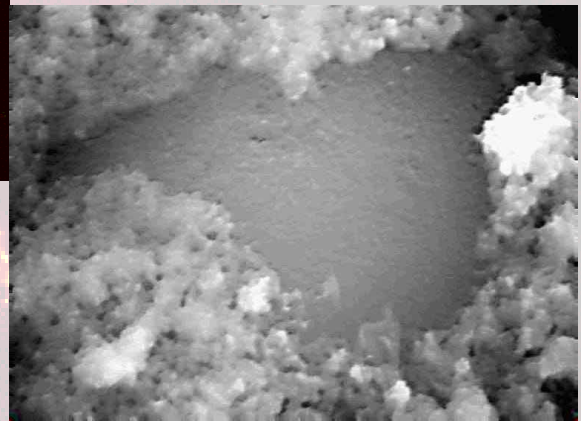
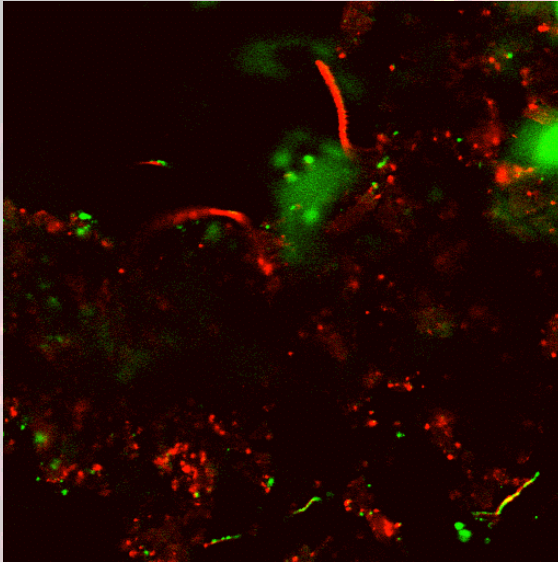


FORMACIÓ DE BIOFILMS I RISC SANITARI EN SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA



Jordi Morató i Farreras



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Universitat Autònoma de Barcelona

**FORMACIÓ DE BIOFILMS I RISC SANITARI EN
SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA**

Jordi Morató i Farreras

Departament de Genètica i Microbiologia
2001

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE CIÈNCIES
Departament de Genètica i Microbiologia

**FORMACIÓ DE BIOFILMS I RISC SANITARI EN
SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA**

Memòria presentada per optar al grau
de Doctor en Ciències Biològiques per
la Universitat Autònoma de Barcelona,

per

Jordi Morató i Farreras

Vº Bº,
Els directors de la tesi

Dr. Jordi Mas Gordi i Dr. Manuel A. Soler

Terrassa, febrer del 2001

Als meus pares

A la Montse

El murmurí de l'aigua
és la veu dels meus avantpassats.
Els rius són germans nostres,
ells ens apaguen la set.
Els rius porten les nostres canoes
i alimenten els nostres fills.

Gran Cabdill Seattle
"Nosaltres som una part de la Terra" (1855)

Índex de Continguts

RESUM

AGRAÏMENTS

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. CREIXEMENT MICROBIÀ A LES SUPERFÍCIES	4
1.1.1. Estratègies de colonització bacteriana de superfícies	4
1.1.2. Formació dels biofilms	6
1.1.3. Avantatges del creixement sèssil	11
1.2. FACTORS QUE GOVERNEN LA INTERACCIÓ MICROORGANISMES-SUPERFÍCIE	13
1.2.1. Processos fisico-químics	13
1.2.2. Processos biològics	18
1.2.3. Separació cel·lular de la superfície	19
1.3. IMPACTE DEL DESENVOLUPAMENT DE BIOFILMS	21
1.3.1. Distribució i ubiqüitat dels biofilms	21
1.3.2. Aspectes beneficiosos dels biofilms	21
1.3.3. Problemes causats pels biofilms	22
1.3.4. Control de la formació i l'extensió dels biofilms	23
1.4. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS DEL TREBALL	24
1.5. ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA DEL TREBALL	25
1.6. BIBLIOGRAFIA	26
2. SISTEMA EXPERIMENTAL PER A LA COLONITZACIÓ MICROBIANA DE SUPERFÍCIES	31
2.1. INTRODUCCIÓ	34
2.1.1. Hidrodinàmica de medis porosos: reactors de llit empaquetat	34
2.1.2. Similitud hidrodinàmica	38
2.1.3. Influència del biofilm en el règim hidràulic	38
2.2. MATERIAL I MÈTODES	43
2.2.1. Característiques del sistema: disseny, construcció i muntatge	43
2.2.2. Operació i optimització del sistema experimental	46
2.2.3. Mesures in situ	49
2.2.4. Proveïment d'aigua: zones de mostreig	49
2.2.5. Calibratge al laboratori: mesura de la pèrdua de càrrega	51
2.2.6. Efecte del material de suport en el desenvolupament del biofilm	55
2.2.7. Processat de les mostres: rentat i sonicació	56
2.2.8. Avaluació de la reproductibilitat de la formació de biofilms	59
2.2.9. Efecte de l'esforç de cisalla en el desenvolupament del biofilm	60
2.2.10. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós	61
2.2.11. Anàlisi estadística de les dades	62
2.3. RESULTATS	63
2.3.1. Rendiment del reactor de llit empaquetat	63
2.3.2. Calibratge en laboratori del sistema	66
2.3.3. Efecte del material de suport	73
2.3.4. Processat de les mostres: rentat i sonicació	75
2.3.5. Reproductibilitat de la colonització del material de suport	77
2.3.6. Efecte de l'estrès de cisalla	77
2.3.7. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós	80
2.4. DISCUSSIÓ	82
2.4.1. Idoneïtat de la tècnica utilitzada	82
2.4.2. Efecte de l'estrès de cisalla	84
2.4.3. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós	85
2.5. BIBLIOGRAFIA	86

