

## Comunicación entre bacterias

**Maritrini Colón-González y Jorge Membrillo-Hernández.**

*Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-228. 04510 Coyoacán, D. F. Email: jmh@biomedicas.unam.mx*

### Introducción

Uno de los paradigmas más grandes en la microbiología es la concepción de la existencia de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar una nueva bacteria, cada una, idéntica a la otra. Sin embargo, desde hace más de 60 años se ha sugerido que lejos de esta conducta aislada, puede existir una conducta bacteriana en grupo, la cual sigue la norma “la unión hace la fuerza”. Pero si las bacterias realmente pueden tener una conducta como grupo, entonces se hace necesaria la existencia de un sistema de comunicación entre ellas, a través del cual puedan “votar y decidir” que les conviene y actuar en grupo para conseguirlo.

En 1962, McVittie y colaboradores, sugirieron la posibilidad de esta forma de comunicación durante el proceso de formación del cuerpo fructífero en *Myxococcus xanthus* (McVittie, 1962). A ellos siguió la evidencia de una posible molécula señalizadora en Neumococos, la cual era liberada al medio en una manera dependiente de densidad celular y a la que relacionaron con el fenómeno por el cual este organismo incorporaba DNA exógeno, llamado competencia, haciendo una analogía de este sistema de comunicación al de las hormonas en organismos superiores.

De esta forma se fueron identificando otros mecanismos similares que comprobaron que las bacterias, se comunican entre sí, que tienen “voz y voto” y que pueden unir esfuerzos para llevar a cabo funciones de las cuales se benefician en conjunto.

### “Quorum sensing”

En 1994, Fuqua y colaboradores usaron el término “quorum sensing” para describir un fenómeno dependiente de densidad celular (Fuqua *et al.*, 1994). Este proceso está basado en la producción de moléculas que sirven como señales cuya concentración depende de la densidad del organismo que la produce. Una vez que estas moléculas o autoinductores alcanzan el umbral de detección, inducen diferentes fenómenos en la célula.

Existen diferentes formas de comunicarse con las demás bacterias, básicamente estas se agrupan en dos: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación a través de acil homoserina lactonas, lenguajes usados por bacterias gram positivas y proteobacterias respectivamente (Kleerebezem *et al.*, 1997a; Lazazzera y Grossman, 1998), ambas moléculas son llamadas autoinductores.

### Mecanismos moleculares de señalización célula-célula

**Lux I - Lux R.** El proceso de “quorum sensing” fue observado por primera vez en *Vibrio fischeri* (Hastings y Nealson, 1977) una bacteria gram-negativa que vive como simbiote en algunas especies animales marinas. En esta relación el hospedero provee nutrientes a la bacteria y la bacteria a cambio genera luz que sirve al pez para atraer presas, alejar depredadores u otras actividades.

Engebrecht y Silverman (1984, 1987) demostraron que se necesitan de dos componentes reguladores para dirigir el proceso de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, estos componentes son LuxI, que cataliza la producción de la acil homoserina lactona (acil-HSL) y LuxR, un regulador transcripcional que al unirse a la acil-HSL activa el operon de luciferasa.

La comunicación entre proteobacterias se lleva a cabo mediante homólogos del sistema LuxI/LuxR y este sistema canónico de *V. fischeri* se ha encontrado en más de 25 especies (Fuqua *et al.*, 1996; Bassler, 1999; de Kievit e Iglewski, 2000; Miller y Bassler 2001; Shaw *et al.*, 1997). Las moléculas que actúan como palabras son las acil homoserina lactonas, que se difunden libremente a través de la membrana y se acumulan a alta densidad celular. El cognado para LuxI es LuxR, que reconoce al autoinductor y se activa regulando la expresión de diversos genes (Fig. 1).

**Péptidos.** La comunicación entre bacterias gram positivas se lleva a cabo a través de oligopéptidos modificados que al igual que las homoserinas lactonas, son excretadas al medio en forma dependiente de la fase de crecimiento.

Una vez que los precursores de los péptidos son sintetizados, estos son procesados y modificados para obtener el péptido maduro, el cual es exportado mediante un transportador de la familia ABC (*ATP-Binding-Cassette*). La detección de estos péptidos se lleva a cabo mediante un sistema de dos componentes que transducen la señal por un mecanismo de fosforilación/defosforilación (Kleerebezem *et al.* 1997b; Fig. 2).

***Vibrio harveyi* como modelo.** El quorum sensing fue originalmente estudiado en la bacteria marina *Vibrio harveyi* (Bassler *et al.* 1997). *V. harveyi* es una bacteria muy relacionada a *V. fischeri*, pero ésta no vive como simbiote y se le puede encontrar en forma de vida libre en las aguas marinas. *V. harveyi* usa el sistema de quórum sensing para controlar bioluminiscencia, sin embargo ésta no sólo emplea un sistema canónico LuxR/LuxI (Bassler *et al.* 1993, 1994a,b). Además de ello posee un circuito de quórum “mixto” con características de bacterias gram positivas y gram negativas. Al igual que las bacterias gram negativas, utiliza acil-HSL como autoinductor, pero ésta es detectada por un sistema de dos componentes similar al que poseen las gram positivas. Además se ha encontrado un nuevo sistema de quórum sensing que permite la comunicación entre *V. harveyi* y bacterias de otras especies, tanto gram-positivas como proteobacterias.

*V. harveyi* produce dos autoinductores denominados AI-1 y AI-2 (Bassler *et al.* 1993, 1994a). AI-1 es una acil-HSL, (Cao y Meighen, 1989) cuya síntesis depende de *luxM* (Bassler *et al.*, 1993). LuxLM lleva a cabo las reacciones enzimáticas para la producción de HSL a partir de *S*-adenosil-metionina (SAM) y la proteína acarreadora de grupos acil (acil-ACP). El segundo autoinductor, AI-2 ha sido caracterizado como una furanona (Schauder *et al.*, 2001), cuya síntesis depende de la proteína LuxS (Surette *et al.*, 1999; Fig. 3).

Recientemente Chen *et al.* (2002) caracterizaron y determinaron la estructura del autoinductor 2. La estructura contiene dos anillos de cinco miembros fusionados, con un átomo de boro que forma un diéster derivado de borato. La estabilización del AI-2 se lleva a cabo por numerosas interacciones polares y cadenas positivas de LuxP que sirven para estabilizar la carga negativa del boro (Fig. 4).

