

## Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir

Multi-species biofilms: association to survive

Abraham Loera Muro,<sup>1</sup> Flor Yazmín Ramírez Castillo,<sup>2</sup> Francisco Javier Avelar González,<sup>3</sup>  
Alma Lilián Guerrero Barrera<sup>4</sup>

Revisión Científica

Loera Muro, A.; Ramírez Castillo, F. Y.; Avelar González, F. J.; Guerrero Barrera, A. L., Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. 54, 49-56, 2012.

### RESUMEN

Las biopelículas son una estrategia de supervivencia para los microorganismos que les permite la colonización de ambientes hostiles, tejidos del hospedero o superficies inertes, aún en condiciones cambiantes y para las bacterias patógenas representan un mecanismo de dispersión de infecciones. Debido a lo anterior, el estudio de las biopelículas permite comprender nuevas formas de colonización, resistencia a antibióticos, transferencia horizontal de genes, entre otros mecanismos compartidos por los microorganismos que las conforman. Así, el propósito de la presente revisión es brindar un conocimiento general de estas comunidades, resaltando su importancia en el ambiente y las interacciones entre las especies que participan en su formación.

**Palabras clave:** biopelículas multi-especie, ciclo celular, matriz extracelular, resistencia antimicrobiana, quorum sensing, FISH.

**Key words:** multi-species biofilms, cell cycle, extracellular matrix, antimicrobial resistance, quorum sensing, FISH.

Recibido: 24 de Noviembre de 2011, aceptado: 25 de Enero de 2012

<sup>1</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, aloeramuro@yahoo.com.

<sup>2</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, florecilla\_aaajf@hotmail.com.

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, fjavelar@correo.uaa.mx.

<sup>4</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, alguerre@correo.uaa.mx.

### ABSTRACT

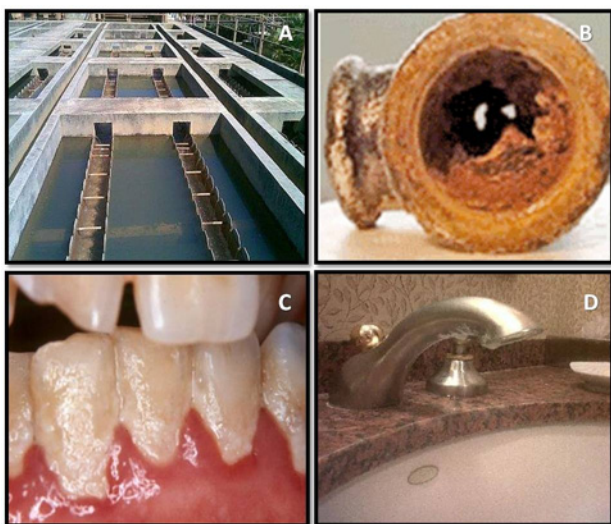
Biofilms are an ancient survival microorganism strategy that allows the colonization of hostile environments, host tissues or inert surfaces, even under changing conditions. For pathogenic this represents, a dispersal mechanism of infections. Therefore, the study of biofilms is important to understand new colonization strategies, antibiotic resistance, and horizontal gene transfer, among other mechanisms shared by microorganisms at the consortia. The purpose of this review is to provide a general understanding of these communities, highlighting their importance in the environment and interactions among species that form them.

### INTRODUCCIÓN

La formación de biopelículas es reconocida como una estrategia de supervivencia microbiana en diferentes ambientes que brinda resistencia a la desinfección, estrés ambiental y condiciones hostiles en microambientes adversos dentro de los tejidos del hospedero (Pereira *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011).

Las biopelículas son complejas comunidades tridimensionales de microorganismos embebidos en una matriz extracelular (MEC), en las cuales despliegan fenotipos únicos o característicos de adaptación especiales, comparados con la forma de vida libre de estos microorganismos, también conocida como planctónica (Ganguly y Mitchell, 2011; Trappetti *et al.*, 2011). En la naturaleza, las biopelículas multi-especie representan

el estilo de vida bacteriano preferido (Yang *et al.*, 2011). Su formación es dirigida por un conjunto de respuestas moduladas por la percepción de señales ambientales a través de sistemas específicos, entre los que se encuentra el *quorum sensing* (QS), que les permiten sobrevivir aún en ambientes extremadamente adversos para el desarrollo de su vida planctónica (Bordi y Bentzmann, 2011).



