

ORIGINAL ARTICLE

TÉCNICAS Y MÉTODOS DE USO DE LAS BIOPELÍCULAS EN LA BÚSQUEDA DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Lourdes Echevarría García, MS
Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico
lourdes_echevarría@puopr.edu

Resumen

Las biopelículas son organizaciones que tienen microorganismos que viven adheridos a las superficies. Poseen variedad de características: adherencia, heterogeneidad, capacidad de comunicación intercelular, resistencia antimicrobiana, diversidad de microambientes y muchas más. Los estudios demuestran que en su proceso de formación se han encontrado variedad de productos de los que se pueden mencionar: enzimas de colagenasas, fibrinolisin que degradan epitelios, liberación del lipopolisacárido por bacterias gram negativas, producción de leucotoxinas que lisan los leucocitos polimorfonucleares, proteasas que desdoblán anticuerpos como el IgG e IgA, secreciones de desechos metabólicos citotóxicos como ácido butírico y propiónico. Estos microorganismos tienen la particularidad de crear resistencia a los agentes antimicrobianos por medio de uno o más mecanismos (Betancourt M et al. 2004). Continuamente se investiga el funcionamiento de diversas biopelículas con el objetivo de obtener nuevas cepas para aplicarse en el campo de la biorremediación. En este artículo podrá ver sus ventajas, métodos, técnicas y procedimientos para conocerlas, investigarlas y poder utilizarlas en procesos de biorremediación.

Palabras claves: biopelículas, métodos, microorganismos, crecimiento

Abstract

Biofilms are organizations with living organisms adhered to surfaces. They have a variety of features among which we can mention: adhesion, heterogeneity, intercellular communication skills, antimicrobial resistance, diversity of microenvironments and many more. Many studies show that in the process of formation there can be found a variety of products, including: collagenase enzymes, which degrade Fibrinolysin epithelia, release of lipopolysaccharide by gram negative lysing leukotoxins production of polymorphonuclear leukocytes, proteases unfolded antibody and the IgG and IgA secretion of metabolic waste cytotoxic as butyric and propionic acid. These

microorganisms of the biofilm have the distinction of developing resistance to antimicrobial agents by one or more mechanisms (Betancourt M et al. 2004). The operation of various biofilms is continually investigated with the objective of obtaining new strains to be applied in the field of bioremediation. In this article you will see their advantages, methods, techniques and procedures to know, investigate and use them in bioremediation processes.

Keywords: biofilm, methods, microorganisms, growth

INTRODUCCIÓN

Se denominan biopelículas aquellas comunidades de células adheridas a una superficie gracias a una matriz extracelular. James Netterwald, en la revista *Genomics and Proteomics*, define como una monocapa de bacterias sobre una superficie a un tapete microbiano tan complejo que se podrían considerar como auténticas ciudades microbianas (Lozano TJA 2005).

Las biopelículas se observan naturalmente en nuestro alrededor. Crecen donde hay condiciones favorables para ellas. Podemos verlas en la gelatina mocososa que cubre los tiestos del jardín, la parte verde oscura que cubre las piedras en los lagos, ríos, manantiales, la parte exterior de los barcos y en las tuberías de las plantas de tratamiento de aguas usadas y potables. Poseen superior capacidad para formarse y no tienen restricciones de ningún grupo específico de microorganismos y los estudios indican que, en condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas en cualquier lugar. Uno de los componentes importantes en la biopelícula es el agua, este es de mayor cantidad, representa aproximadamente un 97% en su totalidad. La matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad, se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) y productos diversos procedentes de las lisis de las bacterias (Lasa et al.2005).

FORMACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA

La biopelícula se forma cuando la bacteria capta ciertos parámetros ambientales (disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios de la osmolaridad, el pH, la tensión de oxígeno y la

temperatura) que disparan la transición de la forma planctónica a un crecimiento sobre una superficie (Donalan et al. 2002, Stewart et al. 2001, Watnik et al. 2000). El procedimiento de formación de una biopelícula, según Monroe (2007), se resume de la siguiente forma: el proceso de formación de las fases de una biopelícula comienza con la unión inicial, unión irreversible, maduración I, maduración II y dispersión. Cuando se completan estos pasos, entonces la formación de la biopelícula toma un anclaje inicial (reversible) y flagelos. Ocurre la formación de la monocapa, pasa a la maduración y ocurre la formación de microcolonias. Todos estos procesos llevan a la dispersión, bajo concentración de nutrientes, para llegar a la migración por canales de agua. Esto es un proceso cíclico que ocurre continuamente para dar paso a la formación de nuevas biopelículas (Monroe 2007).