3. AVALUACIÓ DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS EN SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA	89
3.1. INTRODUCCIÓ	92
3.1.1. Microbiologia de les aigües subterrànies	92
3.1.2. Reutilització d'aigües freàtiques per a la irrigació i estalvi hídic	97
3.1.3. Reutilització de l'aigua freàtica per a la irrigació de parcs i jardins a Sant Martí de Provençals (Barcelona)	99
3.1.4. Microbiologia de les xarxes d'aigua potable	101
3.2. MATERIAL I MÈTODES	109
3.2.1. Zona de mostreig I: Pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí-Besós)	109
3.2.2. Zona de mostreig II: Sabadell	111
3.2.3. Zona de mostreig III: Lab. Microbiologia-EUOOT	111
3.2.4. Anàlisis microbiològiques de mostres planctòniques i del biofilm	114
3.2.5. Identificació dels microorganismes	115
3.2.6. Recompte directe: Tinció de mostres planctòniques	116
3.2.7. Estima de la taxa específica de creixement del biofilm	118
3.2.8. Anàlisis químiques	118
3.3. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG I: SANT MARTÍ (BESÓS)	120
3.3.1. Microorganismes planctònics	120
3.3.2. Desenvolupament de biofilm a partir del pou de captació	122
3.3.3. Desenvolupament de biofilm a partir del dipòsit de reserva	123
3.3.4. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica	125
3.3.5. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms	128
3.3.6. Estima de la taxa específica de creixement	132
3.4. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG II: SABADELL	134
3.4.1. Microorganismes planctònics	134
3.4.2. Desenvolupament de biofilm	136
3.4.3. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica	140
3.4.4. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms	141
3.5. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG III: XARXA DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA POTABLE (LAB. MICROBIOLOGIA EUOOT-UPC)	144
3.5.1. Microorganismes planctònics	144
3.5.2. Desenvolupament de biofilm	146
3.5.3. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica	149
3.5.4. Canvis en la composició de la comunitat dels biofilms	150
3.6. DISCUSSIÓ	152
3.6.1. Microorganismes planctònics	152
3.6.2. Cinètiques de colonització	157
3.7. BIBLIOGRAFIA	166
4. CARACTERITZACIÓ DE BIOFILMS MITJANÇANT TÈCNiques DE MICROSCÒPIA	173
4.1. INTRODUCCIÓ	176
4.2. MATERIAL I MÈTODES	178
4.2.1. Tinció directa de biofilms	178
4.2.2. Microscòpia de les mostres	180
4.2.3. Anàlisi de l'estructura tridimensional dels biofilms	184
4.3. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG I: SANT MARTÍ (BESÓS)	185
4.3.1. Microscòpia dels biofilms	185
4.3.2. Viabilitat de les poblacions als biofilms	192
4.3.3. Estructura tridimensional dels biofilms: Gruix	195
4.4. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG II: SABADELL	196
4.4.1. Microscòpia dels biofilms	196
4.4.2. Viabilitat de les poblacions als biofilms	202
4.4.3. Estructura tridimensional dels biofilms: Gruix	203

4.5. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG III: XARXA DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA POTABLE (LAB. MICROBIOLOGIA EUOOT-UPC)	203
4.5.1. Microscòpia dels biofilms	203
4.5.2. Viabilitat de les poblacions als biofilms	205
4.5.3. Estructura tridimensional dels biofilms: Gruix	206
4.6. DISCUSSIÓ	207
4.6.1. Idoneïtat de les tècniques microscòpiques utilitzades	207
4.6.2. Arquitectura dels biofilms desenvolupats als reactors de llit empaquetat	208
4.6.3. Viabilitat de les poblacions als biofilms	211
4.7. BIBLIOGRAFIA	213
5. CONTROL DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS EN SISTEMES DE DISTRIBUCIÓ D'AIGÜES SUBTERRÀNIES	217
5.1. INTRODUCCIÓ	220
5.1.1. Condicionadors d'aigües	220
5.1.2. Condicionadors catalítics d'aigües	221
5.1.3. Activitat del catalitzador enfront dels microorganismes	222
5.2. MATERIAL I MÈTODES	223
5.2.1. Instal·lació del condicionador catalític	223
5.3. RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG I: SANT MARTÍ	224
5.3.1. Desenvolupament de biofilm en sistema catalitzat i sistema control	224
5.3.2. Comparació del nº de microorganismes en fase biofilm i planctònica	228
5.4. DISCUSSIÓ	230
5.5. BIBLIOGRAFIA	231
6. AVALUACIÓ DEL RISC SANITARI: FORMACIÓ DE BIOFILMS EN AIGÜES SUBTERRÀNIES REUTILITZADES	233
6.1. INTRODUCCIÓ	236
6.1.1. Avaluació del risc microbià per a la Salut Pública	236
6.1.2. Aspectes sanitaris de la reutilització d'aigua freàtica pel reg de parcs urbans	240
6.2. MATERIAL I MÈTODES	246
6.2.1. Disseny de l'avaluació del risc sanitari. Tractament estadístic de les dades	246
6.3. RESULTATS	247
6.3.1. Desenvolupament de l'esquema per avaluar el risc microbiològic per a la Salut Pública (Reutilització d'aigües subterrànies per a la irrigació de parcs i jardins urbans)	247
6.3.2. Contribució del biofilm a la càrrega microbiana de l'aigua	250
6.3.3. Determinació de l'índex de risc sanitari	254
6.4. DISCUSSIÓ	257
6.5. BIBLIOGRAFIA	259
7. DISCUSSIÓ GENERAL	261
8. CONCLUSIONS	267
9. ANNEXOS	271

AGRAÏMENTS

Sens dubte aquest ha estat, de moment, un dels viatges més interessants que m'ha tocat viure. És massa el que es va deixant al llarg del camí, com per pensar que les compensacions a aquest esforç no van més enllà de les científica o acadèmicament reconegudes. Segurament, la distància que sempre dóna el temps permetrà valorar els coneixements arreglats al llarg d'aquest dilatat itinerari.

En primer lloc agraeixo l'oportunitat que em van donar els directors d'aquesta tesi, Dr. Jordi Mas Gordi i Dr. Manuel A. Soler Manuel, de poder participar en els seus projectes i idees originals. Sens dubte, ells han estat els guies que han aconseguit tirar endavant un itinerari raonable per afrontar l'excursió amb certes garanties. En aquestes etapes inicials del recorregut, seria injust no citar la contribució del Dr. Jaume Mir, ja que com a mínim ell em va situar dins del camp de la microbiologia ambiental. També en aquestes etapes inicials vaig poder gaudir del suport de Mina Pública de Terrassa.

Afortunadament he pogut realitzar gran part del viatge acompanyat de persones com en Miguel Campaña i en Francesc Codony. En Miguel va contribuir de forma important en el disseny i desenvolupament del sistema per monitoritzar els biofilms, mentre que amb el Francesc hem col·laborat en els mostrejos microbiològics. D'altra banda, el treball de camp no s'hagués pogut realitzar sense la inestimable ajuda de companys, molts dels quals només han coincidit en etapes més curtes. El meu sincer agraïment a totes les persones que van col·laborar en els esgotadors mostrejos realitzats al pou d'Alfons el Magnànim (Barcelona) i a la mina de Ribatallada a Sabadell, especialment a Jesús Alonso, Josep Ramon Martínez i Núria Guitart. Conjuntament hem après que per a la microbiologia de camp també són bàsics els coneixements d'escalada, espeleologia, submarinisme, natació, mecànica, electrònica i, en alguns casos, defensa personal.

És inevitable que en un viatge tan llarg sorgeixin moments d'eufòria, moments de dubte i, a vegades, una certa desesperança. Totes aquestes etapes les he compartit des de l'inici amb els companys de despatx i de laboratori del Dept. d'Òptica i Optometria de la UPC, especialment amb la Dra. Marisol Marqués, la Sara Lluç, la Dra. Ma. Dolores Merindano i, com no, amb en Xavier Rocabayera. En etapes posteriors, també han contribuït la Marta Cerdà, la Carme Casanovas i la Carme Blasi i gent del taller com el Minguera i el Xavi Múrcia.

