldwin, T.O. (1996) Autoinducer-independent mutants of the LuxR transcriptional activator exhibit differential effects on the two lux promoters of *Vibrio fischeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 336–341.
- [32] Surette, M.G. and Bassler, B.L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7046–7050.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO V RESULTADOS ADICIONALES

Resultados adicionales no expuestos en los artículos son:

V. I. La formación de biofilm es aparentemente dependiente de la presencia de oxígeno

Dentro de experimentos realizados en el laboratorio, datos interesantes observados como la formación de biofilm en forma de anillo específicamente en la interfase con el oxígeno nos motivaron a realizar una revisión de la literatura sobre biofilms y alguna relación con el oxígeno y nos hicimos la pregunta de si el oxígeno sería indispensable en la formación de biofilm (Figura V. I.).

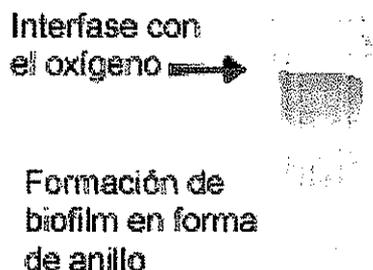


Figura V.I. Formación de biofilm en la interfase con el oxígeno.

La formación de biofilm fue realizada como ya se ha descrito en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Observamos que una cepa de *Escherichia coli* (bacteria facultativa) la cual es capaz de formar biofilm en aerobiosis, no lo puede hacer en anaerobiosis (Figura V. II.). El mismo

experimento fue desarrollado con *Streptococcus mutans* observando el mismo fenómeno. Posiblemente, la formación inicial de biofilm requiera de aerobiosis, o de microorganismos aeróbicos para la formación de biofilm, o una de las moléculas señal involucrada en la formación de biofilm, no puede formarse o conformarse en ausencia de oxígeno.

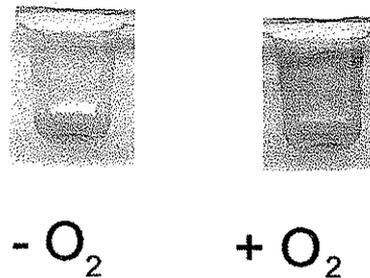


Figura V. II. Formación de biofilm en presencia y ausencia de oxígeno

V. II. La formación de biofilm en presencia de pH ácido aumenta.

Para lo anterior se realizaron experimentos de formación de biofilm, en los que, se utilizaron dos medios de cultivo diferentes: LB, LB MOPS 100mM y LB a pH 5.8. La formación de biofilm se muestra en la Tabla V. I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla V. I. Formación de biofilm en tres diferentes medios de cultivo.

Formación de biofilm en tres diferentes medios de cultivo				
(OD 570)				
Cepa	Medio	LB	LBMOPS	LB pH 5.8
W3110	24h	1.61	3.12	1.95
W3110	48h	1.25	1.43	1.29
W3110 <i>rpoS::Tn10</i>	24h	1.94	3.97	2.92
W3110 <i>rpoS::Tn10</i>	48h	0.88	2.39	1.49

La formación de biofilm en los diferentes medios de cultivo, arrojó resultados interesantes, debido a que la formación de biofilm, fue mayor en el medio LB a pH 5.8, sin embargo, ésta mejora en la formación de biofilm, no fue tanta como la formación de biofilm en LB MOPS. Esto nos permite entre ver que, el pH en sí es un factor importante en la formación de biofilm, sin embargo, no lo es tanto como la adición del MOPS en el medio.

Para tratar de esclarecer la diferencia de pH en los medios de cultivo, se realizaron cultivos a diferentes pH, que fueron desde pH 5 hasta pH 11. Los resultados obtenidos, se exponen en la Tabla V. II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla V. II. Formación de biofilm a diferentes pHs.