Las biopelículas o biofilm se describen como una serie de microorganismos que se encuentran viviendo en un exopolímero que está compuesto de glicocalix a un 75% y que, cuando se organizan, forman colonias adheridas a diferentes áreas superficiales, no importa su textura ya sean blandas o duras. El resultado es un exopolímero, el cual es producido por los mismos microorganismos que, en conjunto, forman una matriz adherente donde la mayoría quedan atrapados y comienza la organización de colonias con diferentes requerimientos metabólicos (Betancourt M et al. 2004). Las características más importantes de las biopelículas la definen como: células adheridas a las superficies, compuestas por constituyentes orgánicos e inorgánicos. Ésta se forma en múltiples etapas y su crecimiento es estructurado y con una arquitectura muy compleja (Costerton et al. 1999). Sus colonias o comunidades generalmente son mixtas. Los gradientes físico-químicos, dentro de las biopelículas maduras, resultan en un gran número de microambientes potenciales dentro de un área muy pequeña. En su mayoría son muy resistentes a los antibióticos y desinfectantes (Seong et al. 2011). Su comunicación es de célula a célula. Las biopelículas maduras pueden contener alrededor 10¹⁰ células/ml, parte de estas células se liberan y pasan al agua (Stantley et al. 1983, Stickler et al. 1993, Costerton et al. 1995, Cadwell et al. 1995).

Las bacterias han crecido en biopelículas durante millones de años. La formación de éstas representa un problema para personas que reciben alguna operación o trasplantes de órgano. Estos microorganismos son muy difíciles de exterminar con agentes

antimicrobianos y la liberación de bacterias, desde la biopelícula, puede provocar una infección (Lasa et al. 2005). El interés en las biopelículas está relacionado a la implicación que vemos en la resistencia a antibióticos y a desinfectantes, ya que ésta demuestra tener una estructura más fuerte y menos accesible que una colonia. Éstas también son una herramienta de supervivencia importante en bacterias. Los desinfectantes y antibióticos sólo alcanzan a las células más expuestas de la superficie, aunque algunas veces se pueden difundir al interior de la misma, su concentración y las bacterias que están en la base podrían ser resistentes, lo que evitaría su destrucción (Francolini et al. 2004).

VENTAJAS DE LAS BIOPELÍCULAS

Algunas de las ventajas de las biopelículas es que se encuentran en ambientes resguardados y tienen mejor captación de nutrientes. Cuentan con protección frente a sustancias tóxicas y biácidas, con un metabolismo más activo, ayudándole a un mayor crecimiento. Los microorganismos interactúan entre ellos. Existe la posibilidad del intercambio de material genético y metabólico (Costerton et al. 1987,1999).

En el medio ambiente, todas las superficies son sustratos potenciales para las biopelículas. Son utilizadas en las plantas de tratamiento de las aguas residuales. En cuanto a la salud pública, normalmente la consideran dañina y potencialmente perjudicial. Entre otros impactos positivos de las biopelículas se podría mencionar la depuración por humedales destruidos, bioremediación de zonas contaminadas, biodegradación y biobarreras protectoras. En cuanto a los impactos negativos, éstos se observan más en la salud, infecciones en implantes dentales y catéteres (Hall-Stoodley et al. 2004).

TÉCNICAS, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIOS

Existen variedades de técnicas para el estudio de biopelículas y se clasifican como técnicas directas e indirectas. En el caso de la técnica de desprendimiento, existe la de zonificado y raspado-ultrasónico (Vargas et al. 2008) que explica el diseño experimental, el cual permite obtener

resultados eficientes en el desprendimiento de células sensibles viables, empleando la técnica de zonificado. Durante este estudio, se desarrollaron biopelículas de las bacterias reductoras de sulfato *Desulfovibrio termitidis* por 24 horas, sobre láminas de hierro y acero de carbón a diferentes geometrías. Luego de obtener la eficiencia máxima, se corroboró con la técnica de raspado-ultrasónico y zonificado. El resultado final fue el comparar el desprendimiento de células viables entre la técnica de zonificado y raspado-ultrasónico, donde la técnica de zonificado resultó 10 veces más efectiva.