Després d'uns quants itineraris circulars que ens dirigien de retorn al punt inicial, va arribar la decisió de llançar-nos a les amèriques. En gran part va influir-hi el Dr. Ferran Ribas, cap de Microbiologia d'AGBAR. De fet, poder comptar amb l'ajut de la gent d'AGBAR, com el mateix Ferran o l'Anna Aira, ha estat un estímul constant i, alhora, ens ha mantingut en contacte amb els últims avenços realitzats en la microbiologia aquàtica.

S'havia passat el moment crític: es disposava ja d'un clar itinerari per arribar al final del camí i es sabia com fer-lo. Només calia una excusa per accelerar el ritme i començar a veure la sortida del túnel. L'estada al Center of Biofilm Engineering de la Montana State University va ser, sens dubte, el catalitzador que va contribuir de forma decisiva a accelerar la meua recerca. A part, ha estat una de les etapes més interessants per tot allò que he après, especialment en aquells aspectes humanístics complementaris, però tant importants per a la formació d'un científic. Voldria agrair molt especialment a la Dra. Anne Camper per acceptar-me com a investigador visitant. També a la resta de persones d'aquest meravellós centre, començant per l'inefable Bill Costerton, el seu director i un dels pares de la "biofilmologia", el cap de Laboratori John Newman, sempre disposat a ajudar a qualsevol, o

els companys de laboratori com la Marianna Patrauchan o el Robin Gerlach. Per cert, en Robin, organitzador de l'equip de "soccer", em va permetre retornar part de les excel·lències del sistema universitari nord-americà "ensenyant" com es juga a futbol als inexperts companys i companyes del centre. Irònicament, com a jugador de futbol quasi veterà, he hagut d'arribar als Estats Units per disfrutar donant patades a la pilota en un camp de gespa.

L'estada al CBE va ajudar a millorar la meua formació en microscòpia confocal i en l'ús de tincions per a l'estudi de l'estat fisiològic dels bacteris. Gran part de l'ajuda en aquests camps la vaig rebre del Dr. Dave Davids i la Dra. Jo Rayner, habituals organitzadors dels famosos TGI (Thanks God, is Friday), una espècie de "guateques" molt nord-americans. La utilització pràcticament en exclusiva del microscopi confocal del centre em va permetre batre el rècord de grabació de CD-Roms, 12 CDs plens d'imatges en només dos mesos.

Un cop retornats a l'habitual ritme mediterrani la sorpresa va ser màxima quan les imatges es resistien a obrir-se. Una part de "l'horror" experimentat pel famós explorador Marlow en el llibre de Joseph Conrad, "El cor de les tenebres", va recórrer la meua espinada. Senzillament, les imatges no s'obrien amb cap dels programes coneguts. La solució era utilitzar l'original LEICA-TCS-NT, és a dir, tornar a Montana. Afortunadament, en aquesta parada obligatòria vaig poder coincidir amb la gent del Grup de Tractament d'Imatges del Dept. d'Òptica i Optometria de la UPC i, especialment, amb el flamant Dr. Héctor Abril. La seva erudició dins de l'obscur món informàtic va permetre trobar la "pedra rosetta" que ens traduís el format original. No hi ha dubte que la combinació entre l'Héctor i el Matlab produeix un còctel capaç de resoldre qualsevol problema relacionat amb el tractament d'imatges, la criptografia o la conversió entre formats absolutament incompatibles entre si. Alleugerits, encara que pensant quin seria el proper ensurt, es va poder continuar el treball amb microscòpia confocal al Servei de Microscòpia de la UAB, on he d'agrair l'ajuda de la Dra. Mercè Martí, i amb el perfilòmetre confocal PLµ dissenyat al Dept. d'Òptica i Optometria de la UPC, gràcies a l'ajuda del Roger Artigas.

Tots aquests alts i baixos típics de qualsevol viatge van disminuir de forma notable en el moment en que es va iniciar la col·laboració amb l'Institut Municipal de Parcs i Jardins de Barcelona, i amb la Companyia d'Aigües de Sabadell (CASSA). La participació d'aquestes dues empreses ens va permetre adaptar el sistema per al desenvolupament de biofilms en dues localitzacions al camp. Cal mencionar molt especialment a Jaume Pelegrí, M^a Alba Fransi i Josep M^a Andevvert, així com a la gent de CASSA, per les facilitats obtingudes en la instal·lació del sistema així com en l'obtenció de dades complementàries. Finalment, gràcies a l'estreta col·laboració de Jordi Comas i Núria Cañameras de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, he pogut introduir-me de forma ràpida en el món de la irrigació de les gespes i altres formacions vegetals.

Ja a casa i com en qualsevol viatge, ha arribat el moment de deixar madurar i ordenar les moltes dades obtingudes al llarg d'aquest tortuós trajecte. Aquest últim tram ha estat més fàcil gràcies al Miquel Ralló. En un altre ordre de coses, el meu més afectuós agraïment a la família i a tots els amics que m'han suportat durant aquest temps, als companys del Nashville per ajudar-me a "desconnectar" en aquesta última etapa, a l'Esteve Gimferrer pels seus consells, així com al Lluís i la Neus, per convertir la seva acollidora casa de València d'Àneu en el racó on he pogut treure a passejar l'oblidat equip de fotografia. Però cert és que sense el suport incondicional dels meus pares i de la Montse, aquest viatge no s'hagués pogut realitzar.

Així ha estat, i voldria deixar-ne constància, a 13 de novembre del 2000.

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

Because of its universality the biofilm concept impacts virtually all of the subdivisions of Microbiology, including medical, dental, agricultural, industrial and environmental.

J.W. Costerton (1995)

Capítol 1 | Introducció

1.1.	CREIXEMENT MICROBIÀ A LES SUPERFÍCIES	4
1.1.1.	ESTRATÈGIES DE COLONITZACIÓ BACTERIANA DE SUPERFÍCIES	4
1.1.2.	FORMACIÓ DELS BIOFILMS	6
1.1.3.	AVANTATGES DEL CREIXEMENT SÈSSIL	11
1.2.	FACTORS QUE GOVERNEN LA INTERACCIÓ MICROORGANISMES-SUPERFÍCIE	13
1.2.1.	PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICS	13
1.2.2.	PROCESSOS BIOLÒGICS	18
1.2.3.	SEPARACIÓ CEL·LULAR DE LA SUPERFÍCIE	19
1.3.	IMPACTE DEL DESENVOLUPAMENT DE BIOFILMS	21
1.3.1.	DISTRIBUCIÓ I UBIQUITAT DELS BIOFILMS	21
1.3.2.	ASPECTES BENEFICIOSOS DELS BIOFILMS	21
1.3.3.	PROBLEMES CAUSATS PELS BIOFILMS	22
1.3.4.	CONTROL DE LA FORMACIÓ I L'EXTENSIÓ DELS BIOFILMS	23
1.4.	PLANTEJAMENT I OBJECTIUS DEL TREBALL	24
1.5.	ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA DEL TREBALL	25
1.6.	BIBLIOGRAFIA	26