**El sistema de comunicación de *Myxococcus xanthus*.** Las mixobacterias son bacterias gram negativas móviles que colonizan hábitats como hojas secas, madera y otros ambientes (Reichenbach, 1993). Aunque las mixobacterias fueron originalmente clasificadas como hongos, hoy en día ha sido ampliamente aceptado que son bacterias especiales que tienen un comportamiento social complejo. *M. xanthus* libera antibióticos para matar organismos vecinos y al romper sus células utiliza esas macromoléculas mediante una amplia batería de enzimas hidrolíticas. La formación de cuerpos fructíferos es el comportamiento social más estudiado en ésta bacteria. Cuando células de *M. xanthus* están privadas de nutrientes a una alta densidad de crecimiento (unas 100,000 células), empiezan a desplazarse a centros de agregación donde forman una estructura multicelular llamada cuerpo fructífero. Las células dentro de ésta estructura se diferencian de una forma de barra a unas células esféricas que son resistentes a diversos estreses como el calor y desecación, a éstas células diferenciadas se les conoce como mixoesporas. La formación de cuerpos fructíferos probablemente ayuda a la dispersión de mixoesporas y asegura que las esporas germinen (Dworkin y Kaiser, 1985; Fig. 5).

Se sabe que para la formación de cuerpos fructíferos se requiere a) limitación de nutrientes b) alta densidad celular y c) una superficie sólida. ¿Cómo es que las células de *M. xanthus* perciben éstas condiciones, se sincronizan e inician el desarrollo del cuerpo fructífero?, ¿Cómo se coordinan para desplazarse hacia los centros de agregación? ¿Qué señalización molecular se requiere para darle esa forma de pajar al cuerpo fructífero?. Experimentos con mutantes afectadas en el proceso de la formación de cuerpos fructíferos han dado gran información acerca del proceso de señalización. La observación inicial clave fue el hecho de que mutantes afectadas en un paso del proceso podrían ser complementadas por otra mutante afectada en otro paso y que pudiera producir la moléculas faltantes de la primera, así la complementación se debería dar sólo entre mutantes que tuvieran afectada la producción de señales diferentes (Hagen *et al.*, 1978).

Un grupo de mutantes (*asg*) se caracteriza por estar afectadas en el desarrollo temprano de la formación del cuerpo fructífero. Al analizar genéticamente éstas mutantes se encontró que estaban afectadas en la producción de una señal extracelular llamada molécula señal A. Esta señal es liberada por una cepa silvestre al medio de cultivo después de aproximadamente una hora de que las células se encuentran en un estado de limitación de nutrientes (Kuspa *et al.*, 1986). La molécula señal A al parecer es una combinación de dos actividades, una sensible al calor que se ha identificado como una mezcla de proteasas y una actividad resistente al calor, que es una mezcla de aminoácidos y péptidos, lo que apoya fuertemente que la verdadera molécula señal A son péptidos y amino ácidos generados como consecuencia de proteólisis extracelular (Kuspa *et al.*, 1992). Al analizar el sitio de las mutaciones *asg* que afectan la producción de la molécula señal A se encontró a tres loci no contiguos: *asgA*, *asgB* y *asgC* (Kuspa y Kaiser, 1989). El gene *asgA* codifica para la histidín cinasa *AsgA* que

tiene dominios conservados entre las proteínas sensoras de los sistemas de dos componentes en bacterias (Parkinson y Kafoid, 1992), con la única diferencia que al parecer no tiene dominio transmembranal (Plamman *et al.*, 1995). El gene *asgB* codifica para un polipéptido de 163 amino ácidos con un dominio de unión a DNA cerca de su extremo carboxilo terminal (Plamman *et al.*, 1994). El gene *asgC* codifica para un factor sigma cuya actividad quizás sea afectada por moléculas como el ppGpp durante fase estacionaria de crecimiento (Hernández y Cashel, 1995). Probablemente, el papel de AsgA en la generación de la molécula señal A es servir como un detector de la señal de hambruna y transducir ésta señal a un regulador de respuesta (AsgB) quien en su forma no fosforilada actuaría como un represor de desarrollo temprano del cuerpo fructífero. Este evento podría permitir al factor sigma AsgC transcribir aquellos genes blanco necesarios para la generación de la molécula señal A (Kaplan *et al.*, 1991). El estudio de genes regulados por la molécula señal A ha puesto al descubierto un sistema de obtención y respuesta de la señal A que involucra a las histidín cinasa SasS y a su regulador de respuesta SasR, quien es un factor transcripcional de genes que específicamente responden a la señal A. SasN es un regulador negativo de ésta respuesta (Yang y Kaplan, 1997; Fig. 6).

### **Compuestos microbianos: mensajes moleculares**

Para defenderse de organismos competitivos, muchas bacterias secretan péptidos que tienen actividad antimicrobiana (AMBs). En general, estos péptidos son ricos en cisteínas y de naturaleza hidrofóbica (Klaenhammer, 1993). Existen dos familias principales de péptidos antimicrobianos (AMP “**A**ntimicrobial **P**eptides):

**Bacteriocinas.** Las bacteriocinas son sustancias químicas con actividad bactericida de naturaleza proteica que son producidas por células procariontes y eucariontes. El término bacteriocina fue originalmente usado para definir a las proteínas antimicrobianas parecidas a la colicina producida por *Escherichia coli*, pero se diferencian por sus pesos moleculares y espectro de actividad inhibitoria (Pattus *et al.*, 1990; Konisky, 1982; Pugsley, 1984). El grupo más estudiado de bacteriocinas lo constituyen las producidas por bacterias láctico-ácidas. Las bacteriocinas encontradas en gram positivos son muy pequeñas y consisten de 30 a 60 aminoácidos, por lo que son denominadas bacteriocinas peptídicas (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996).

Existen dos grupos principales de bacteriocinas formadas por péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos, que actúan rompiendo la membrana celular de las células blanco. El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas va de un pequeño grupo de microorganismos relacionados y que compiten por el mismo ambiente (Dykes, 1995) hasta un amplio grupo de microorganismos que incluye especies no relacionadas (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997). La clase I de bacteriocinas la forman los lantibióticos, mientras que la clase II la forman péptidos que generalmente no tienen modificaciones postraduccionales en los aminoácidos que los forman y que incluyen a moléculas producidas por bacterias gram positivas y algunas proteobacterias.