		Formación de biofilm a diferentes pHs (OD 570)									
		5	6	6.5	7	7.5	8	9	10	11	
W3110	24h	2.05	3.29	2.49	3.30	2.15	0.95	0.77	0.70	0.66	
W3110	48h	2.22	3.35	4.19	3.31	2.70	2.31	2.77	1.24	1.63	
W3110 <i>rpoS</i> ::Tn10	24h	1.07	3.61	4.77	3.07	3.21	1.65	0.99	1.01	0.89	
W3110 <i>rpoS</i> ::Tn10	48h	2.36	3.34	3.34	2.49	1.82	1.18	2.01	1.00	1.61	

Como se muestra en los resultados de la tabla y el gráfico anexo I. III, la formación de biofilm a pHs ácido y neutro es mayor que a pHs alcalinos, y se continúa el patrón de la mayor formación de biofilm en la cepa mutante *rpoS* que en la silvestre.

Estos datos indican que la formación de biofilm mayor entre los pH 6 - 7.5. Debemos hacer mención de que hay una pequeña recuperación de biofilm a pH alcalino 11, principalmente a las 48 horas, esto nos indica, que las células probablemente se han adaptado y ya en fase estacionaria franca, forman más biofilm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

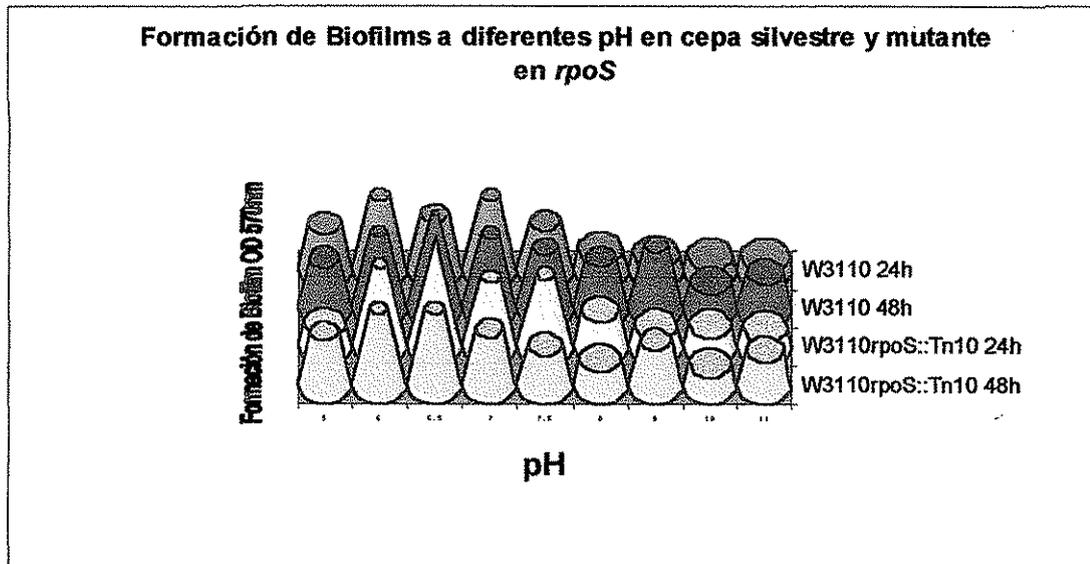


Figura V. III. Gráfica de formación de biofilm a diferentes pHs en la cepa silvestre y mutante en *rpoS*.

V. III. Diferencias en los patrones proteicos de la cepa silvestre y la mutante *rpoS*.

Como era de esperarse, mediante SDS-PAGE, se puso de manifiesto la diferencia en el patrón de proteínas, destacando una diferencia importante, en la cepa silvestre, fue localizada una banda más de formación de proteína en fase estacionaria, muy probablemente ésta proteína se encuentra relacionada con la presencia del gen *rpoS* en la cepa silvestre o inclusive es la propia sigma S.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