**Figura 1.** Presencia de biopelículas en la vida cotidiana. A) Se muestra su presencia en los sistemas de tratamiento de aguas residuales; B) en las redes de distribución de agua; C) en la placa dental; y D) en el baño de nuestra casa.

En nuestra vida cotidiana, las biopelículas están presentes en objetos comunes como los cepillos dentales en uso, los aires acondicionados, el sarro del cuarto de baño (Nazar, 2007) y en los muebles de cocina, así como en las tuberías de las redes de distribución de agua potable y de drenaje. También las podemos encontrar ocasionando problemas de salud importantes asociados con implantes, catéteres, sondas y otro tipo de materiales empleados de rutina en los hospitales (Yang *et al.*, 2011). Por otra parte, las biopelículas pueden ser aliados de gran utilidad como agentes de biorremediación en el tratamiento de aguas residuales y lodos activados y, en algunos casos, sirven como bioindicadores de la calidad del agua natural y en las redes de distribución (Almeida *et al.*, 2011) (figura 1).

Por lo anterior, el propósito de la presente revisión es introducir a los lectores en el estudio y comprensión de las biopelículas bacterianas,

enfaticando la importancia de las comunidades multi-especie en el ambiente.

### **Consortio microbiano: una ventaja contra el ambiente**

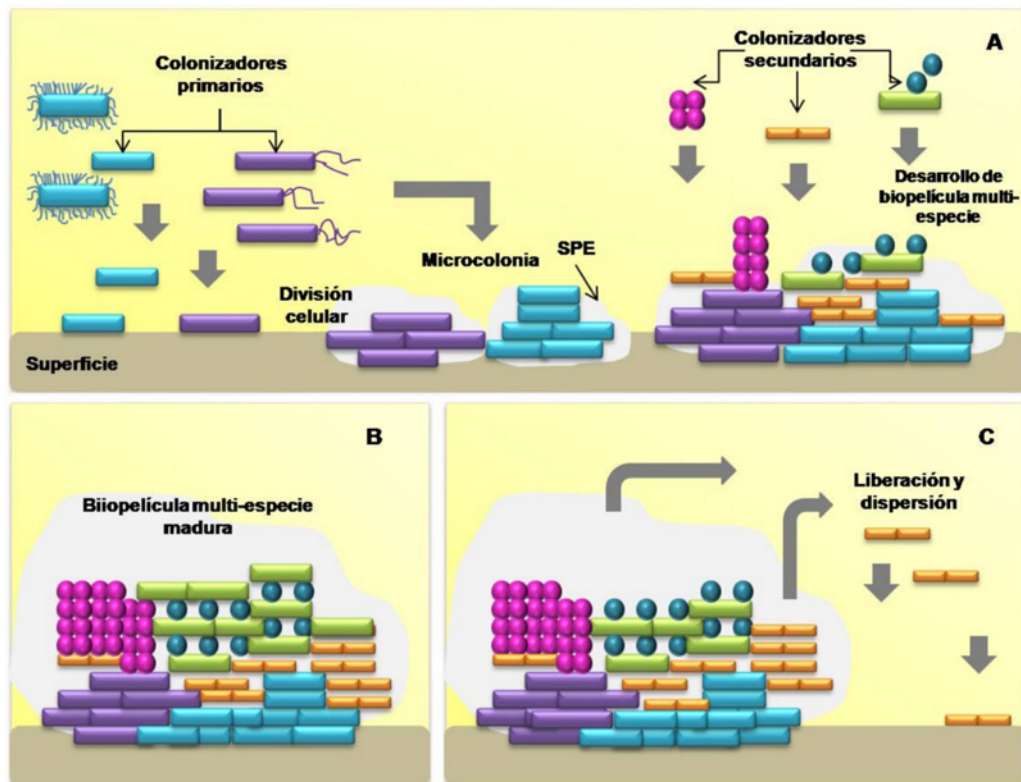
De manera natural, el crecimiento dominante de los microorganismos es a través de consorcios de múltiples especies, regulados por gran variedad de interacciones intra e inter-específicas importantes en su desarrollo, composición, estructura y función (Bowen y Koo, 2011; Høiby *et al.*, 2011). Al mantener microambientes selectivos, la población no depende de la multiplicación rápida, sino aumenta la oportunidad de interacciones mono y multi-específicas; se incrementa la probabilidad de la transferencia horizontal de genes, como genes de virulencia, resistencia a antibióticos y resistencia a drogas (Bordi y Bentzmann, 2011).