1.1. Creixement microbià a les superfícies

La majoria de bacteris presents a la natura, les malalties o la indústria proliferen adherits a diferents tipus de superfícies, formant les anomenades biopel·lícules o biofilms (Costerton et al. 1987). Així, quan es submergeix una superfície sòlida en un ambient aquàtic les cèl·lules microbianes en suspensió s'adhereixen a aquesta superfície, les cèl·lules immobilitzades creixen, es repliquen i secreten polímers extracel·lulars que envolten a les cèl·lules amb una matriu gelatinosa. Per tant, un biofilm és una matriu biològicament activa de cèl·lules i productes extracel·lulars adherits a una superfície sòlida (Brading et al. 1995). Encara que el terme biofilm s'acostuma a utilitzar només per a les cèl·lules bacterianes i els seus productes, en principi es podria fer extensiu a qualsevol comunitat formada per cèl·lules (Bryers 1987). De fet, els biofilms predominen en pràcticament qualsevol sistema aquàtic amb els nutrients suficients, independentment de la geometria del sistema i del tipus d'ecosistema implicat, presentant algunes característiques úniques (Hamilton 1988):

- ✓ Els bacteris metabòlicament actius (vegetatius) mostren una gran avidesa per adherir-se a les superfícies. La major part de l'activitat biològica, tant en ambients naturals com artificials, es produeix als biofilms.
- ✓ Els biofilms són heterogenis, amb discontinuïtats horitzontals i verticals que impliquen als organismes i als components biòtic i abiòtic, creant microambients físico-químics.
- ✓ Els biofilms són estructures dinàmiques: les seves heterogeneïtats varien amb el temps.

El desenvolupament de comunitats complexes adherides o en forma d'agregats, té un paper molt important per a la supervivència i l'èxit reproductiu dels microorganismes. Les comunitats formades pels biofilms poden actuar com a reservoris per a diverses espècies, proporcionant llocs específics en nínxols limitats i donant refugi protector enfront de la competència, predació o condicions ambientals desfavorables (Korber et al. 1995).

Tanmateix, la integració dins del biofilm es pot considerar com una estratègia de supervivència que va més enllà del simple augment en la taxa de creixement. Els biofilms presenten semblances amb els teixits formats per les cèl·lules eucariotes, especialment en la seva cooperació fisiològica i en la protecció que presenten enfront de les variacions en les condicions de la fase aquosa. Els bacteris que es troben dins dels biofilms, anomenats bacteris sèssils, constitueixen una comunitat funcional coordinada i altament eficient, gràcies a aquesta cooperació fisiològica (Costerton et al. 1987). En realitat, els bacteris sèssils modifiquen l'ambient al seu entorn mitjançant l'associació i la diversitat, constituint l'expressió més competitiva i de més èxit del genoma, mentre que les cèl·lules planctòniques es produïrien per colonitzar nous ambients (Costerton et al. 1995). De fet, els biofilms representen societats microbianes amb el seus propis sistemes de defensa i comunicació (Costerton et al. 1999).

És indubtable que el coneixement sobre els biofilms ha evolucionat molt ràpidament durant els últims 20 anys. L'aparició de tècniques específiques i aparells dissenyats o optimitzats per a l'estudi dels biofilms, han alterat la visió i la comprensió que es tenia sobre aquests sistemes vius. S'ha establert, en definitiva, que els biofilms poden constituir una forma superior i molt més complexa de creixement bacterià, amb una naturalesa heterogènia en l'espai i el temps - que tendeix a desenvolupar l'especialització i cooperació cel·lular -, un sistema de circulació primitiu i un cert grau d'homeostasi (Costerton 1995).

1.1.1. Estratègies de colonització bacteriana de superfícies

Els bacteris tenen una gran varietat d'estratègies per adaptar-se a la vida en un hàbitat de superfície i, alhora, per alliberar la progènie de la fase sèssil a la fase planctònica. Aquestes estratègies representen adaptacions per colonitzar i ocupar el substrat, optimitzar la disponibilitat del substrate, assegurar l'èxit reproductiu, respondre a l'estrès ambiental i afrontar la competència intra i interespecífica.

Adherència i mobilitat. La mobilitat és un mecanisme que facilita la colonització de les superfícies, incrementant les possibilitats que un bacteri té de contactar amb una superfície al proporcionar el potencial d'energia suficient per superar les forces electrostàtiques de repulsió que es produeixen entre bacteri i substrat. Així, la disminució de la mobilitat ocasiona una reducció conseqüent en l'adsorció cel·lular (Fletcher 1977).

Les cèl·lules que no presenten mecanismes de mobilitat no poden controlar la seva orientació final en relació amb el substrat, degut a la seva dependència dels processos de difusió. Aquestes cèl·lules s'acostumen a alinear longitudinalment en la direcció del flux, degut potser a la presència d'una regió adhesiva en un dels seus extrems (Caldwell et al. 1992). Les cèl·lules mòbils, en canvi, s'adhereixen de forma molt més aleatòria respecte a la direcció del flux.

La mobilitat també afecta la distribució i la disposició de la biomassa dins dels biofilms. Les soques no mòbils formen biofilms amb les típiques colònies piramidals, amb àrees cel·lulars més grans a la base. Les soques mòbils formen, en canvi, biofilms més gruixuts, menys variables i amb quantitats més grans de biomassa cel·lular a la superfície i a la interfase biofilm-líquid. En molts casos, la secció dels biofilms formats per soques mòbils presenten una regió intermèdia bastant difusa, si es compara amb les regions superiors i inferiors. Això pot ajudar a facilitar la difusió dels nutrients a la base del biofilm.

Adherència reversible i irreversible. L'adherència bacteriana a les superfícies es produeix generalment en dues etapes. En una primera fase d'adherència reversible, els bacteris s'uneixen a les superfícies contactant per una part de la cèl·lula o gràcies a alguna de les seves estructures de superfície. Aquest tipus d'unió permet un cert moviment, generalment giratori al voltant del punt d'unió (Brading et al. 1995) i sembla ser el procés predominant a la natura (Powell & Slater 1983).

El comportament de les cèl·lules unides de forma reversible podria explicar-se com un mecanisme quimiosensor, que ajudaria a determinar els llocs potencialment colonitzables, avaluant les condicions ambientals a través de quimioreceptors (Lawrence & Caldwell 1987). En una segona fase, el bacteri es pot separar de la superfície o es pot adherir de forma irreversible.

Estratègies en cèl·lules solitàries. En bacteris adherits, les cèl·lules solitàries exhibeixen taxes específiques de creixement més elevades que els bacteris que formen microcolònies extenses o agrupacions (Lawrence & Caldwell 1987). Per tant, la colonització de superfícies en forma de cèl·lula solitària no només serveix per optimitzar les distàncies intercel·lulars, sinó que també ajuda a mantenir l'equilibri entre la captació de nutrients i l'acumulació de residus. Tanmateix, aquesta estratègia de comportament solitari sembla correspondre clarament a organismes colonitzadors pioners, els quals serien eliminats sovint per la pressió de la predació (Korber et al. 1995).