Otro estudio lo fue el implementar y validar técnicas analíticas que permitan caracterizar la biopelícula sobre un soporte sintético. El trabajo se dividió en dos etapas para realizar el estudio de formación de biopelículas en los diferentes materiales: textiles, metales, plásticos, fibras, placas, hilos y alambres. En la primera etapa se construyó un reactor a escala de laboratorio, con sistema de recirculación de humificación y suministro de nutrientes. La atmósfera interior del reactor se mantuvo saturada con un filtro de compuestos orgánicos volátiles (COV). Se observó la influencia del medio mineral en la formación de la biopelícula. Se midieron la biomasa, adsorción de contaminantes y repelencia al agua en cultivos mixtos. Las biopelículas se desarrollaron por varios días a 37°C, pH 7.0 y 150 rpm (rotación). Se observó su formación con un microscopio electrónico de barrido (SEM) y se determinó la capacidad de eliminación global (CE) con el método de microcosmos y la biomasa por peso seco y nitrógeno proteico. Se determinó la hidrofobicidad y adsorción. Los resultados arrojaron crecimiento de todas las superficies excepto el tubo de cobre. La mayor formación, expresada por g de biomasa seca/m² por soporte, se observó en el alambre por fibra de acero inoxidable y en las fibras de poliámid-poliéster. Para esto, se incluyeron estudios con microfotografía cinética del CE específico, nivel de hidrofocibilidad e isoterma de absorción (Carcado et al. 1999).

En Valencia, España, estudiaron las poblaciones microbianas del agua en piscinas nucleares. También, se estudió la formación de biopelículas en las instalaciones de la central nuclear y de su posible uso de esas poblaciones de bacterias para la biorremediación de aguas radiactivas. Para analizar la formación de las biopelículas, se utilizó una piscina de combustible nuclear usado, se sumergieron durante 34 meses (en condiciones estáticas y dinámicas) pedazos de acero inoxidable, así como ovillos de acero inoxidable y titanio (99.9%). La observación con el microscopio de

epifluorescencia y el microscopio electrónico de barrido reveló la formación de biopelículas sobre las muestras a pesar del carácter radioactivo y oligotrófico del agua. De acuerdo con los métodos estándar de cultivo y secuenciación de los fragmentos del 16S rADN, los resultados de estas biopelículas fueron 57 diferentes grupos de bacterias α -, β -, y γ -*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteridae*. Para medir la radiactividad de las biopelículas se usó el método por espectrometría radionucléidos, especialmente $^{60}\text{Cobalto}$. El empleo de materiales metálicos para descontaminar aguas radiactivas podría ser un nuevo método de biorremediación (Sarro et al. 2005).

Los microorganismos juegan un papel muy importante en los roles del hábitat de la tierra. Los métodos tradicionales de identificación son importantes pero nos limita a saber información sobre la diversidad microbiológica en muestras en el ambiente natural. Es por eso que se utilizan técnicas moleculares para poder estudiar la diversidad microbiana y para ayudar en la bioremediación de monumentos históricos y trabajos de arte. Otro estudio demostró las diferentes estrategias y métodos para utilizar. Éste se dividió en dos partes en las cuales se tomaba la muestra y se realizaban las extracciones. Para buscar la diversidad microbiológica, se tomó la muestra, se extrajo el ADN, se realizó la amplificación del PCR, se llevó a cabo el “Fingerprinting” (DGGE) y se construyó la librería del ADN. En la segunda parte, se analizaron las identificaciones del organismo y, de la misma muestra, se extrajo el ADN, luego, realizaron el “screening” de la librería y realizaron la secuenciación, “Homology search”, para llegar a la identificación del organismo. Este estudio proveyó nuevas perspectivas para demostrar que la aplicación de los métodos moleculares es eficiente para diseñar estrategias adecuadas para la conservación y protección de monumentos, en beneficios de generaciones futuras. También, el estudio aportó nuevas perspectivas para futuras investigaciones (González et al. 2005).