Las especies que conforman una biopelícula multi-especie viven en un tipo particular de simbiosis, que ha sido denominado *sociomicrobiología*. Funcionan como un comunidad activa, coordinada con múltiples influencias sinérgicas o antagónicas entre sus integrantes, con reglas propias de "comportamiento" que permiten el éxito del consorcio (Bordi y Bentzmann, 2011; Høiby *et al.*, 2011). En estas comunidades se favorece el crecimiento, reproducción, estabilidad estructural, difusión de sustancias y reserva de energía (Bowen y Koo, 2011). Adicionalmente, la biopelícula permite la resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental, como falta de alimento, presencia de metales pesados, luz UV, desecación, agentes bactericidas y bacteriostáticos, diferencias de temperatura y de pH, amén de resistencia a fagocitosis, anticuerpos y otras defensas de los hospederos. Finalmente, la formación del consorcio puede verse correlacionada con una mayor resistencia a agentes antimicrobianos en infecciones en animales y/o humanos (Pereira *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011).

### **Desarrollo de biopelículas**

Las interacciones inter e intra-específicas guían la formación de una biopelícula multi-especie (Yang *et al.*, 2011) (figura 2). La etapa inicial en la formación es la adherencia sobre una superficie inerte o viva, la cual se inicia con la coagregación.

El fenómeno de coagregación actúa como estrategia para la adhesión entre bacterias asociadas, pero genéticamente distintas. Es mediada por interacciones fisicoquímicas y moléculas

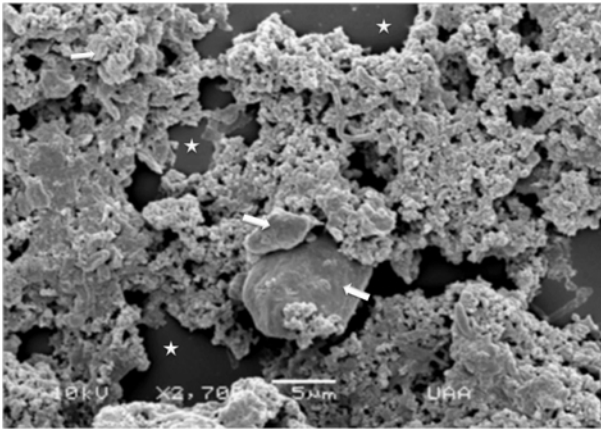


**Figura 2.** Formación de una biopelícula multi-especie. (A) Los colonizadores primarios cubren una superficie (viva o inerte), a manera de una biopelícula, multiplicándose y formando microcolonias, lo anterior permite la llegada de los colonizadores secundarios y su adhesión a las biopelículas; (B) maduración y formación de la biopelícula multi-especie, caracterizado por el incremento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE); (C) promoción de la dispersión de células y cambio de células planctónica a células en biopelícula. Adaptado de Rickard *et al.* (2003).

llamadas adhesinas, que permiten la agregación secuencial y sucesiva de diferentes microorganismos a una superficie (Rickard *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011). Al inicio del proceso se adhieren los colonizadores primarios y tempranos a la superficie, éstos se multiplican formando microcolonias que, finalmente, conforme con las condiciones microambientales, cubren totalmente la superficie colonizada, facilitando la llegada de los colonizadores tardíos o secundarios induciendo el desarrollo de los consorcios multi-especie (Bowen y Koo, 2011) (figura 2). El siguiente paso para el desarrollo de la biopelícula es la unión irreversible a la superficie y la multiplicación de las bacterias, seguida por el incremento de la producción de sustancias poliméricas extracelulares que refuerzan la adhesión celular y actúan como un "cemento intercelular" (Rickard *et al.*, 2003). El estadio siguiente involucra la liberación de células bacterianas que pueden propagarse hacia otros espacios, permitiendo la formación de nue-

vas biopelículas. La liberación puede deberse a sustancias secretadas por las bacterias (lietas de alginato, DNAsas, etc.), por la actividad de bacteriófagos dentro de la biopelícula, o bien, por mecanismos físicos (Loera *et al.*, 2008).