Les cèl·lules filles migren, després del cicle de divisió, allunyant-se cada una de les altres mentre es mantenen adherides al substrat. Aquest tipus de colonització acostuma a estar dirigit per la recerca de nutrients, de forma que el cicle es pot anar repetint fins que s'utilitza tot el substrat, moment en el qual les cèl·lules retornen a l'estat planctònic (Brading et al. 1995).

Agregació i Coagregació. Les interaccions que resulten en l'agregació i la coagregació són extremadament importants en la colonització i ocupació del substrat, desenvolupant un paper clau en la formació de microcolònies i, de retruc, en l'arquitectura i l'estructura del biofilm. El procés de coagregació bacteriana presenta una elevada especificitat de reconeixement i es pot produir intergenèricament, intragenèricament i multigenèricament. Un dels casos més estudiats, correspon a les comunitats orals humanes, on pràcticament tots els bacteris participen en la coagregació intergenèrica (Kolebrander 1989).

El creixement en forma de biofilm està íntimament relacionat amb l'existència de zones o dominis d'activitat sota la influència metabòlica de cada bacteri (Sjollema et al. 1990). Aquests resulten, sovint, en la modificació de l'ambient que els envolta en un de més favorable, augmentant la taxa d'adherència. Quan dos d'aquests dominis espacials fisiològicament diferents es solapen, pot produir-se una interacció beneficiosa o perjudicial. En molts casos, les associacions de cèl·lules produeixen consorcis funcionals amb una gran capacitat per portar a terme processos fisiològics cooperatius, que proporcionen la gran majoria dels requeriments necessaris per al creixement.

Un dels fenòmens que sembla presentar-se en espècies diferents és la migració dins del propi biofilm. En alguns casos coneguts, el creixement microbià i la migració posterior determinen la formació d'una capa basal difusa amb nombrosos canals, després de les 24 hores (Lawrence et al. 1991). D'altres vegades, l'agregació cel·lular és encara evident en forma de microcolònies adherides a la superfície, a la zona basal dels biofilms i després de 12-24 hores de creixement.

Estratègies colonials. Després d'adherir-se sobre una superfície les cèl·lules bacterianes experimenten canvis fenotípics per l'alteració de diverses de les seves molècules estructurals i, alhora, es des-reprimeix la síntesi d'exopolisacàrids (Davies et al. 1993). La divisió cel·lular i la síntesi d'exopolisacàrids conduïren, de forma natural, al desenvolupament de microcolònies adherides i encerclades per una densa capa mucosa. Aquestes microcolònies són la unitat bàsica de creixement dels biofilms, i segueixen uns patrons establerts que acostumen a ser específics per cada espècie. Tanmateix, sovint es desenvolupen microcolònies en forma de monticles o piles, mentre que en alguns biofilms madurs predominen les formes semblants a bolets (veure Figura 1.2, Costerton et al. 1995). Moltes de les estructures que es converteixen en microcolònies dins dels biofilms requereixen de les interaccions cèl·lula a cèl·lula. Aquestes interaccions són actives i dependents de la mobilitat, i juguen un paper important en l'establiment de la matriu estructural de les microcolònies i els propis biofilms (Shapiro & Hsu 1989).

La matriu del biofilm formada típicament per material polimèric extracel·lular (EPS), es concentra densament al voltant de les microcolònies, i de forma menys densa en els espais entre aquestes. Els exopolisacàrids mantenen cohesionada la microcolònia i, alhora, adherida al substrat o a altres microcolònies.

Cada microcolònia presenta un cert grau d'homeostasi, de forma que el seu ambient intern està condicionat per la matriu i l'activitat metabòlica de les cèl·lules que la componen. En general, les seqüències de comportament acostumen a variar per la inducció de gens específics, que s'activarien només quan els microorganismes creixen de forma sèssil (Dagostino et al. 1991). Factors ambientals com el flux, viscositat, oxigen, CO₂, intensitat lumínica i la concentració de nutrients, poden ajudar a modular les estratègies colonials (Kjelleberg et al. 1982). L'estatus nutricional és, evidentment, un dels factors que més pot influir en la seqüència de processos que es produeixen durant el creixement associat a les superfícies. Un creixement excessiu a la superfície pot resultar en la disminució dels nutrients, l'aturada del creixement i la inducció d'una fase de privació de nutrients o d'inanició (Korber et al. 1995).

Dispersió. Alguns autors expliquen aquest fenomen com un mecanisme per generar diversitat i permetre als organismes adaptar-se a ambients canviants, proporcionant dos estats morfogènics òptims per circumstàncies diferents (Korber et al. 1995). Així, després d'un període de creixement sèssil el desenvolupament de les microcolònies acostuma a passar per una fase de redistribució bacteriana, on les cèl·lules adherides emigren cap a la fase planctònica per aconseguir la dispersió i la colonització d'hàbitats nous (Lawrence & Caldwell 1987). Aquest procés proporciona a les cèl·lules un mecanisme per abandonar les regions altament colonitzades, i anar cap a regions més aptes per al creixement ràpid. El temps necessari per iniciar aquesta fase varia, depenent de cada espècie i de les condicions sota les quals està creixent la cèl·lula. Valors típics per a la redistribució són de 2-5 hores després del creixement associat a la superfície (Korber et al. 1995).

1.1.2. Formació dels biofilms

Encara que els bacteris requereixen una certa quantitat d'aigua per poder créixer, poden adherir-se a qualsevol superfície sòlida ja sigui inorgànica, materials vius o morts (com argila, plantes, grans de sorra, animals), o residus orgànics (Marshall 1980). La formació del biofilm pot ser particularment ràpida si existeix l'aport d'una font nutritiva regular, com ho pot provocar l'existència d'un sistema aquàtic amb flux (Brading et al. 1995). En general, la formació dels biofilms és el resultat net de la deposició de cèl·lules en suspensió, del metabolisme de les cèl·lules adherides i dels processos que produeixen la separació del biofilm (Byers 1987), tal com s'aprecia a la Figura 1.1.

La combinació contínua de creixement i processos de dispersió produeix una estructura altament dinàmica, que dificulta la determinació de l'edat d'un biofilm. Tot i així, habitualment es consideren cinc etapes en el desenvolupament del biofilm (Characklis & Cooksey 1983):

- ✓ Condicionament del substrat per molècules orgàniques. Molècules orgàniques i cèl·lules microbianes són transportades a la superfície en contacte amb el líquid, on es produeix la seva adsorció, resultant en el desenvolupament de la *pel·lícula de condicionament*. Aquesta acumulació de nutrients a la superfície es produeix ja que la majoria de superfícies sòlides tenen una càrrega neta negativa quan estan immerses en aigua. Degut a això, els cations i una varietat de materials macromol·culars i col·loïdals són atrets a les interfases superfície-aigua (Marshall 1980).
- ✓ Adsorció de cèl·lules al substrat: Adherència reversible. Com a resultat de la formació de la pel·lícula de condicionament i del transport de cèl·lules de la fase aquosa a la interfase sòlid-líquid, els bacteris inicien l'adhesió reversible, on les cèl·lules poden separar-se amb un lleuger rentat.
- ✓ Algunes de les cèl·lules adherides de forma reversible es separen del substrat, tornant a la fase aquosa (planctònica)
- ✓ Transformació de cèl·lules adherides de forma reversible a irreversible, com a resultat d'interaccions físico-químiques i després de la producció de polisacàrids. El metabolisme realitzat pels propis microorganismes resulta en l'adhesió de més cèl·lules i material associat, abans de la separació final.
- ✓ Erosió i separació de cèl·lules i agregats cel·lulars del biofilm, que tornen a la fase aquosa.