Los lantibióticos constituyen una familia no común de péptidos con actividad biológica antimicrobiana, se cree que forman poros transitorios en la membrana (Sahl, 1991), contienen residuos insaturados como dehidroalanina y dehidrobutirina, se caracterizan por tener puentes intramoleculares tioéter (-metil), denominados lantioninas, formados por la adición de un grupo sulfidrilo derivado de la cisteína. Estos

puentes determinan la estructura policíclica de los lantibióticos dando origen a los grupos A (estructura lineal) y al grupo B (circular; Jung, 1991).

Los lantibióticos del grupo A que han sido caracterizados son producidos por una variedad de bacterias gram positivas como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivaris*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus sake* y *Lactococcus lactis*. Este último produce el antibiótico más estudiado: nisina.

La subtilisina es un lantibiótico estructuralmente relacionado con la nisina, es producido por cepas de *B. subtilis*. Su biosíntesis es regulada de manera dependiente a la fase de crecimiento, muy parecida a la nisina, iniciando su producción durante la fase media a la fase tardía de crecimiento logarítmico y alcanzando la máxima producción en la fase estacionaria temprana (Gutowski-Eckel *et al.*, 1994). La subtilisina además de actuar como antimicrobiano (AMB) también actúa como un péptido de feromona secretado, que induce su propia biosíntesis estimulando la transducción de señales del sistema de dos componentes en una manera dependiente de “quorum sensing” (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Dunny y Leonard, 1997).

Los mecanismos reguladores para la secreción de bacteriocinas están basados en un péptido que funciona como feromona, designado IP (Inducer Peptide) que actúa como señal para un sistema de “quorum sensing” y regula la biosíntesis de varias proteínas de acuerdo a la densidad celular. Existe similitud entre los IPs y las bacteriocinas, ambos son péptidos catiónicos, parcialmente anfipáticos producidos como pre-péptidos con una secuencia líder en el N-terminal que contiene dos glicinas, lo que sugiere que son procesados y transportados por el mismo sistema ABC (Eijsink *et al.*, 1996; Hauge *et al.*, 1998). La principal diferencia entre las bacteriocinas y los IPs es su longitud, la bacteriocina más pequeña esta formada por más de 30 residuos, mientras que el IP más grande conocidos hasta ahora esta formado por 26 residuos de aminoácidos aunque algunos péptidos más pequeños pueden funcionar como IPs (Diep *et al.*, 1995). Más información sobre las bacteriocinas puede ser encontrado en el Capítulo 3 del Dr. José Muñoz Rojas.

**Butirolactonas.** El género *Streptomyces* pertenece a las bacterias gram positivas y tiene un ciclo de vida complejo. En las fases tempranas de crecimiento se forma una espora que germina para formar un micelio multinucleado, este proceso ocurre principalmente por medio de la extensión de pared celular en las puntas de las hifas. En respuesta a limitación de nutrientes se forma el micelio aéreo y las hifas que lo forman se segmentan en partes uninucleadas que dan origen a una nueva espora. Además de este proceso, *Streptomyces* es capaz de producir metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen actividad bactericida. Algunos informes han sugerido que estos dos procesos, morfológicos y fisiológicos podrían estar controlados por genes reguladores y compuestos comunes (Chater 1989a, 1989b y 1993). Uno de estos compuestos es el factor autorregulador denominado Factor A (2-iso-capriloil-3R-hidroximetil- $\beta$ -butirolactona) el cual induce la biosíntesis de estreptomycin y la formación de micelio aéreo en *Streptomyces griseus* (Khokhlov, 1982).

Parece ser que el factor A es producido por algunas células en el micelio en etapas tempranas de crecimiento y que éste difunde rápidamente hacia las hifas provocando así diferenciación a hifas aéreas, por lo que se considera un sistema análogo a las hormonas eucarióticas. En esta forma el factor A actúa como una molécula señal para la comunicación entre micelios cercanos estimulando esporulación rápida, que

representaría una ventaja de supervivencia en el ecosistema, en contraste con el poco crecimiento observado inducido por limitación de nutrientes. La síntesis del factor A ocurre a través de dos vías, la primera es a partir del glicerol, derivado del metabolismo de carbono, y la segunda a partir de b-ceto ácidos, derivados del metabolismo de ácidos grasos. Ambos son productos de la degradación de triglicéridos. Por otra parte existen una serie de moléculas homólogas al factor A que llevan a cabo procesos reguladores en metabolismo secundario y morfogénesis en varias especies de *Streptomyces*, cuyas moléculas reguladoras poseen un anillo  $\beta$ -butirolactona.

La producción de la señal A, está a cargo del gen *afsA*, que se encuentra cerca de uno de los extremos del cromosoma lineal (Lezhava *et al.*, 1997). Por los estudios realizados por Horinouchi y colaboradores, (1984, 1989) se ha propuesto que AfsA es una enzima que cataliza la formación del factor A a partir de precursores presentes en *Streptomyces*, posiblemente glicerol y  $\beta$ -ceto ácidos. Además, la producción del factor A fue inhibida en una forma dosis dependiente, por cerulenina, un compuesto que inhibe la biosíntesis de ácidos grasos lo cual sugiere fuertemente que *afsA* cataliza la condensación de un glicerol (C3) y un  $\beta$ -ceto ácido (C10).

La proteína receptora del factor A, es la proteína ArpA, detectada en la fracción citoplásmica de *S. griseus* (Miyake *et al.*, 1989). El receptor une al factor A en una proporción molar 1:1 con una constante de disociación  $K_d = 0.7$  nM, este valor es consistente con la concentración a la cual el factor A es eficiente *in vivo* ( $10^{-9}$  M) y es comparable a la encontrada en algunos receptores hormonales eucariontes. Parece ser que el factor A carece de actividad de unión a la membrana, lo cual explicaría su libre difusión a través de las membranas del micelio sin la necesidad de un receptor de superficie. ArpA es una proteína de 276 amino ácidos con una masa molecular aproximada de 29.1 kDa (Onaka *et al.*, 1995), que contiene un motivo de unión a DNA  $\beta$ -hélice-vuelta- $\beta$ -hélice en el extremo amino terminal, lo cual sugiere que efectúa su papel regulador interactuando directamente con el DNA. Algunos reportes de estudios genéticos de ArpA (Miyake *et al.* 1990 y Onaka *et al.*, 1995, 1997) han demostrado que esta proteína sirve como un represor del metabolismo secundario y morfogénesis.