Muchos microorganismos presentes en las superficies de materiales pueden tener un efecto dañino o beneficioso en el funcionamiento de dichos materiales. Se sabe que el crecimiento asociado a superficies, como las biopelículas, estimula el desarrollo del bioensuciamiento (“biofouling”). La presencia de las biopelículas, la cual se ha estudiado, puede promover en las interfaces reacciones físicoquímicas no favorecidas en condiciones abióticas. En los materiales metálicos, los cambios no deseados en las

características del material y por una biopelícula (capa de bioensuciamiento) se denomina corrosión microbiana. La biocorrosión se produce en hábitats acuáticos y en dichos sistemas la química de las interfases refleja una gran variedad de actividades fisiológicas realizadas por diversas poblaciones microbianas que crecen muy bien en las biopelículas. La biocorrosión puede verse como la consecuencia conjunta de reacciones biológicas y abióticas de transferencia de electrones de los metales, dando lugar a reacciones redox, favorecidas por la ecología microbiana. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) derivadas de microorganismos, que están compuestas de diferentes macromoléculas, miden la adherencia inicial de la célula a la superficie del material donde el resultado constituye la matriz de la biopelícula. Este estudio probó que existe desconocimiento sobre cómo contribuyen las EPS a la biocorrosión. Las técnicas utilizadas en este estudio fueron espectroscopía de fuerza atómica y espectrometría de masas (Beech et al. 2005).

Por otro lado, las biopelículas cianobacterianas son comunidades complejas que ejercen una actividad deteriogénica importante en monumentos históricos. Por su parte, las comunidades cianobacterianas en Palenque, Brasil, están compuestas por más de 10 especies, de las cuales dominan los morfotipos cocoidales. El método basado en el uso de PCR aplicado directamente para amplificar ADN de células cianobacterianas no cultivadas obtenidas en el monumento de Brasil, indican que las cianobacterias secuenciadas corresponden con sus respectivos grupos morfológicos (tal como se define en los códigos bacterianos y botánicos). En general, el estudio mostró que las cianobacterias cocoidales son los principales colonizadores en los monumentos históricos latinoamericanos. Estos monumentos están sometidos a climas tropicales y subtropicales, haciendo que la evaluación de su potencial actividad deteriogénica requiera del desarrollo de técnicas moleculares rápidas. Los estudios polifásicos son esenciales para la diversidad microbiana global (Benjamín et al. 2006).

Se evaluó el comportamiento de las biopelículas en tuberías a presión a través de un montaje de recirculación compuesto por cuatro tuberías en paralelo. Evaluaron el crecimiento de las biopelículas, la eficiencia de remoción de los lavados y el comportamiento de las pérdidas de energía a través del tiempo. El resultado de la experimentación concluyó que los lavados consecutivos son un medio efectivo para

controlar el crecimiento de bacterias y poder restablecer las pérdidas de energía en un sistema de tubería a presión (Reyes et al. 2005).

Por otro lado, examinaron la relación antagónica entre bacterias bénticas que conforman las biopelículas en diferentes sustratos marinos, de donde se aislaron 29 cepas de la macroalga *Lessonia nigrescens*. Utilizaron sustratos artificiales en el aislamiento de larvas de ostión (*Argopecten purpuratos*) y abalón (*Haliotis discus hannai*). El resultado fue las interacciones antagónicas entre los morfotipos seleccionados, indicando que la producción de sustancias inhibidoras es común entre bacterias aisladas de biopelículas, por lo que las ventajas competitivas sobre otras bacterias es mayor y, por tanto, juegan un importante rol en el control de funciones en microhábitat epifíticos (Avendaño et al. 2005).

Otra técnica de secuenciación es la de disparo conocida como “shotgun”, desarrollada por Celera Corp. Esta compañía descubrió un microorganismo más pequeño que un virus, que habitaba en los suelos que cubrían el limo de las minas y, a su vez, los convertía en ácido. Esto causaba un problema de contaminación, ya que ocasionaba la contaminación de las corrientes de aguas. La secuenciación de disparo es el método más rápido de identificar un microorganismo, como el cultivo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), en la que se puede perder una gran cantidad de microorganismos. La secuenciación “shot gun” (aleatoria por fuerza bruta o a perdigazos) es el método utilizado para la secuenciación rápida de ADN de muestras complejas o de gran tamaño. El proceso conlleva la fragmentación aleatoria de la muestra en pequeños fragmentos y el posterior ensamblaje de las lecturas obtenidas mediante el estudio, normalmente con la ayuda de un programa informático. En el estudio, las aqueobacterias descubiertas, que viven en el drenaje altamente rico en ácido de las minas, son arqueotipos de vida que podría existir en otros planetas, tales como el suelo rico en hierro y azufre de Marte (Berkeley 2006).