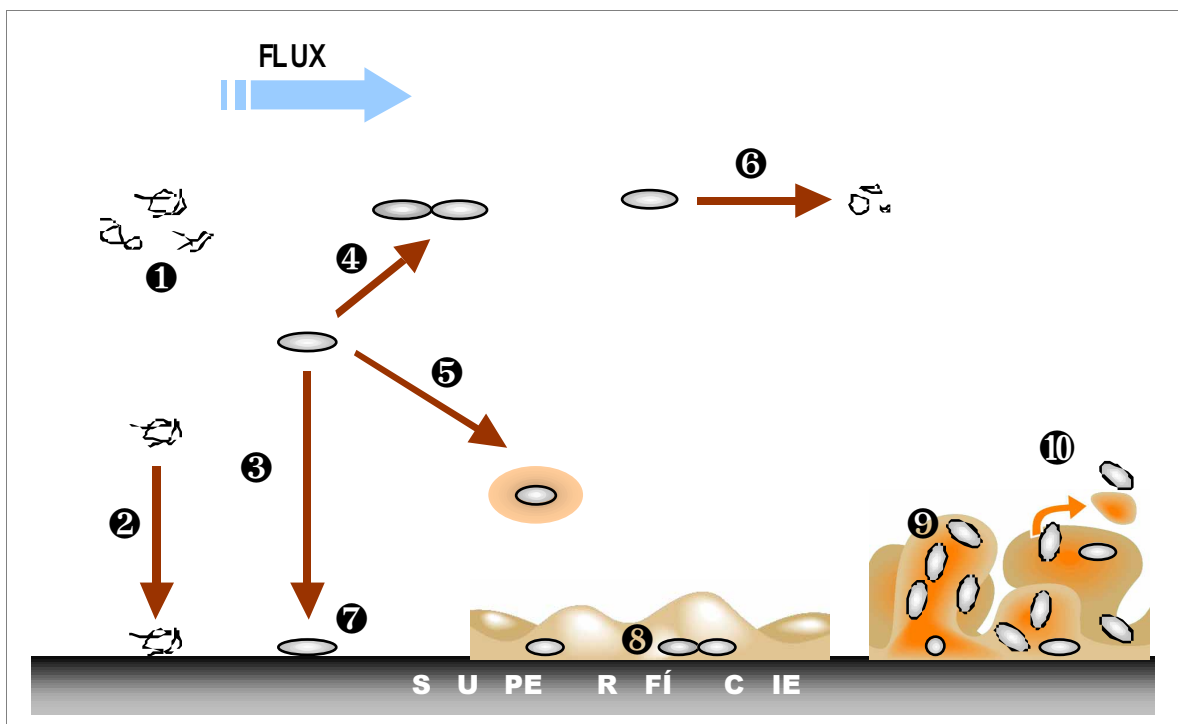


Figura 1.1. Mecanisme de formació dels biofilms, a la fase aquosa: (1) dissolució de macromolècules orgàniques, (2) formació de la pel·lícula de pre-condicionament, (3) transport cel·lular, (4) replicació, (5) producció de polímer extracel·lular, (6) mort, (7) adherència al substrat. Dins del biofilm, (8) replicació, (9) producció de polímer extracel·lular i (10) separació del biofilm.

Producció de glicocàlix. El microambient de la superfície s'altera a mesura que els primers colonitzadors creixen, es divideixen i produeixen exopolisacàrids (Lappin-Scott & Costerton 1989). Aquesta pel·lícula d'exopolisacàrids (EPS) anomenada glicocàlix, atrapa més matèria orgànica i inorgànica, així com productes microbians i altres microorganismes. Tant els agregats com les cèl·lules filles es veuen protegits dins la matriu del glicocàlix, afegint-se al biofilm i formant sistemes heterogenis. El glicocàlix bacterià és molt important per a la formació dels biofilms, per la seva persistència i supervivència al damunt les superfícies.

El glicocàlix és una estructura d'origen bacterià que en el seu estat hidratat presenta aproximadament un 98% d'aigua. Està formada per polisacàrids en forma de fibra, glicoproteïnes globulars, àcids nucleics i àcids húmics (Jahn & Nielsen 1996). Es troba per fora dels elements integrals de la membrana externa dels bacteris gram-negatius i per fora de la capa de glucopèptids de les cèl·lules gram-positives (Brading et al 1995, Schmitt & Flemming 1998). Degut a que el glicocàlix es pot considerar com

una matriu polianiónica, pot actuar com les resines d'intercanvi iònic, atraient ions carregats i molècules dins de la matriu que envolta les cèl·lules bacterianes, formant microcolònies adhesives.

De fet, l'adhesió pot desencadenar l'expressió de gens que controlen la producció de components bacterians necessaris per a la formació del biofilm i per mantenir l'adherència. És el cas de la producció de polímers extracel·lulars com els alginats en el cas de *Pseudomonas aeruginosa*, on l'adhesió inicia l'expressió entre d'altres del gen algC, que controla la producció de la fosfo-manomutasa i altres enzims que intervenen en la síntesi d'alginat (Davies et al. 1993).

Desenvolupament de comunitats heterogènies: Maduració del biofilm. Les condicions ambientals de les superfícies netes es modifiquen amb la colonització, creixement i activitat dels bacteris. El microambient microbià seria el resultat de l'acció conjunta del consum microbià de nutrients, la producció de residus i la síntesi de materials cel·lulars i extracel·lulars (Korber et al. 1995). A mesura que l'heterogeneïtat s'incrementa dins del biofilm per la presència de microcolònies amb tipus fisiològics diferents al seu interior, es desenvolupen uns microgradients químics i físics (nutrients, pH, oxigen, etc.). Amb el temps es desenvolupa un nivell d'organització on les cèl·lules d'espècies diferents aconseguen la cooperació fisiològica (Blenkissop & Costerton 1991).