Horinouchi y colaboradores encontraron una secuencia palindrómica consenso de 22 pares de bases a la cual se une ArpA en ausencia del factor A, lo cual está de acuerdo con la idea de que ArpA se une al DNA como homodímero (Onaka *et al.*, 1995), una unidad se une a la mitad del palíndrome y la otra unidad a la mitad restante. ArpA no se une al DNA cuando el factor A se encuentra en concentraciones entre 32 y 160 nM, y, además, la adición exógena del factor A al complejo DNA-ArpA ocasiona la liberación de ArpA del DNA, lo cual sugiere que éste se une al extremo carboxilo terminal de ArpA, causando un cambio conformacional en el amino terminal, que ocasiona su disociación del DNA. El factor A es producido en una forma dependiente de crecimiento y alcanza concentraciones de 100nM, por lo que el modelo de regulación del factor A sería el siguiente: Durante la fase temprana de crecimiento ArpA se une a ciertos promotores previniendo la expresión de algunos genes, pero cuando el factor A alcanza la concentración de detección umbral, se une a ArpA y libera a esta proteína del DNA, permitiendo la transcripción y traducción de proteínas dependientes del factor A que transmiten la señal a genes que participan en la biosíntesis de estreptomycinina y morfogénesis (Horinouchi y Beppu, 1994; Vujaklija *et al.*, 1993).

## Comunicación celular entre bacterias asociadas a organismos superiores

Debido a los diversos procesos evolutivos que han ocurrido a través del tiempo, las bacterias han desarrollado formas de vida en asociación a organismos superiores, algunas de estas relaciones pueden ser dañinas para el hospedero, mientras que en otras pueden beneficiarse tanto huésped como hospedero. Muchas de estas relaciones se llevan a cabo a través de una regulación mediada por autoinductores.

***Rhizobium leguminosarum.*** *Rhizobium leguminosarum* es una bacteria gram negativa que vive en simbiosis con algunas leguminosas, ésta se une a las vellosidades de las raíces y se internaliza a través de ellas. Como parte de su ciclo de vida se diferencia en bacteroides, esta diferenciación ocurre en estructuras denominadas nódulos que se forman en la corteza de la raíz y es el lugar donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (Ver Capítulo de Wang *et al.*, *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas). En el caso de *R. leguminosarum* bv *viciae*, los genes necesarios para colonización, nodulación y fijación se encuentran en un plásmido Sym, llamado pRL1JI (Hirsh, 1979; Wisniewski-Dye y Downie, 2002). Esta cepa de *R. leguminosarum* parece producir múltiples acil-HSLs (Gray *et al.*, 1996), algunas de ellas al asociarse con RhiR, codificado por *rhiR*, activan la expresión de *rhiABC* (Crockford *et al.*, 1995), que posiblemente participan en interacciones en la rizósfera.

***Rhizobium etli.*** *Rhizobium etli* es una bacteria simbiote del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que produce al menos siete diferentes moléculas autoinductoras (AI). Rosemeyer y colaboradores identificaron el sistema de quórum sensing *rail/raiR* (Rosemeyer *et al.*, 1998). Mutantes en *rail* presentan un fenotipo de bajo número de nódulos pero su efectividad en fijación de nitrógeno no es afectada. Además, en el sobrenadante de cultivos de mutantes en *rail* sólo se detectaron tres AI, lo que implica a *rail* en la síntesis de al menos cuatro AI. Algunas de estas moléculas tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de otras especies de rhizobia (Daniels *et al.*, 2002).

***Agrobacterium tumefaciens.*** *Agrobacterium tumefaciens*, pertenece a las bacterias gram negativas, ésta infecta a plantas causando tumores en sus hospederos. El mecanismo de infección se lleva a cabo mediante la transferencia a la planta de una secuencia que forma parte del plásmido, llamado plásmido Ti, que contiene los genes responsables de transferencia del DNA por medio de conjugación (genes *tra*) y los genes requeridos para la transformación de la planta (genes *vir*) (Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Farrand *et al.*, 1996). Una vez que se forma el tumor, éste libera sustancias llamadas opinas, que sirven a la bacteria como alimento para la colonización (Dessaux *et al.*, 1992), dentro de estas moléculas se encuentran la nopalina y octopina entre otras. Las enzimas requeridas para el catabolismo de estas moléculas son codificadas por genes que también se encuentran en el plásmido Ti.

Zhang y Kerr (1991) observaron que la transferencia del plásmido Ti era estimulada por una molécula de bajo peso molecular a la que denominaron CF (factor de conjugación) y que después se caracterizó como 3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL) y 3-oxo-C6-HSL.

En 1993, Piper y colaboradores observaron que había una secuencia río arriba de un gen al que denominaron *traR* que era similar a *luxR* en *Vibrio fischeri* y realizaron

experimentos que los condujeron a pensar que TraR era el receptor del autoinductor 3-oxo-C8-HSL, cuya producción podría ser dirigida por un gen tipo *luxI*, identificado y caracterizado como *traI* por Hwang y colaboradores en 1994 (Piper *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1994).

Estos estudios también demostraron que la producción de feromonas por *traI* esta regulada positivamente por TraR, además se identificó a otro gen *traM* cuyo producto (TraM) interactúa con TraR actuando como antagonista y cuya producción también se regula positivamente por TraR (Hwang *et al.*, 1995; Fig. 8).

La regulación dependiente de quorum sensing en los plásmidos dependientes de opinas fue descrita por Fuqua y Winans (1996b) quienes propusieron un modelo de regulación en el cual el complejo octopina-receptor (OCCR) activa la transcripción de *traR* y a su vez TraR se une al autoinductor (AAI) y regula la expresión de *traM*, genes de movilización (*tra*) y de sí mismo (*traR*) (Fig. 8).

En los plásmidos Ti dependientes de octopina se han encontrado 5 promotores dependientes de TraR que contienen secuencias conservadas que se han denominado cajas *tra* (Fuqua y Winans, 1996a, 1996b), a las cuales posiblemente se une un dímero de TraR (Fig. 8).

***Staphylococcus aureus.*** *Staphylococcus aureus* pertenece a las bacterias gram positivas, se caracteriza por su amplio espectro de infección, y se sabe que su patogenicidad es un proceso multifactorial que involucra un grupo de proteínas extracelulares entre las cuales se encuentran citotoxinas, toxinas de cheque tóxico, enterotoxinas y factores de superficie, que le permiten adherirse a tejido, resistir las defensas celulares y fagocitosis, entre otros (Projan y Novick, 1997).

Los factores de patogenicidad se expresan de manera ordenada durante el desarrollo de la infección. La expresión de estas proteínas comienza en la fase exponencial temprana, donde se producen proteínas de unión, en la fase exponencial tardía. Al final de la fase exponencial la expresión de genes que codifican factores extracelulares patogénicos aumenta y cesa cuando la célula entra a fase estacionaria.