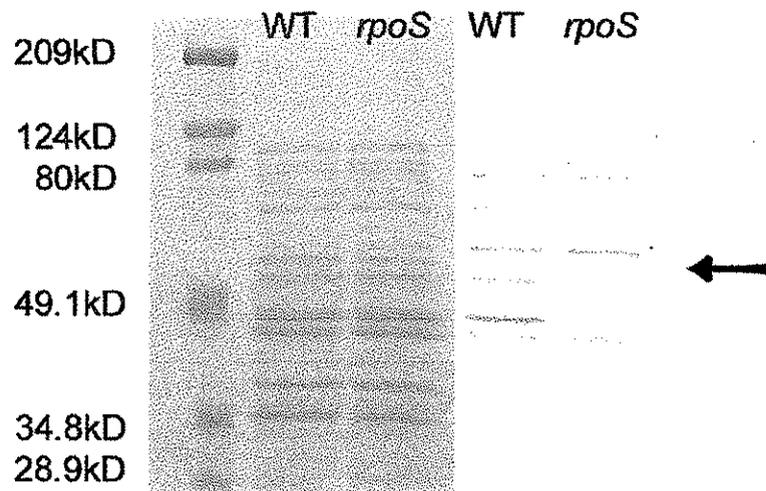


Figura V. IV. Formación de proteína en cepa silvestre y mutante *rpoS* en fase estacionaria.

De izquierda a derecha, en el primer carril el marcador de peso molecular, el segundo y tercer carril son SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie con la cepa silvestre y mutante *rpoS* respectivamente, los carriles cuarto y quinto, son los marcajes de proteína con metionina realizados en fase estacionaria con la sepa silvestre y mutata *rpoS* respectivamente.

De la banda que se observa entre los 49.1 y 80kD, es importante resaltar, que es proteína neoformada a las 24horas de crecimiento celular, cuando la densidad celular se encontraba a 4.1 OD_{600nm} . Mientras que en el SDS-PAGE, se encuentra una acumulación de proteína a lo largo de la vida del cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO VI AMPLIACIÓN DE LA DISCUSIÓN

La formación de biofilm parece ser dependiente de la disponibilidad de oxígeno, por alguna razón, dentro de las posibles hipótesis se encuentran el que uno de los factores determinantes (o inclusive algún intermediario) de la formación de biofilm no se pueda sintetizar, sea poco estable en ausencia de oxígeno o inclusive, que el doblamiento de una proteína no sea el óptimo. Como ejemplo de fenómenos de simbiosis entre bacterias que forman biofilm en relación al oxígeno, Bradshaw *et al.* (1997), encontró que hay bacterias anaerobias estrictas capaces de formar biofilm en cultivos mixtos, siempre y cuando interactúen con cepas aerobias facultativas, lo cual ha sido también discutido por Wimpenny (1994), donde la convivencia de este tipo con otras bacterias, existe tanto en vida libre como adheridas a una superficie. Pero, ésta respuesta es dependiente de la presencia de especies facultativas en el medio. Esto nos da a pensar en que las relaciones metabólicas que puedan establecer los microorganismos en un microambiente, son determinantes en su presentación fisiológica.

El aumento en la formación de biofilm bajo condiciones de acidez, en un análisis preliminar, se puede observar que la formación de biofilm tanto a las 24h como a las 72h es mayor en el medio de cultivo LB a pH 5.8 (medio acidificado) que en el LB a pH 7 (medio neutro).

Independientemente de éste fenómeno, la formación de biofilm no es mayor en el medio acidificado que en el LB MOPS 100mM (medio amortiguado). La acidez del medio a modo de estrés independiente promueve la mayor formación de biofilm bajo éstas condiciones, mas sin embargo el amortiguamiento del medio podría ser un factor que permita la estabilidad – bajo cierto rango de pH- de alguna molécula no identificada la cual pudiera ser determinante para la formación de biofilm.

La formación de biofilm bajo diferentes condiciones de acidez o alcalinidad en *Escherichia coli*, permiten determinar que la formación de biofilm es mejor bajo pH 6 – 7.5, mientras que se encuentra muy disminuida la formación, cuando el pH aumenta a más de 8 ó disminuye a 5. Loo *et al.* (2000) realizaron experimentos similares buscando los diferentes fenotipos de formación de biofilm en *Streptococcus gordonii*, encontrando datos similares.

Los extremos de pH en el medio por lo regular no son compatibles con el crecimiento bacteriano (al menos bajo condiciones in vitro y en cultivos puros), sin embargo, dentro de un biofilm, el rango de distintos pH es muy interesante, (Vroom *et al.* 1999), utilizando microscopía fotónica, pudieron observar que existen gradientes de pH en un mismo biofilm a cortas distancias. Incluso, las bacterias pueden regular (hasta cierto punto) el pH local, mediante la regulación de genes que se encuentran involucrados en la producción de ácidos o de bases.