D'altra banda, les cèl·lules dins del glicocàlix poden presentar problemes per la falta de nutrients i d'oxigen, i per l'acumulació de productes tòxics residuals. L'oxigen no acostuma a ser un factor limitant en les primeres etapes de la colonització. Tanmateix, en biofilms gruixuts amb múltiples capes de cèl·lules l'estat fisiològic d'aquestes depèn de la seva localització (Anwar et al. 1992). Així, les cèl·lules de les regions més externes tenen més fàcil l'accés als nutrients i a l'oxigen, i tenen menys problemes per eliminar els productes residuals tòxics. L'estrès per la manca d'oxigen obliga a les cèl·lules de les capes més profundes a adoptar una fase d'inactivació, arribant en alguns casos a morir per processos lítics. En aquestes zones anòxiques que es desenvolupen prop del substrat, seran especialment actius els bacteris fermentadors, els quals mantenen l'activitat respiratòria utilitzant nitrats i altres compostos inorgànics com a acceptors d'electrons alternatius.

A les parts externes del biofilm els microorganismes s'adhereixen i es separen, en dos processos íntimament relacionats. La separació és el moviment de cèl·lules o altres components del biofilm cap a la fase aquosa. Les cèl·lules que es separen són, fonamentalment, les cèl·lules filles, les quals acostumen a ser més hidrofíliques que les cèl·lules que estan als biofilms (Gilbert et al. 1991).

Estructura dels biofilms: Heterogeneïtat espacial. Tots els estudis recents en el camp dels biofilms han permès descriure'ls com estructures variables i heterogènies (Stewart et al. 1993), que creixen formant microcolònies dins d'una matriu, barrejades amb regions menys denses que inclouen canals d'aigua altament permeables (Costerton et al. 1994). Així, els biofilms microbians vius són estructures altament hidratades, formats per bacteris disposats espacialment de forma heterogènia, materials biogènics extracel·lulars i amb un 50-90% de l'àrea total de cada secció formada per polímers o espais buits (líquid) (Stewart et al. 1993). S'observen heterogeneïtats en la dimensió vertical si es té en compte la superfície colonitzada pel biofilm, malgrat que també s'han observat heterogeneïtats en el pla horitzontal del biofilm, produint una topografia força irregular que recorda més una "bioesponja" que un film confluent (Hamilton & Characklis 1989, Keevil et al. 1995).

La distribució de la biomassa del biofilm pot exhibir patrons diferents, segons quina sigui l'espècie implicada. Això seria el reflex de les diverses estratègies de colonització utilitzades per cada un dels bacteris. Alguns biofilms naturals presenten una capa basal d'aproximadament 5-10 µm de gruix, amb piles de cèl·lules associades a polímers estenent-se des de la superfície cap a la fase aquosa (Keevil et al. 1995). Aquestes estructures facilitarien el flux de nutrients cap a les capes basals. D'aquesta manera, es permet el creixement de bacteris heteròtrofs aerobis mentre alhora es creen els microambients necessaris que permeten el creixement dels microorganismes anaerobis.

Diferents investigadors han confirmat aquest tipus d'estructura (veure Figura 1.2) on els agregats cel·lulars es barregen amb zones on abunden els canals buits, de manera que les microcolònies dins del biofilm estan banyades pel flux del líquid, fins i tot a les capes més profundes. Aquesta estructura pot variar segons els diferents règims hidrodinàmics, temps d'incubació, composició d'espècies o estatus nutritiu (Stewart et al. 1993, Costerton et al. 1995). La presència dels canals que es poden trobar entre les microcolònies o a sota seu (veure Figura 1.2), incrementa la rugositat de les superfícies i disminueix la longitud de difusió, facilitant l'intercanvi i la barreja de nutrients i proporcionant accés directe des del fluid a la superfície colonitzada. De fet, la utilització de tècniques com la velocimetria d'imatges de partícules (PIV) i la ressonància magnètica nuclear (NMR), han confirmat l'existència de flux convectiu dins dels canals d'aigua dels biofilms. La mesura dels perfils de velocitat en sistemes amb biofilms ha mostrat la presència de l'esforç de cisalla tant a les parets dels canals com al propi substrat –on el flux no arriba en cap cas a zero- (DeBeer et al. 1994). Per tant, el transport de masses dins del biofilm s'incrementa gràcies al flux convectiu pels canals (Figura 1.2) el qual segueix la mateixa direcció del fluid. Aquest mecanisme permet el pas de substàncies de 0.3 µm de diàmetre (Lewandowski et al. 1992), o fins i tot més grans, com bacteris i altres organismes com protozous i nemàtodes (Keevil et al. 1995).

Els bacteris que formen part dels biofilms gaudeixen de certs avantatges de la vida multicel·lular. De fet, el desenvolupament de les microcolònies dins dels biofilms presenta alguns mecanismes de control que impedeixen l'oclusió dels canals, ja que aquests representarien un primitiu sistema circulatori de forma anàloga als organismes superiors. Així, els canals ajudarien a aportar nutrients des del medi líquid al nínxol ocupat per cada microcolònia i, alhora, ajudarien a retirar els productes metabòlics de la mateixa manera (Costerton et al. 1994).

Les dades obtingudes amb microsensors demostren com l'heterogeneïtat estructural dels biofilms correspon, moltes vegades, a una heterogeneïtat fisiològica (Costerton et al. 1995). Així, les taxes de creixement varien als biofilms depenent de la profunditat (Korber et al. 1995), de forma que els biofilms creixen fonamentalment a la interfase biofilm-líquid i no a la capa basal del biofilm. Amb aquesta disposició els individus més grans o més actius estarien situats a les parts més externes, dalt de les piles, on es troben més nutrients disponibles pel creixement com a conseqüència del major flux. Aquestes piles també poden afavorir la barreja turbulent, beneficiant a altres membres de la comunitat i facilitant la difusió en regions no directament exposades a la fase aquosa.

D'altra banda, es poden observar variacions en la concentració de substrates fisiològicament importants a les diferents regions del biofilm, com l'oxigen dissolt. Malgrat que els canals d'aigua ajuden al transport d'oxigen, la seva utilització pels propis microorganismes i la limitació per difusió en fan disminuir la seva concentració a l'interior de les microcolònies.

La presència de gradients de concentració a través del biofilm – oxigen, nutrients orgànics essencials, carboni orgànic dissolt i altres -, pot influir en la diversitat i distribució espacial de les poblacions bacterianes, així com sobre l'activitat metabòlica que es produeix dins dels biofilms, permetent la supervivència d'organismes amb requeriments específics pel creixement. De fet, la presència d'aquests microambients és l'origen de gran part de la diversitat microbiana observada a la natura.

Un dels millors exemples de la modificació temporal/química dels biofilms resulta de l'activitat dels bacteris heteròtrofs aerobis. Dins d'un biofilm jove acabat de formar, la ràpida utilització dels nutrients disponibles condueix a l'increment en la biomassa microbiana, amb el conseqüent augment en la demanda d'oxigen. Això origina zones anaeròbies degut a la reducció metabòlica de l'oxigen i a la limitació dels processos difusius. D'aquesta manera, s'afavoreix la proliferació de microorganismes anaerobis en micronínxols a l'interior de biofilms, en ambients aerobis, alhora que es limita l'èxit dels aerobis.