La expresión de estos genes en *S. aureus* se lleva a cabo mediante el sistema *agr* (accessory gene regulation), denominado de esta forma porque no es necesario para crecimiento o división celular, pero mutantes en este sistema muestran virulencia atenuada (Foster *et al.*, 1990).

El sistema *agr* esta constituido por dos unidades transcripcionales dirigidas por promotores divergentes (Novick *et al.*, 1995). Una característica importante en este sistema es que la activación se puede llevar a cabo con una concentración muy baja del autoinductor, aunque la acumulación de éste produce la máxima respuesta.

***Pseudomonas aeruginosa.*** En *P. aeruginosa* existen dos sistemas “sensores de quórum” que actúan en serie, LasI-LasR y RhII-RhIR, ambos dependientes de acil-HSL. A una alta densidad celular, la concentración de ambas acil-HSL es alta y LasR se une a su acil-HSL específica para activar la expresión de genes blanco. Uno de éstos genes activados por el complejo acil-HSL-LasR es *rhlR* que codifica para un segundo receptor de acil-HSL, RhIR. RhIR entonces une a su cognado autoinductor de acil-HSL y éste complejo induce la expresión de sus genes blanco. Entonces, los genes controlados por LasIR son expresados antes de los controlados por el sistema RhIR. Este patrón temporal de regulación genética permite a *P. aeruginosa* expresar diferentes factores de



virulencia a diferentes estadios dentro de un proceso de infección (Pesci e Iglewski, 1997). Las dos señales de acil-HSL de *P. aeruginosa* promueven virulencia en una variedad de huéspedes diferentes, el ejemplo más importante en humanos son los pulmones de pacientes con fibrosis quística. No sólo el pulmón es susceptible al daño causado por los factores de virulencia controlados por las señales de acil-HSL sino también es vulnerable a efectos directos de las acil-HSL. Los factores de quórum de *P. aeruginosa* inducen la producción de interleucina 8 (IL-8) en los pulmones de pacientes afectados por fibrosis quística, como resultado, neutrófilos son reclutados al pulmón y ésta acción facilita la formación de una potente infección de *P. aeruginosa*. Así, en éste sistema, las acil-HSL dirigen la expresión de genes bacterianos y de factores del huésped que aceleran el proceso de infección (Smith *et al.*, 2001; mayores detalles de los sistemas de quórum de *P. aeruginosa* se pueden encontrar en el capítulo de la Dra. Gloria Soberón-Chávez).

### **Biopelículas: estructuras de interacción entre bacterias**

En la naturaleza, la colonización de hábitats por una mezcla de poblaciones bacterianas es un proceso muy común. Dentro de estos grupos de bacterias existen una gran variedad de interacciones físicas y metabólicas necesarias para la adhesión, crecimiento y supervivencia, además de aumentar la resistencia de estos grupos a ambientes hostiles para su desarrollo. Estas interacciones entre mezclas de microorganismos son denominadas comunidades microbianas y generalmente se encuentran adheridas a una superficie, organizadas en una comunidad denominada biopelícula. Estas comunidades han sido descritas en hábitats que van desde ambientes acuáticos, superficies de plantas, suelo, aparatos médicos, sistemas de filtración hasta el tracto digestivo de humanos y animales (Costerton *et al.*, 1987; Flemming y Schaule, 1996).

Dentro de las comunidades bacterianas parecen existir respuestas cooperativas que pueden involucrar protección al oxígeno u otras interacciones que dependen de la presencia de bacterias facultativas en esa comunidad. Los mecanismos a través de los cuales se pueden llevar a cabo estas respuestas pueden ser mediados por interacciones físicas o metabólicas entre bacterias anaeróbicas y facultativas, estas condiciones permiten la supervivencia de anaerobios en condiciones de aerobiosis (Bradshaw *et al.*, 1997 y 1998).

Entre otras de las ventajas ecológicas que proporciona la vida en comunidad se encuentran un mayor rango de hábitats para colonizar, aumento en la diversidad y eficiencia metabólica, mayor resistencia a estrés ambiental y a factores de defensa del organismo hospedero (Caldwell *et al.*, 1997a, 1997b; Saphiro, 1998).

El proceso de formación de una biopelícula involucra una serie de eventos, el primero de ellos es el transporte o movimiento de los microorganismos hacia el sustrato donde se adherirán, al llegar allí las bacterias pueden o no adherirse dependiendo de las fuerzas de interacción con ese sustrato (Rutter y Vincent, 1980), esta adhesión inicial es reversible (Norde y Lyklema, 1989), pero en ausencia de producción de exopolímeros se vuelve menos reversible debido a la pérdida progresiva de agua (Meinders *et al.*, 1995). Una vez que se han adherido los colonizadores iniciales o primarios, los colonizadores secundarios se coadhieren a estas superficies (Kolenbrander, 1989), posteriormente el crecimiento celular guía a la acumulación microbiana en el biofilm.

Los mecanismos a través de los cuales las bacterias son transportadas hacia una superficie incluyen contacto al azar con el sustrato debido al movimiento Browniano, sedimentación por diferencias en gravedad específica entre las bacterias y el medio en el que se encuentra, transporte hacia la superficie por el movimiento del medio y transporte activo mediado por actividad flagelar que puede incluir o no quimiotaxis (Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

La motilidad juega un papel muy importante en la formación de biopelículas de *Escherichia coli*, lo que sugiere que ésta es necesaria para contrarrestar las fuerzas repulsivas de la superficies y es un factor importante para la interacción inicial y movimiento a lo largo de ella. La presencia del pili tipo I es esencial para la adhesión inicial de *E. coli* (Pratt y Kolter, 1998) y para la síntesis de fibras de curli que son fibras de superficie que participan en interacciones directas de células con el sustrato y con células del hospedero (Prigent-Combaret, *et al.*, 2000). El proceso de formación de biopelículas también se ve influenciado por factores externos como el ambiente nutricional (Pratt y Kolter, 1998; Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002a; 2002b).

Después de la adhesión, comienza la formación de microcolonias, en *Burkholderia cepacia* el sistema CepR-CepI (homólogos de LuxR-LuxI) está involucrado en la formación de microcolonias y maduración del biofilm (Huber *et al.*, 2001). En esta fase los microorganismos se rodean por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que tienen un papel importante en la estructura y propiedades fisicoquímicas de estas comunidades (Wingender *et al.*, 1999). La producción de EPS precede a la adhesión al sustrato. Los EPS forman una estructura tridimensional con canales acuosos que permiten el importe de nutrientes y la exportación de sustancias de desecho. La proporción de EPS en un biofilm va de un 50 a 90% del total de la materia orgánica (Christensen y Characklis, 1990; Nielsen *et al.*, 1997).