En la actualidad el concepto de comunidad bacteriana ha salido a la luz a partir del estudio de los biofilms, entendiendo a las bacterias en función a sus hábitat y de las buenas o malas relaciones que tengan con sus vecinos. El entender que una comunidad eficaz se logra mediante la unión entre los individuos que la forman, y que esto no es exclusivo del género humano, nos permite abrir nuevas formas de estudiar y comprender los fenómenos que se desarrollan en la naturaleza. Sin duda la fisiología de la formación de biofilm es uno de los temas más apasionantes e importantes de actualidad, si el ser humano es capaz de dilucidar los recovecos que incluyen los reguladores y principales participantes en la formación, maduración y disgregación de biofilms, podrá solucionar muchos de los problemas que implica la formación de biofilms, así como mejorar los beneficios que conlleva a los sistemas de biorremediación la formación de ciertos biofilms.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, J. L. & McLean, R. J. (1999). Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4285-4287.

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.

Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R. & Siegele, D. A. (2001). Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* **183**, 2178-2186.

Baca-DeLancey, R. R., South, M. M. T., Ding, X. & Rather, P. N. (1999). *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4610-4614.

Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R. & Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Mol Microbiol* **39**, 1069-1079.

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**, 582-587.

Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Allison C. & Schilling K. M. (1996). Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. *Microbiology* **142**, 623-629.

Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. & Allison C. (1997). Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. *Lett Appl Microbiol* **25**, 385-387.

Burne, R. A., Chen, Y-Y. M. & Penders, J. E. C. (1997). Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. *Adv Dent Res* **11**, 100-109.

Busscher, H. J. & van der Mei, H. C. (1997). Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* **11**, 24-32.

Cisar, J. O., Takahashi, Y., Ruhi, S., Donkersloot, J. A. & Sandberg, A. L. (1997). Specific inhibitors of bacterial adhesion: observations from the study of gram-positive bacteria that initiate biofilm formation on the tooth surface. *Adv Dent Res* **11**, 168-175.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **248**, 1318-1322.

- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**, 2888-2896.
- Danese, P., Pratt, L. A. & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**, 3593-3596.
- Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* **2000** **14**, 12-32.
- Davey, M. E. & O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847-867.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**, 73-91.
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. & Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* **43**, 1131-1138.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193
- Federle, M. J., McIver, K. S. & Scott, J. R. (1999). A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A Streptococcus. *J Bacteriol* **181**, 3649-3657.
- Fuqua, C., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.
- Genevaux, P., Muller, S. & Bauda, P. (1996). A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 27-30.
- Ghigo, J-M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445.
- Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**, 160-167.
- González, F. & Cameros, F. (1993) Microbiología bucal. 2a edición *Mendez Editores*.
- Hasstings, J. W. & Nealson, K. H. (1977). Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* **31**, 549-595.

Håvrestein, L. S., Hakenbeck, R. & Gaustad, P. (1997). Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol* **179**, 229-240.

Heydorn, A., Ersbøll, B. K., Hentzer, M., Parsek, M. R., Givskov, M. & Molin, S. (2000). Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* **146**, 2409-2415.

Hyde, J. A., Darouiche, R. O & Costerton, J. W. (1998). Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *J Heart Valve Dis* **7**, 313-315.

Jackson, D., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J., Hart, M. & Romeo, T (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 290-301.

Kaprelyants, A. S. & Kell, D. B. (1996). Do bacteria need to communicate with each other for growth?. *J Bacteriol* **4**, 237-242.

Keevil, A. W. & Walker, J. T. (1992). Normarski DIC microscopy and image analysis of biofilms. *Binary* **4**, 93-95.

Khatib, R. & Pozios, V. (1995). Recurrent *Streptococcus pyogenes* pharyngitis due to an inadequately cleaned orthodontic appliance. *Clin Infect Dis* **21**, 230.

Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**, 895-904.

Kolenbrander, P. E. (2000). Oral Microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 413-437.