Otros ejemplos de organismos del drenaje de las minas que viven en una biopelícula son las color rosácea en charcas de ácido verde, éstas obtienen energía mediante la oxidación de hierro, que es generalmente herrumbre, y en este proceso crean ácido sulfúrico y disuelven pirita (sulfato de hierro u oro) para liberar más hierro que azufre. Este proceso automantenido crea el drenaje de ácido que contamina los arroyos y

los ríos. Este estudio demostró que los organismos encontrados podrían ser los más pequeños que se han conocido y que no están totalmente seguros que puedan vivir independientemente. De tener suficientes genes, pueden valerse por sí mismos o, por lo contrario, son simbióticos con otros organismos, o se están alimentando de éstos (Berkeley 2006).

Otra aplicación estudiada son las aplicaciones de las comunidades microbianas sobre monumentos históricos. Se analizó la contribución de las comunidades microbianas a las formaciones de las estalactitas. El factor microbiano y la influencia del metabolismo bacteriano son importantes para el equilibrio del bicarbonato, ya que aumentan la solubilidad de los minerales carbonatados y, como resultado, proporcionan sitios de nucleación. Con esta aplicación, detectaron las comunidades microbianas activas en la cueva de Sahastradhara, India, y utilizando la técnica de FISH, identificaron: *cianobacterias, bacterias heterótrofas, Ñ-Proteobacterias, 26% y Archea* (Sushmithan et al. 2005).

En estudios de laboratorio, se analizaron muestras de bacterias de cuevas, con el propósito de verificar el crecimiento fractal, producción de pigmentos, formación de biopelículas, específicamente el efecto del ácido algínico, y la monitorización de la colonización bacteriana. Para conocer detalles del ambiente en la cueva, tomaron los parámetros de temperatura por cada mes y la humedad relativa (Laiz et al. 2000). Identificaron varios géneros de bacterias gram negativos, gram positivos y actinobacterias. Como resultado de la prueba de crecimiento fractal de *Nacardiopsis dassonvillei*, esta bacteria se desarrolló en varias concentraciones de peptona, donde la concentración al 2% fue la favorecida. Caracterizaron las cepas de *Streptomyces sp.*, aisladas del mausoleo circular. Todas las superficies fueron comparadas por crecimiento microbiano durante 8 años, donde obtuvieron un 50% de crecimiento. En la biopelícula sobre el sustrato lítico, observaron que la naturaleza de los exopolímeros era variada por grupos funcionales que pueden unirse a cationes. En la exopolímero de *Pseudomona aeruginosa* se detectaron grupos carbonilo e hidroxilo del ácido algínico, formación de complejos con la superficie mineral y la liberación de calcio de los sustratos calizos (Laiz et al. 2000). Continuando con la formación de la biopelícula, el estudio de genómica y proteómica concluyó con un 30% de genes que se expresan diferencialmente, estos genes

son responsables de la transición de la biopelícula plactónica. Elementos que intervienen en la formación de la biopelícula de muchos géneros bacterianos son: la familia de proteínas (“biofilm associated protein”), la superfamilia de la proteína (GGDEF) y el polisacárido celulosa. La formación de la biopelícula utiliza la regulación del sistema “quorum sensing” o autoinducción; el mecanismo dependiente de la señal de la molécula autoinductor permite a la bacteria sentir la densidad de la población. Una de las moléculas que bloquean el sistema de “quorum sensing” es *Delisea pulcra, furonama*. Para poder saber el efecto del ácido algínico sobre la disolución de calcita, se debe conocer la composición química, grupos carbonilo e hidroxilo, alginatos, adsorción de ácido, acumulación y la adsorción irreversible (Perry et al. 2004).