Los EPS están constituidos por proporciones variadas de carbohidratos y lípidos, en algunos casos los polisacáridos son alginato como en *Pseudomonas aeruginosa* (Davies *et al.*, 1993; 1998) La sobreproducción de alginato en *P. aeruginosa* modifica la estructura tridimensional del biofilm, haciéndolo más heterogéneo y formado principalmente por grandes columnas (Hentzer, *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 1999). En *E. coli* K-12 la producción de ácido colánico (EPS) tiene un papel muy importante para la formación de la estructura tridimensional del biofilm (Danese, *et al.*, 2000).

Finalmente, la disgregación de un biofilm se ve influenciada por el ambiente externo. Algunos de los factores que afectan este proceso son los cambios en el medio, disminución de la disponibilidad de nutrientes (Stoodley *et al.*, 1999), propiedades electroquímicas dentro del biofilm (Characklis *et al.*, 1990) y limitación del sustrato (Peyton y Characklis, 1993) o bien afectada por metabolismo, como la proteína reguladora de unión a RNA, CsrA (carbon storage regulator) que actúa como represor de la formación de biofilm y activa la disgregación del mismo en diferentes condiciones de cultivo (Jackson *et al.*, 2002).

El modelo propuesto por O'Toole *et al.* (2000) para describir todo el proceso de agregación y desagregación sugiere que las células en estado planctónico reciben señales ambientales que ocasionan la adhesión inicial al sustrato, después de ello, las bacterias

comienzan a comunicarse unas con otras en un proceso denominado “quórum sensing” y estas señales guían a la formación de microcolonias que formaran el biofilm maduro, una estructura tridimensional con forma de hongo embebida en una matriz de EPS. Finalmente nuevas señales indican a la bacteria su disgregación del biofilm para regresar al estadio planctónico, completando así el ciclo (Fig. 9).

Las células que se encuentran en un biofilm, muestran diferencias fisiológicas con las células planctónicas (O’Toole *et al.*, 1999; 2000) así como patrón de expresión génica diferente. Existe represión de genes de pili y flagelo, ya que aunque son necesarios para el inicio de la formación de biofilm, probablemente no son necesarios para la maduración de la estructura, además hay inducción de genes que tienen que ver con resistencia a antibióticos (Whiteley *et al.*, 2001).

Algunas enzimas glicolíticas involucradas en el metabolismo energético, como la formación de ácidos, son reprimidas en biopelículas, mientras que las proteínas necesarias para procesos biosintéticos, como de síntesis y plegamiento de proteínas, así como replicación, tienen una expresión aumentada (Svensäter *et al.*, 2001).

Una de las formas de estudiar una biopelícula es el método desarrollado por O’Toole *et al.* (1999), en el cual inoculan placas de 96 pozos de PVC (cloruro de polivinilo) con cultivos en medio líquido, e incuban a cierta temperatura, después de la incubación los cultivos de las placas son desechados y los pozos se lavan con agua y se tiñen con cristal violeta al 0.1%. Para cuantificar el biofilm se eluye el colorante con acetona-etanol y se mide con la absorbancia a 570 nm. Además se ha observado que la formación de biofilm en *E. coli* es favorecida en medio LB suplementado con 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS) (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002).

## **Conclusiones y perspectivas**

Sin duda alguna, el vivir en comunidad hace necesario desarrollar una forma de comunicación con los demás integrantes, la capacidad de comunicarse unos con otros proporciona ventajas en diferentes aspectos, como ventajas metabólicas, mayor obtención de nutrientes, resistencia a antibióticos y en general una mejor organización para llevar a cabo un proceso determinado.

Además, la capacidad para desarrollar no sólo un lenguaje que permita comunicarse entre organismos de la misma especie, sino un lenguaje que aparentemente no tiene fronteras, pues permite comunicarse tanto con otras bacterias y hasta tal vez con algunos organismos superiores, otorga mayores ventajas dentro del nicho ecológico, posiblemente el organismo más social puede tener ventajas para su supervivencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Trabajo en nuestro laboratorio ha sido apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de un donativo para Jóvenes Investigadores J-33369-N y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través de un donativo del PAPIIT IN205200.

## **REFERENCIAS**

1. **Alt-Mörbe, J., Stryker, J. L., Fuqua, S., Farrand, S. K. y Winans, S. C.** 1996. The conjugal transfer system of *A. tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes. *J. Bacteriol.* **178**:4248-4257.
2. **Bassler, B. L.** 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:582-587.
3. **Bassler, B. L., Greenberg, E.P. y Stevens, A.M.** 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **179**:4043-4045.
4. **Bassler, B. L., Wright, M. y Silverman, M. R.** 1994a. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **12**:403-412.
5. **Bassler, B. L., Wright, M. y Silverman, M. R.** 1994b. 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.
6. **Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. y Silverman, M. R.** 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* **9**:773-786.
7. **Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. y Allison, C.** 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect. Immun.* **66**:4729-4732.
8. **Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K. y 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.
9. **Caldwell, D. E., Atuku, E., Wilkie, D. C., Wivchoruk, K. P., Karthikeupn, S., Korber, D. R., Schmid, D. F. y Wolfaardt, G. M.** 1997a. Germ theory vs community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilm. *Adv. Dent. Res.* **11**:4-13.
10. **Caldwell, D. E., Wolfaardt, G. M., Korber, D. R. y Lawrence, J. R.** 1997b. Do bacterial communities transcend Darwinism? *Adv. Microb. Ecol.* **15**:105-191.
11. **Cao, J.-G. y Meighen, E. A.** 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *V. harveyi*. *J. Biol. Chem.* **264**:21670-21676.
12. **Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E. y Holo, H.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **143**:2287-2294.
13. **Characklis, W. G., McFeters, G. S. y Marshall, K. C.** 1990. Physiological ecology in biofilm systems, p. 341-394. In Characklis, W. G., McFeters, G. S. y Marshall, K. C. (ed.), *Biofilms*. Wiley. New York.
14. **Chater, K. F.** 1989a. Sporulation in *Streptomyces* p. 277-299. In Smith, I., Slepecky, R. A. y Setlow. P. (ed) Regulation of prokaryotic Development: Structural and functional Analysis of bacterial sporulation and Germination. American Society for Microbiology. Washington. D. C.