Kolter, R. & Losick, R. (1999). One for all and all for one. *Science* **280**, 226-227.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Gen Dev* **8**, 1600-1612.

Li, Y. & Burne, R. A. (2001). Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology* **147**, 2841-2848.

Li, Y-H., Hanna, M. N., Svensäter, G., Ellen, R. P. & Cvitkovitch D. G. (2001). Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: Implications for survival in biofilms. *J Bacteriol* **183**, 6875-6884.

Li, Y-H., Lau, P. C. Y., Lee, J. H., Ellen, R. P. & Cvitkovitch, D. G. (2000). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* **183**, 897-908.

Liébana, U. (1996). Microbiología oral. 1a edición *McGraw Hill*.

Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G., Reilly, B. E., Bernards, C. J., Townsend, D. W., Pennock, A. T. & LeMoine, J. L. (1997). Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res* 11, 14-23.

Loo, C. Y., Coorliss, D. A. & Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol* 182, 1374-1382

Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Annal Biochem* 87, 206-210.

Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1997). Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res* 11, 176-185.

Miller, B. M. & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-199.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* Cold Spring Harbor, New York.

Moreau, P. L., Gérard, F., Lutz, N. W & Cozzone, P. (2001). Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Mol Microbiol* 34, 1048-1060.

Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, R. N. & Schellhorn, H. E. (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol* 37, 371-381.

Murray. (1995). Manual of clinical Microbiology. 6a edición. *ASM Press*.

Nyholm, S. V. & McFall-Ngai, M. J. (1998). Sampling the light-organ microenvironment of *Euprymna scolopes*: description of a population of host cells in association with the bacteria symbiont *Vibrio fischeri*. *Biol Bull* 195, 89-97.

Nyvad, B. & Fejerskov, O. (1997). Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Commun Dent Oral Epidem* 25, 69-75.

Oosthuizen, M. C., Steyn, B., Lindsay, D., Brözel, V. S. & von Holy, A. (2001). Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 94, 47-51.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.

- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weave, V. B. & Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study biofilms. *Meth Enzymol* 310, 91-109.
- Passerini, L., Lam, K., Costerton, J. W. & King, E. G. (1992). Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med* 20, 665-673.
- Perrone, M. C. (1997). Placa dental y microbiología de la caries dental, En *Cariología*, editado por: Seif, T. S. Actualizados Médico Odontológicos latinoamérica.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30, 285-293.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* 2, 598-603
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Thuy, L. T. T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 4, 450-464.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M. & Ziebuhr, W. (2000). Alternative transcription Factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* 182, 6824-6826.
- Repoila, R. & Gottesman, S., (2001). Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol* 183, 4012-4023.
- Schauder, S. & Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Gen Dev* 15, 1468-1480.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41, 463-476.
- Schupbach, P., Osterwalder, V. & Guggenheim, B. (1995). Human root caries: Microbiota in Plaque Covering sound, Carious and Arrested Carious Root Surfaces. *Caries Res* 61, 9-19.
- Sissons, C. H. (1997). Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 11, 110-126.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138.

Ueguchi, C., Misonou, N. & Mizuno, T. (2001). Negative control of *rpoS* expression by phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 520-527.

Vroom, J. M., de Grauw, K. J., Gerritsen, H. C., Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K., Allison, C. & Birmingham, J. J. (1999). Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms using two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3502-3511.

Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-2679.

Whiteley, M., Bangera, G. M., Bumgarrer, R. E., Parsek, M. R., Teifzel, G. M., Lory, R. & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-864.

Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol rev* **24**, 661-671.

Wimpenny, J. (1994) The spatial organization of biofilm. In *Bacterial Biofilms and their controls in medicine and industry* ed. Wimpenny, J., Nichols, W., Stickler, B. and Lappin-Scott, H. 1-6 Cardiff: Bioline.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M. & Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**, 6401-6411.

Xie, H., Cook, G., Costerton, W., Bruce, G., Rose, T. & Lamont, R. (2000) Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* **182**, 7067-7069.