CONCLUSIÓN

El mundo de la biotecnología sigue abriendo caminos y debemos continuar investigando, desarrollando y trabajando en conjunto para encontrar nuevas herramientas que nos ayuden a combatir la contaminación ambiental y las enfermedades de la nueva era utilizando procesos naturales como la biorremediación. Los métodos aquí mencionados han probado ser efectivos para lograr identificar soluciones a problemas de contaminación en diferentes lugares. El uso de las biopelículas es una forma natural de contribuir a remediar lugares impactados por sustancias contaminantes o microorganismos. Se utiliza de manera natural estos microorganismos que desarrollaron la capacidad de trabajar juntos y adaptarse a un medio ambiente específico. Estos actúan degradando el contaminante de forma natural, económica y, de esta manera, se puede continuar desarrollando técnicas y métodos para trabajar con lugares impactados de forma natural, ayudando a la conservación de monumentos históricos, aguas, suelo, superficies y la salud.

REFERENCIAS

Avendaño R, Lody M, Riquelme EC. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. Revista de Biología Marina y Oceanografía. Universidad Antofagasta. 40 (2):117-125.

- Betancourt M, Botero JE, Rivera SP. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Revista Colombia Médica*. 35(3):34-39.
- Berkeley P. 2006. Nanoorganisms: Probe of Acid Mine Drainage Turns Up Unsuspected Virus-sized Archaea. University of California. Science Daily.
<http://www.sciencedaily.com/releases/2006/12/061222092509.htm>
- Beech IB, Sunner JA, Hiraoka K. 2005. Revisión de las interacciones entre microorganismos y superficies en los procesos de bioensuciamiento y de biocorrosión. *INT. Microbiol* 8 (3):157-168.
- Benjamin O, Morales O. 2006. Cyanobacterial diversity and ecology on historic monuments in Latin America. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):188-195.
- Carcado BJ, Meza C, Cárdenas B, Auria R, Revah S. 1999. Caracterización de Biopelículas en Soportes Sintéticos. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana Iztalpalapa. México.
http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_55-56/010021726.pdf
- Costerton JW, Lewandoski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*. 49:711-745.
- Costerton JW. 1999. Introduction to biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 11:217-221.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GC, et al. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol*: 41:435-464.
- Caldwell DE. 1995. Cultivation and Study of Biofilm Communities Microbial biofilms. University Press, Cambridge. 64-79.
- Donlan R M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 8(9):881-890.
- Francolini I, Norris PM, Piozzi A, Donelli G and Stoodley P. 2004. Usnic acid as a natural inhibitor of biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 48(11):4360-4365.
- González Juan, Saiz, J M. 2005. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International microbiology*. 8:189-194.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95-108.
- Monroe D. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 5(11): e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307

Lasa I, Del Pozo JL, Penales JR. 2005. Biofilms bacterianos e infecciones. Revista Anales del sistema sanitario de Navarra. 28(2):153-298.

Laiz L, Groth I, Schumann P, Zezza F, Feiske A, Hermons B, Saiz JC. 2000. Microbiology of the stalactites from Grotta Del Cervi, Porto Badisco, Italy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 3:25-30.

Lozano TJA. [Internet]. 2007. Bacterias y biopelículas. Revista ciencias y salud. Available from: http://cienciaysalud.laverdad.es/9_1_71.html

Perry et al. 2004. Effects of the biologically produced polymer Alginate on Macroscopic and microscopic Calcite Dissolution Rates Environmental Society Institute of Technologic Ceramic. España. 38:3040-3046.

Reyes del TP, Saldarriaga JG. 2005. Comportamiento de biopelículas luego de lavados sucesivos en tuberías de agua a presión. Revista de Ingeniería Universidad de los Andes. 22:142-150.

Sarro M, García M. y Moreno DA. 2005. Formación de biopelículas en piscinas de combustible nuclear gastado y biorremediación de aguas radiactivas. INT. Microbiol. 8(3):223-230.

Seong CP, Yoonkyug P, Kyung SH. 2011. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. Int. J. Mol. Sci. 12(9):5971-5992.

Stanley PM. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. J. Microbiol. 29:1493-1499.

Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 14: 358:135-138.

Stickler D J, King J B, Winters C, Morris S L. 1993. Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. J. Infect. 27:133-135.

Sushmitha, et al. 2005. Role of microbial community in stalactite formation, Sahasradhara caves. Dehradun, India. Current Science. 88(8):1305-1308.

Vargas A, Duque Z, Romero M. 2008. Involving Parameters for the study of biofilm associated to corrosion process. Universidad de Zulia, Venezuela. Acta Microscópica. 17(1):48-56.

Watnik P, Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 182:2675-2676.

Copyright 2013 Non-Profit Evaluation & Resource Center, Inc.