15. **Chater, K. F.** 1989b. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trend. Genet.* **5**:372-377.
16. **Chater, K. F.** 1993. Genetic of ferentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:685-713.
17. **Chen, X., Schauder, S., Potter, N., Van Dorsseleer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L. y Hughson, F. M.** 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* **415**:545-549.
18. **Christensen, B. E. y Characklis, W. G.** 1990. Physical and chemical properties of biofilms, p. 93-130. In Characklis, W. G. y Marshall, K. C. (ed.), *Biofilms*. Wiley. New York.
19. **Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E. y Nes, I. F.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4321-4330.
20. **Corona-Izquierdo, F. P. y Membrillo-Hernández, J.** 2002. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(*N*-morpholino)propane sulfonate (MOPS). *Res. Microbiol.* **153**: 181-185.
21. **Corona-Izquierdo, F. P. y Membrillo-Hernández, J.** 2002. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**:105-110.
22. **Costerton, J. W., Chen, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. y Marrie, T. J.** 1987. Bacterial biofilm in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
23. **Crockford, A. J., Davis, G. A. y Williams, H. D.** 1995. Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Microbiology.* **141**:843-851.
24. **Danese, P. N., Pratt, L. A. y Kolter, R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**:3593-3596.
25. **Daniels, R., De Vos, D. E., Desair, J., Raedschelders, F., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J., y Michiels, J.** 2002. The *cin* quórum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* **277**:462-468.
26. **Davies, D. G., Chakrabarty, A. M. y Geesey, G. G.** 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1181-1186.
27. **Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. y Greenberg, E. P.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**: 295-298.
28. **de Kievit, T. R. e Iglewski, B. H.** 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* **68**:4839-4849.
29. **Dessaux, Y., Petit, A. y Tempe, J.** 1992. Opines in *Agrobacterium* biology, p. 109-136. In D. P. S. Verma (ed.), *Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
30. **Diep, D. B., Håvarstein, L. S. y Nes, I. F.** 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* **18**:631-639.

31. **Diep, D. B., Håvarstein, L. S. y Nes, I. F.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* **178**:4472-4483.
32. **Dunny, G. M. y Leonard, B. A. B.** 1997. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:527-564.
33. **Dykes, G. A.** 1995. bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Trends Ecol. Evol.* **10**:186-189.
34. **Dworkin, M. y Kaiser, D.** 1985. Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science.* **230**:18-24.
35. **Eijsink, V. G. H., Brurberg, M. B., Mid del Hoven, P. H. y Nes, I. F.** 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* **178**:2232-2237.
36. **Engebrecht, J. y Silverman, M.** 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:4154-4158.
37. **Engebrecht, J. y Silverman, M.** 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res.* **15**:10455-10467.
38. **Farrand, S. K., Hwang, I. y Cook, D. M.** 1996. The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4 and F. *J. Bacteriol.* **178**:4233-4247.
39. **Flemming, H.-C. y Schaule, G.** 1996. Biofouling, p. 39-54. In Heitz, E., Sand, W. y Flemming, H.-C. (ed.), *Microbially influenced corrosion of materiaol-Scientific and technological aspects*, Springer, Heidelberg.
40. **Foster, T. J., O'Reilly, M., Phonimdaeng, P., Cooney, J., Patel, A. H. y Bramley, A. J.** 1990. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. Properties of coagulase and gamma-toxin, alpha-toxin, beta-toxin and protein A in the pathogenesis of *S. aureus* infections, p. 403-420. In R. P. Novick (ed.), *Molecular Biology of the Staphylococci*. VCH publishers, New York.
41. **Fuqua, W. C. y Winans, S. C.** 1996a. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* **178**:435-440.
42. **Fuqua, W. C. y Winans, S. C.** 1996b. Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol. Microbiol.* **20**:1199-1210.
43. **Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:727-751.
44. **Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.
45. **Gray, K. M., Pearson, J. P., Downie, J. A., Boboye, B. E. A. y Greenberg, E. P.** 1996. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J. Bacteriol.* **178**:372-376.
46. **Gutowski-Eckel, Z., Klein, C., Siegers, K., Bohm, K., Hammelmann, M. y Entian, K.-D.** 1994. Growth phase-dependent regulation and membrane

- localization of SpaB, a protein involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1-11.
47. **Hagen, D. C., Bretscher, A. P. y Kaiser, D.** 1978. Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **64**:284-296.
  48. **Hastings, J. W. y Nealson, K. H.** 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**:549-595.
  49. **Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. y Eijsink, V. G. H.** 1998. Amphiphilic  $\alpha$ -helices are important structural motifs in the  $\alpha$  and  $\beta$  peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G and helicity is enhanced upon  $\alpha$ - $\beta$  interaction. *Eur. J. Biochem.* **251**:565-572.
  50. **Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G.T., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. y Parsek, M. R.** 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* **183**:5395-5401.
  51. **Hernández, V. J. y Cashel, M.** 1995. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli*  $s^{70}$  mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **252**:536-549.
  52. **Hirsch, P. R.** 1979. Plasmid.determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **113**:219-228.
  53. **Horinouchi, S. y Beppu, T.** 1994. A-factor as microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **12**:859-864.
  54. **Horinouchi, S., Kumada, Y. y Beppu, T.** 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**:481-487.
  55. **Horinouchi, S., Suzuki, H., Nishiyama, M., y Beppu, T.** 1989. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* **171**:1206-1210.
  56. **Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. y Eberl, L.** 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology.* **147**:2517-2528.
  57. **Hwang, I., Cook, D. M. y Farrand, S. K.** 1995. A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J. Bacteriol.* **177**:449-458.
  58. **Hwang, I., Pei-Li, L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E. y Farrand, S. K.** 1994. TraI, a LuxI homolog, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **914**:4639-4643.
  59. **Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., Romeo, T.** 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:290-301.
  60. **Jung, G.** 1991. Lantibiotics: a survey, p. 1-34. *In* J. Jung and Sahl, H.-G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics: Proceedings of the First International Workshop on Lantibiotics*. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