Zhu, M., Takenaka, S., Sato, M. & Hoshino, E. (2001). Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **16**, 24-27.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de modo muy especial a mi tutor y a todo el equipo de trabajo del laboratorio: Elizabeth Hernández, Miguel Angel Esparza, Greta Cornejo, Marcela Méndez, Maritrini Colón, Georgina Medina, Silvia Carreño, Azucena Solís, Sr. Miguel Páez-Silva, Alicia Baltazar-Milian, Dolores Aguayo, Marisela Aguirre-Ramírez por todas las alegrías y momentos geniales que pasamos juntos así como por todo el tiempo que emplearon en escucharme y siempre brindarme un comentario constructivo sobre el tema de investigación.

Agradezco infinitamente a la Dra. Martha Contreras Zentella, por toda la paciencia y el tiempo que empleó en enseñarme, comprender y muchas veces tolerar mi ignorancia, así como la orientación, el ejemplo y el cariño que ha dejado dentro de mí y que es invaluable (ahora sé que debo ser disciplinada y no necesariamente ordenada ¡Gracias!).

A los miembros del jurado el tiempo que destinaron a la revisión de mi tesis y por todas sus observaciones: Dr. Raúl Mancilla, Dr. Higinio Arzate, Dr. Jorge Membrillo, Dra. Elba Leyva y Mtra. Beatriz Aldape.

A la coordinadora del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Odontológicas: Dra. Claudia de León Torres, por todo el tiempo destinado a los procesos de titulación así como todo su apoyo durante la realización de mi maestría.

En forma especial agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Odontología con su División de Estudios de Posgrado e Investigación y al Instituto de Investigaciones Biomédicas con sus directores el Mtro. José Antonio Vela Capdevila, el Dr. Fernando Ángeles y el Dr. Juan Pedro Laclette respectivamente, por haberme recibido dentro de sus instalaciones y permitirme realizar el trabajo de investigación que en ésta tesis presento.

Un reconocimiento muy especial al Dr. Rigoberto Martínez Benavides por los buenos consejos, por enseñarme a tener paciencia y a tomar las cosas con un poco más de filosofía; por su incansable trabajo por la docencia médica y por el reconocimiento de nuestro posgrado en CONACYT.

Agradezco también al Dr. Luis Felipe Abreu Hernández coordinador del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud por el tiempo que siempre tuvo disponible para atender a los alumnos del programa

Un agradecimiento especial a la Dirección de Estudios de Posgrado por la beca que me otorgaron durante el último año de la maestría, al proyecto IN205200 de DGAPA-PAPIIT y al J33369-N de CONACyT por sustentar económicamente el proyecto de investigación.

A la Dra. Carmen Gómez-Eichelmann, Dr. Roberto Kolter, Dra. Deborah Siegle, Dra. Laura Camarena, Dr. Fernando Bastarrachea, Dr. Erick Zinser por su apoyo con material biológico.

A toda la comunidad del Instituto de Investigaciones Biomédicas por comprender las locuras que realizaba en los pasillos, al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, a la Dra. Carmen Gómez Eichelmann, al Dr. Luis Servín, al Dr. Luis Padilla, a la Dra. Laura Camarena, al Dr. Alfonso León, al Dr. Roberto Hernández por todo su apoyo y ayuda incondicional.

Por supuesto a todas las personas que me permitieron distraerme un poco de mis actividades, a todos los compañeros del Coro de la Facultad de Odontología, del Coro de Maestros del Colegio Alemán y a su director: Marco Ugalde

Al claustro de profesores de la Facultad de Odontología, que sin ellos y su apoyo dentro de la investigación Odontológica nada de esto sería posible y principalmente al QFB Fernando Franco Martínez por todas sus enseñanzas, consejos, observaciones y en especial gracias por todo el cariño que ha dejado dentro de mí.

A **TODA** mi familia por el apoyo durante tantos y tantos años de estudio.

A Papix, Mamix, Manix, Mallardix y Megatavix, por todas las traspasadas que les he hecho pasar, ser mi paño de lágrimas y apoyo durante tantos, tantos años sin ustedes éste librito no estaría aquí.

A todos mis pacientes que en verdad han sabido ser pacientes durante la realización de mi maestría y que siempre me tuvieron preocupada sobre su salud dental.

Y al pueblo de México por sustentar económicamente mi beca y los recursos de la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el pago de impuestos.