La formación de la matriz extracelular es clave para la biopelícula. La MEC está constituida por exopolisacáridos sintetizados por los microorganismos integrantes de la biopelícula, macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y otros productos procedentes de la lisis bacteriana, que en conjunto se denominan sustancias poliméricas extracelulares (SPE). El ADN extracelular ayuda a la adhesión microbiana y aumenta la versatilidad genética del consorcio (Trappetti *et al.*, 2011). La arquitectura de la matriz no es sólida. Las bacterias en biopelículas viven en torreones celulares [figura 3] que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas (Loera *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Microscopía electrónica de una biopelícula encontrada en agua, pues se observan los torrones celulares en forma tridimensional donde viven las bacterias. Las flechas indican bacterias inmersionadas en matriz extracelular formando los torrones y las estrellas la superficie.

### Interacciones en biopelículas multi-especie

La comunidad bacteriana constituye una sociedad microbiana multi-especie, con "reglas y patrones de comportamiento" propios (Bordi y Betzmann, 2011); con interacciones estables múltiples entre especies, que regulan la función de la comunidad microbiana (Hansen *et al.*, 2007). Además, las biopelículas presentan interacciones de competencia por nutrientes (Rendueles *et al.*, 2011) e inhibición del crecimiento de otras especies por secreción de sustancias tóxicas (Yang *et al.*, 2011) (tabla 1). *Escherichia coli*, por ejemplo, secreta polímeros durante la formación de su biopelícula que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de otras bacterias Gram positivas, pero no así a bacterias Gram negativas (Rendueles *et al.*, 2011).

### Comunicación inter e intra-específica en las biopelículas multi-especie

De manera análoga a lo que sucede en la comunicación celular de las células eucariotas que

forman tejidos, en las biopelículas moléculas señal pequeñas controlan la expresión de genes involucrados en una gran variedad de funciones y vías metabólicas, tanto entre los miembros de una misma especie como entre especies diferentes: producción de factores de virulencia, biosurfactantes, producción de SPE y movilidad bacteriana (Yang *et al.*, 2011).

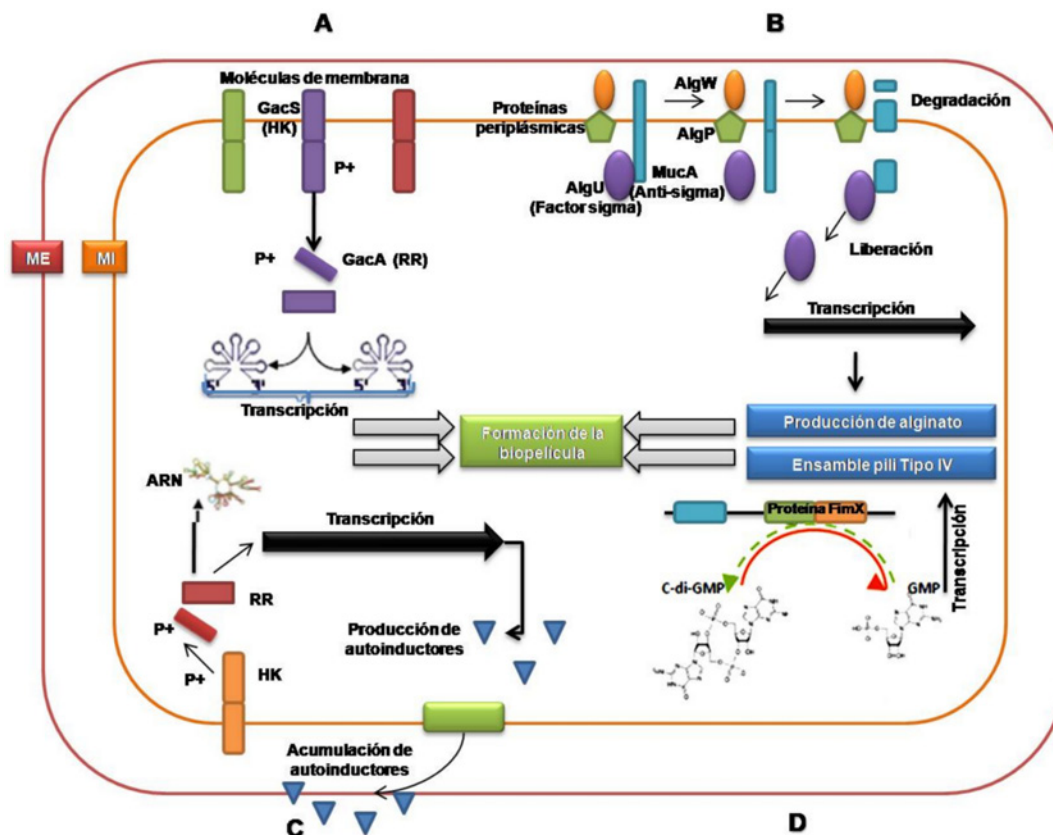
Distintas vías de regulación complejas integran señales ambientales a través de las cuales se disparan respuestas adecuadas (figura 4), entre estas vías se encuentran: los sistemas de dos componentes (TCS: por sus siglas en inglés "two-component systems") (figura 4A), las rutas de señalización de función extracitoplásmica (ECF: por sus siglas en inglés "extracytoplasmic function") (figura 4B), los sistemas QS (figura 4C) y otras moléculas, donde se incluye al c-di-GMP (figura 4D) como segundo mensajero procarionte (Bordi y Betzmann, 2011). Los TCS y el ECF son los principales mecanismos empleados por las bacterias para monitorear el medio externo e interno. Se monitorean nutrientes, iones, temperatura, estado REDOX, entre otros y se reacciona con respuestas adaptativas (Bordi y Betzmann, 2011).