61. **Kaplan, H. B., Kuspa, A. y Kaiser, D.** 1991. Suppressors that permit A-signal-independent developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:1460-1470.
62. **Khokhlov, A. S.** 1982. Low molecular weight microbial bioregulators of secondary metabolism, p. 97-109. In V. Krumphanzl, B. Sikyta, and Z. Vanek (ed.), *Overproduction of Microbial Products*. Academic Press, London.
63. **Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
64. **Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M. y Kuipers, O. P.** 1997a. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4581-4584.
65. **Kleerebezem, M., Quadri, L. E. N., Kuipers, O. P. y de Vos, W. M.** 1997b. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **24**:895-904.
66. **Kolenbrander, P. E.** 1989. Surface recognition among oral bacteria: multi-generic coaggregations and their mediators. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**:137-155.
67. **Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**:125-144.
68. **Kuner, J. M. y Kaiser, D.** 1981. Introduction of transposon Tn5 into *Myxococcus* for analysis of developmental and other non selectable mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:425-429.
69. **Kuspa, A., Kroos, L. y Kaiser, D.** 1986. Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**:267-276.
70. **Kuspa, A., Plamman, L. y Kaiser, D.** 1992. A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **174**:7360-7339.
71. **Kuspa, A. y Kaiser, D.** 1989. Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J. Bacteriol.* **171**:2762-2772.
72. **Lazazzera, B. A. y Grossman, A. D.** 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* **6**:288-94.
73. **Lezhava, A., Kameoka, D., Sugino, H., Goshi, K., Shinkawa, H., Nimi, O., Horinouchi, S., Beppu, T. y Kinashi, H.** 1997. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* **253**:478-483.
74. **McVittie, A., Messik, F. y Zahler, S. A.** 1962. development biology of *Myxococcus*. *J. Bacteriol.* **84**:546-551
75. **Meinders, J. M., Van der Mei, H. C. Y Busscher, H. J.** 1995. Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. *J. Colloid Interface Sci.* **176**:329-341.
76. **Miller, B. M. y Bassler, B. L.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-199.
77. **Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, M., Chiba, N., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N. y Beppu, T.** 1989. Detection and properties of A-factor binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**:4298-4302.
78. **Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S. y Beppu, T.** 1990. The A- factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**:3003-3008.



79. **Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. y Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **70**:17-32.
80. **Nielsen, P.-H., Jahn, A. y Palmgren, R.** 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* **36**:11-19.
81. **Norde, W. y Lyklema, J.** 1989. Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid-chemical approach. *Colloids Surf.* **38**:1-13.
82. **Novick, R. P., Projan, S., Kornblum, J., Ross, H., Kreiswirth, B. y Moghazeh, S.** 1995. The *agr* P-2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **248**:446-458.
83. **Nuñez, C., Moreno, S., Soberón-Chávez, G. y Espin, G.** 1999. The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* **181**:141-148.
84. **O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B. y Kolter, R.** 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* **310**:91-109.
85. **O'Toole, G. A., Kaplan, H. B. y Kolter, R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
86. **Onaka, H. y Horinouchi, S.** 1997. DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* **24**:991-1000.
87. **Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. y Horinouchi, S.** 1995. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**:6083-6092.
88. **Parkinson, J. S. y Kafoid, E. C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**:71-112.
89. **Pattus, A., Massotte, D., Willmsen, H. U., Lakey, J., Tsernoglou, D., Tucker, A. y Parker, M. W.** 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* **46**:180-192.
90. **Pesci, E. C. e Iglewski, B. H.** 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends in Microbiol.* **5**:132-134.
91. **Peyton, B. M. y Characklis, W. G.** 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear-stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:728-735.
92. **Piper, K. R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S. K.** 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature.* **362**:448-450.
93. **Plamman, L., Davis, J. M., Cantwell, B. y Mayor, J.** 1994. Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:2013-2020.
94. **Plamman, L., Li, Y., Cantwell, B. y Mayor, J.** 1995. The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* **177**:2014-2020.
95. **Pratt, L.A. y Kolter R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**:285-293.
96. **Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Thuy Le Thi, T., Vidal, O., Lejeune, P. y Dorel, C.** 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing

- Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* **2**:450-464.
97. **Projan, S. y Novick, R.** 1997. The molecular basis of virulence, p. 55-81. In G. Archer and K. Crossley (ed.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
  98. **Pugsley, A. D.** 1984. The ins and outs of colicins. Part I: Production and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **7**:168-175.
  99. **Reichenbach, H.** 1993. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. pp. 13-62. En M. Dworkin y D. Kaiser (eds.), *Mixobacteria II*. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
  100. **Rosemeyer, V., Michiels, J., Verreth, C. y Vanderleyden, J.** 1998. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **180**:815-821.
  101. **Rutter, P. R. y Vincent, B.** 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physicochemical aspects, p. 79-91. In Berkeley, R. C. W., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter, P. R. y Vincent, B. (ed.), *Microbial adhesion to surfaces*. Ellis Horwood. London.
  102. **Sahl, H.-G.** 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, p. 347-359. In J. Jung and Sahl, H.-G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics: Proceedings of the First International Workshop on Lantibiotics*. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
  103. **Saphiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:81-104
  104. **Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. y Bassler, B. L.** 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41**:463-476.
  105. **Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C. Cronan, J. E., Rinehart, K. L. y Farrand, S. K.** 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6036-6041.
  106. **Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H. y Phipps, R. P.** 2001. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* **167**: 366-374.
  107. **Stoodley, P. J., Jørgensen, F., Williams, P. y Lappin-Scott, H. M.** 1999. The role of hydrodynamics and AHL signaling molecules as determinants of the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, p. 223-230. In Wimpenny, J., Gilbert, P., Walker, J., Brading, M. y Bayston, R. (ed.), *Biofilms: the Good, the Bad and the Ugly*. BioLine. Cardiff.
  108. **Surette, M. G., Miller, M. B. y Bassler, B. L.** 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**:1639-1644.

109. **Svensäter, G., Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D. y Hamilton, I.R.** 2001. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:139-146.
110. **Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. y Zehnder, J. B.** 1990. Influences of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**:75-87.
111. **Vujaklija, D., Horinouchi, S. y Beppu, T.** 1993. Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **175**:2652-2661.
112. **Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. y Greenberg, E. B.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* **417**:860-864.
113. **Wingender, J., Neu, T. R. y Flemming, H.-C.** 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? p. 1-19 *In* Wingender, J., Neu, T. R. y Flemming, H.-C. (ed.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer. Berlin.
114. **Wisniewski-Dye, F. y Downie, J. A.** 2002. Quorum sensing in Rhizobium. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**:397-407.
115. **Yang, C. y Kaplan, H. B.** 1997. *Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histine kinase required for early developmental gene expression. *J. Bacteriol.* **179**:7759-7767.
116. **Zhang, L. y Kerr, A.** 1991. A diffusible compound can enhance conjugal transfer of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **173**:1867-1872.