El sistema de respuesta multicelular o QS coordina la expresión de genes necesarios para la formación de la biopelícula y detecta la densidad del consorcio (figura 4C), comprende el proceso de comunicación bacteriana que utiliza pequeñas moléculas denominadas autoinductoras o feromonas, que median un gran rango de comunicaciones intra e inter-específicas determinando así la densidad de la población (Bordi y Betzmann, 2011; Yang *et al.*, 2011). Por ejemplo, en *S. aureus*, la transición entre células planctónicas y la formación de biopelículas es predominantemente controlada por el sistema QS (Bordi y Betzmann, 2011).

**Tabla 1.** Interacciones relevantes en comunidades microbianas en diversos ambientes

Tipo de interacción	Bacteria
Antagonismo	Bacterias marinas epifíticas; bacterias entéricas.
Comensalismo	<i>Acinetobacter spp/Pseudomonas putida</i> .
Competencia	<i>Klebsiella oxytoca/Burkholderia</i> .
Mutualismo	Bacterias de suelo; bacterias orales; bacterias marinas epifíticas.
Neutralismo	<i>Candida sp; Schizosaccharomyces spp; Saccharomyces spp</i> .
Sinergismo	<i>Microbacterium phyllosphaerae; Shewanella japónica; Dokdonia donghaensis</i> .

Fuente: Simões *et al.* (2007).



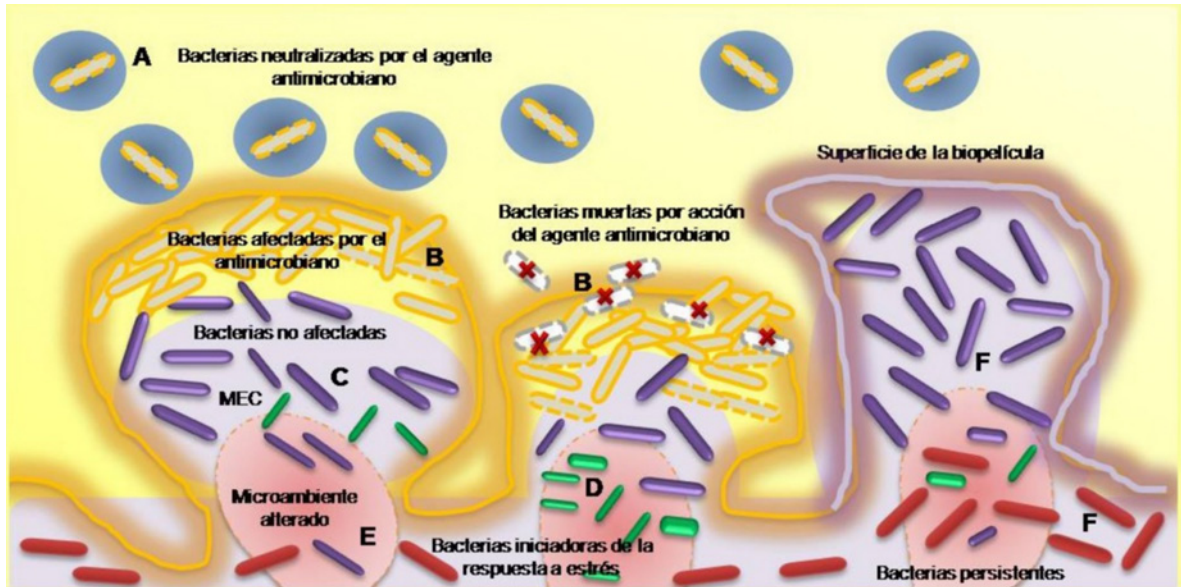
**Figura 4.** Vías de regulación que controlan la transición entre bacterias planctónicas y la formación de biopelículas. Las líneas representan la envoltura celular: la membrana externa (ME) es la línea púrpura y la membrana interna (MI) es la línea naranja. Se representan los mecanismos presentes en las bacterias Gram positivas (C) y Gram negativas (A, B y D). A) Formación de la biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la vía TCS, incluye una proteína sensor histidina cinasa (HK) y una proteína reguladora de la respuesta (RR) [GacS(HK)/GacA(RR)]. B) Control de la producción de sustancias poliméricas extracelulares de alginato en *P. aeruginosa* vía ECF, en la que interviene el factor regulador de la transcripción sigma AlgU – anti-sigma MucA – AlgP (MI) – AlgW (periplásmica). C) Control de la formación de biopelículas en *Staphylococcus aureus* a través de la vía QS. D) Control de la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa* a través de la vía de segundos mensajeros c-di-GMP. Fuente: Bordi y Betzmann (2011).

Finalmente, la vía de señalización mediante el segundo mensajero c-di-GMP (figura 4D), se relaciona con la estimulación de la formación de biopelículas vía la producción de organelos de adhesión, síntesis de SPE y el decremento de la movilidad de las células, que se asocia a su vez, a niveles elevados de c-di-GMP (Bordi y Betzmann, 2011).

#### Resistencia antimicrobiana y su relación con la formación de biopelículas

Las infecciones persistentes constituyen un problema mundial para el ser humano (Chen y Wen, 2011). Se estima que 65% de las infecciones bacterianas involucra la formación de biopelículas y que causan infecciones crónicas (Chen y Wen, 2011), entre otras (Rayner *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2003; Ciofu *et al.*, 2005; Mazzoli, 2010; Chen

y Wen, 2011). Como se expuso, la formación de biopelículas es una estrategia microbiana común empleada por las bacterias patógenas para aumentar la resistencia a antibióticos y al sistema inmune del hospedero, haciendo uso de bombas de eflujo, adquisición de nuevas enzimas y mutaciones de drogas blanco y, por supuesto, de la MEC, que funciona como una barrera protectora ante la entrada de agentes antimicrobianos (Chen y Wen, 2011; Bordi y Bentzmann, 2011) (figura 5). Algunas interacciones en las biopelículas multi-especie promueven la resistencia a agentes antimicrobianos. Por ejemplo, *Candida albicans* induce la resistencia de *S. aureus* a vancomicina durante la formación de biopelículas (Harriott y Noverr, 2010).



**Figura 5.** Resistencia a agentes antimicrobianos en una biopelícula. A) Las bacterias planctónicas son neutralizadas por los agentes antimicrobianos. B) Las bacterias en la biopelícula más cercanas a la superficie reciben el daño del agente antimicrobiano. C) La matriz extracelular (MEC) retarda la velocidad de penetración del agente antimicrobiano a la biopelícula. D) Las bacterias generan una respuesta ante el estrés, haciendo que la actividad de las células cambie como respuesta a estímulos del ambiente y E) se genera un microambiente alterado. F) Bacterias persistentes se generan, las cuales son capaces de resistir a los agentes antimicrobianos permitiendo nuevamente la colonización de la superficie por parte de las bacterias en biopelícula.

### Técnicas para el estudio de la biopelícula

Existen distintas técnicas para el estudio de biopelículas, enfocándose cada una de ellas en su campo de aplicación. En el aspecto clínico, la detección oportuna de la formación de biopelículas en infecciones persistentes es un factor clave para combatir padecimientos. En este campo, las técnicas persiguen el desarrollo de antígenos y anticuerpos específicos para el diagnóstico terapéutico. Actualmente, se han desarrollado ensayos ELISA (del inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay", o bien, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) para anti-adhesinas de superficie, que son altamente expresadas en células en biopelículas para monitorear la formación de biopelículas, por ejemplo, de *Staphylococcus* en pacientes con injertos vasculares sintéticos (Chen y Wen, 2011).

Asimismo, se han desarrollado estrategias tales como sistemas de biopelículas artificiales, donde podemos destacar al ensayo de biopelículas en microplaca, utilizado para examinar eventos primarios en la formación de la biopelícula, detectar su dispersión y monitorear la adhesión microbiana a una superficie abiótica. La

técnica utiliza una microplaca de 96 pozos, en la cual las células se cultivan por cierto periodo. Las células adheridas a los pozos son teñidas con un medio de contraste (por ejemplo, cristal violeta 0.1%), lo que permite la visualización de los patrones de adhesión de las células a la superficie. Esta técnica permite la medición de la absorbancia en tiempos determinados para obtener ensayos semicuantitativos de la formación de la biopelícula (Meritt *et al.*, 2005; Labrie *et al.*, 2010).

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) acoplada a microscopía, es por mucho, la técnica más usada, pues se utiliza para analizar la composición y la localización de especies microbianas específicas en la biopelícula. La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos por un oligonucleótido altamente específico para cada bacteria, que hibrida concretamente a su secuencia blanco complementaria en la célula (Yang *et al.*, 2011). Las células hibridadas fluorescen bajo cierta longitud de onda, puesto que el oligonucleótido está marcado con un fluorocromo o una proteína fluorescente. Las células son visualizadas a través de microscopía confocal (Sternberg *et al.*, 2006). Esta técnica es ampliamente utilizada, ya que el

equipo permite realizar cortes ópticos virtuales a lo largo de la imagen, obteniendo un mejor análisis con respecto a la localización y diseño de la biopelícula (Almeida *et al.*, 2011).

Existen también otras técnicas tales como el método de electroforesis en geles desnaturizantes en gradiente (DGGE) y la microscopía electrónica. La primera es aplicada para describir la diversidad microbiana e identificar especies individuales en biopelículas multi-especie; este método separa comunidades bacterianas a partir de amplificadores de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de ARN ribosomal 16S con base en su contenido en guanina y citosina. La segunda es utilizada para observar la estructura de la biopelícula en forma directa (figura 3) (Yang *et al.*, 2011).

#### Biopelículas bacterianas en el interior de nuestras células

Las bacterias patógenas son capaces de entrar a células epiteliales humanas por procesos de internalización, causando infecciones invasivas. *Bartonella henselae*, una bacteria capaz de colonizar las válvulas del corazón, invade a las células endoteliales vía *invasoma*, es decir, formando grandes agregados que se internalizan en las células eucariotas (Dehio, 1997). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), causante de diarreas agudas, y *E. coli* uropatógena (UPEC), que provoca infecciones del tracto urinario, también pueden invadir el epitelio intestinal y el de vejiga urinaria en humanos y animales, respectivamente (Yamamoto *et al.*, 2009). Dentro de las células epiteliales de la vejiga, UPEC se mueve a través de la membrana por medio de compartimentos similares a un endosoma tardío, éste se rompe en el citosol de la célula huésped y se multiplica rápidamente, formando comunidades intracelulares tipo biopelícula que contienen hasta miles de bacterias (Wiles *et al.*, 2008).

Otros patógenos asociados con infecciones crónicas ligadas a la formación de biopelículas incluyen: *Pseudomonas aeruginosa* en la fibrosis quística con neumonía, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en otitis media crónica, *Staphylococcus aureus* en rinosinusitis crónica y *Mycobacterium tuberculosis* en la tuberculosis humana, entre otras, donde la biopelícula provee una estrategia de supervivencia como un reservorio de células que pueden repoblar y recolonizar sitios que previamente han sido tratados con drogas o antibióticos (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009; Chen y Wen, 2011).

#### Conclusiones y perspectivas futuras

Las biopelículas son una extraordinaria estrategia de supervivencia que las bacterias y otros microorganismos han aprovechado por millones de años, permitiéndoles habitar bajo condiciones ambientales desfavorables, una incrementada resistencia a agentes antimicrobianos y una elevada transferencia horizontal de genes. Por todo lo anterior, el conocimiento del desarrollo de una biopelícula y las interacciones que existen dentro de ella, es de suma importancia, tanto para el tratamiento eficaz de enfermedades que son causadas por patógenos en este estado, así como para su utilización en beneficio del hombre, como es el caso de la biorremediación. Gracias al desarrollo de nuevas investigaciones encaminadas a descubrir las interacciones existentes dentro de estas estructuras y los genes implicados en su formación y desarrollo, además del avance de las técnicas para su estudio, como las mencionadas anteriormente, el conocimiento de las biopelículas se ha incrementado en los últimos años, permitiéndonos una mejor comprensión de estos consorcios, que forma parte del ciclo de vida de los microorganismos.

#### LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, C.; AZEVEDO, N.F.; SANTOS, S.; KEEVIL, C.; VIEIRA, M., Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE*, 6(3): 147-186, 2011.
- BOWEN, W.H.; KOO, H., Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research*, 45: 69-86, 2011.
- BORDI, C.; DE BENTZMANN, S., Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive Care*, 1(19), 2011.
- BRENCI, A.; MCFARLAND, K.A.; MCMANUS, H.R.; CASTANG, S.; MOGNO, I.; CHEN, L.; WEN, Y., The role of bacterial biofilms in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, 3: 66-73, 2011.

- CIOFU, O.; RIIS, B.; PRESSLER, T.; POULSEN, H.E.; HØIBY, N., Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2276-2282, 2005.
- DEHIO, C.; MEYER, M.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; LANZ, C., Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasive. *Journal of Cell Science*, 110: 2141-2154, 1997.
- GANGULY, S.; MITCHELL, A., Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 1-6, 2011.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P., Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7): 1034-1043, 2009.
- HANSEN, S.K.; RAINEY, P.B.; HAAGENSEN, J.A.; MOLIN, S., Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*, 445: 533-536, 2007.
- HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C., Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 3746-3755, 2010.
- HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.; MOSER, C.; JENSEN, P.Ø.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T., The clinical impact of the bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2): 55-65, 2011.
- LABRIE, J.; PELLETIER-JACQUES, G.; DESLANDES, V.; RAMJEET, M.; AUGER, E.; NASH, J.H.E.; JACQUES, M., Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 41(3), 2010.
- LOERA, V.; GARCIDUEÑAS, C.; AVELAR, F.; RAMÍREZ, E.; GUERRERO, A., Biopelículas: estrategias de resistencia y ataque para la patogénesis bacteriana. *Scientiae Nature*, 10(2): 5-16, 2008.
- MAZZOLI, S., Biofilms in chronic bacterial prostatitis (NIH-II) and in prostatic calcifications. *Federation of European Materials Societies, Immunology & Medical Microbiology*, 59: 337-344, 2010.
- MERRITT, J.H.; KADOURI, D.E.; O'Toole, G.A., Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 1B.1.1-1B.1.17, 2005.
- NAZAR, J., Biofilms bacterianos. *Revista Otorrinolaringología*, 67(1): 61-72, 2007.
- PEREIRA, A.L.; SILVA, T.N.; GOMES, A.C.; ARAÚJO, A.C.; GIAUGLIANNO, L.G., Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BioMedical Center Microbiology*, 10(57), 2010.
- RAYNER, M.G.; ZHANG, Y.; GORRY, M.C.; CHEN, Y.; POST, J.C.; EHRILH, G.D., Evidences of bacterial metabolic activities in culture-negative otitis media with effusion. *Journal of the American Medical Association*, 279: 296-299, 1998.
- RENDUELES, O.; TRAVIER, L.; LATOUR-LAMBERT, P.; FONTAINE, T.; MARGNUS, J.; DENAMUR, E.; CHINGO, J.M., Screening of *Escherichia coli* Species Biodiversity Reveals New Biofilm-Associated Antiadhesion Polysaccharides. *Malaysian Bio-industry Organisation*, 2(3): e00043-11, 2011.
- RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S., Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 2003.
- SIMÕES, L.C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J., Biofilm Interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19): 6192-6200, 2007.
- STERNBERG, C.; TOLKER-NIELSEN, T., Growing and analyzing biofilms in flow cells. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 1, Unit 1B 2, 2006.
- TRAPPETTI, C.; OGUNNIYI, A.; OGGIONI, M.; PATON, J., Extracellular Matrix Formation Enhances the Ability of *Streptococcus pneumoniae* to Cause Invasive Disease. *PLoS ONE*, 6(5): e19844, 2011.
- WAGNER, C.; KONDELLA, K.; BERNSCHNEIDER, T.; HEPPERT, V.; WENTZENSEN, A.; HÄNSH, G.M., Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. *Shock*, 20: 503-510, 2003.
- WILES, T.J.; KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A., Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1): 11-19, 2008.
- YAMAMOTO, D.; HERNÁNDEZ, R.T.; BLANCO, M.; GREUNE, L.; SCHIMIDT, M.A.; CARNEIRO, S.M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; GOMES, T.A.T., Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. *BioMed Central Microbiology*, 9 235, 2009.
- Yang, L.; Liu, Y.; Wu, H.; Høiby, N.; Molin, S.; Song, Z., Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*, 74-81, 2011.