Tal com s'ha comentat anteriorment (veure 1.1.2), dins de les microcolònies s'afavoreix la juxtaposició d'espècies diferents que poden cooperar metabòlicament. D'aquesta forma, la cooperació metabòlica permet l'intercanvi de substrates i l'eliminació de productes finals. Per tant, una cèl·lula individual dins del biofilm viu en un micronínxol únic, on la difusió i les cèl·lules veïnes aporten els nutrients, on els productes metabòlics són retirats pels mateixos processos i on els antagonistes, com els biocides,

són mantinguts a distància per les barreres difusives (Costerton et al. 1994). Així, les condicions químiques d'un micronínxol determinat depenen de l'aport de components del líquid a través dels canals, però també de la pròpia activitat metabòlica de les cèl·lules veïnes.

Aquest nivell d'organització estructural i d'especialització metabòlica estaria controlat pel propi comportament cel·lular, amb presència de comunicació cèl·lula a cèl·lula. Això s'aproxima a l'organització dels primitius organismes eucariotes multicel·lulars i explicaria, en part, la remarcable eficiència metabòlica dels biofilms microbians i la seva resistència a molts agents antibacterians (Anwar et al. 1990).

Assumint l'heterogeneïtat estructural, fisiològica i química que es produeix als biofilms bacterians, és molt possible que les poblacions sèssils naturals siguin heterogènies en diferents paràmetres físics. Per exemple, diferències en el potencial elèctric poden donar lloc a un potencial de corrosió mesurable quan la superfície és conductora (Lappin-Scott & Costerton 1995)

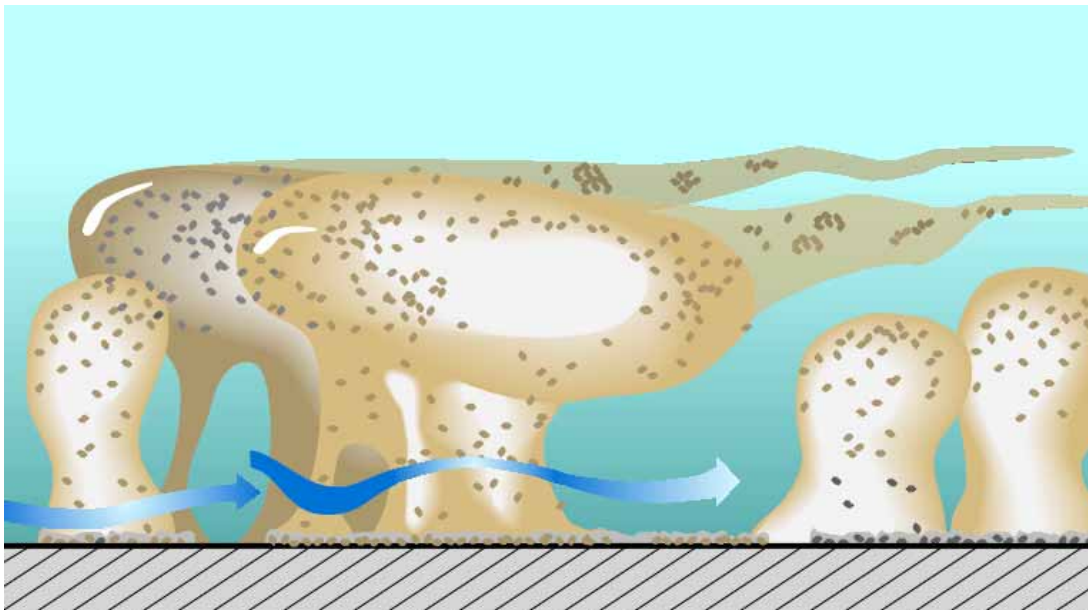


Figura 1.2. Model conceptual de l'arquitectura d'un biofilm mono-específic. El flux convectiu s'observa en els canals entre les microcolònies i fins i tot dins de les mateixes (Costerton et al. 1995).

Arquitectura de poblacions del biofilm. L'arquitectura de poblacions es pot estudiar directament utilitzant conjugats fluorescents de sondes amb oligonucleòtids, amb PCR i sondes filogenètiques. Avui en dia, sondes moleculars amb rRNA 16S, 5S i 23S s'estan utilitzant per estudiar un ampli rang de sistemes naturals, permetent l'estudi de comunitats ambientals sense la necessitat de realitzar cultius (Stahl et al. 1988, Amann et al. 1992).

La utilització d'aquests mètodes conjuntament amb la microscòpia de fluorescència i microscòpia confocal poden proporcionar informació de la contigüïtat espacial de les associacions cel·lulars sintròfiques o obligades. Si s'examinen alhora els gradients microquímics, es pot obtenir una informació molt valuosa per descriure els requeriments químics i espacials en comunitats altament estructurades com són els biofilms. La utilització d'aquestes tècniques en estudis al llarg del temps, pot proporcionar informació important referent a la successió temporal d'organismes amb uns requeriments específics.

Competència i successió en els biofilms. En els sistemes naturals existeix un elevat grau d'interacció cel·lular i competència. Gran part d'aquest comportament resulta de la competència de les cèl·lules pels recursos disponibles, tant pels llocs d'adherència com pels substractes necessaris pel creixement (Korber et al. 1995). Alguns organismes superiors poden influir en la colonització microbiana de les superfícies. Així, alguns protozous poden limitar l'èxit d'un organisme, mentre que tenen relativament poc efecte sobre els altres membres del consorci. No obstant, pocs estudis s'han centrat en l'efecte de la pressió

exercida per la competència durant el desenvolupament dels biofilms microbians, ja que moltes de les tècniques utilitzades per a l'estudi de les comunitats complexes microbianes presenten limitacions importants.

Entre les tècniques utilitzades per mesurar la superfície recoberta durant la colonització, tant per cultius purs com mixtes, cal destacar les tècniques d'anàlisi d'imatge amb microscòpia confocal en conjunció amb anticossos poli/monoclonals marcats fluorescentment o amb sondes moleculars (Lawrence et al. 1998). També s'ha utilitzat el marcatge radioquímic de bacteris per avaluar el comportament competitiu en biofilms (Banks & Bryers 1991).

Les observacions realitzades en poblacions adherides d'hàbitats naturals indiquen que aquests sistemes presenten un gran dinamisme, resultant en una successió de les espècies colonitzadores inicials per organismes diferents. Aquest patró en successió de la colonització de superfícies s'ha observat, tant en sistemes estàtics com amb flux, i s'origina per una seqüència de processos físics i biològics, iniciada per l'adsorció de films orgànics i seguida per la colonització bacteriana de la superfície (Fletcher & Loeb 1979). El temps necessari per aquestes dues fases inicials de colonització és relativament curt, formant-se el film molecular en qüestió de minuts i produint-se una colonització bacteriana significativa al cap de 24 hores. Els bacteris bacil·lars acostumen a ser els colonitzadors primaris, quan s'exposa una superfície neta a sistemes aquàtics naturals (Marszalek et al. 1979). Segueixen en la colonització els bacteris amb apèndixs o peduncles, com *Caulobacter spp.* De forma eventual, es pot observar la presència de predadors que s'alimenten del biofilm. En aquest sentit, els predadors eucariotes grans (incloent amebes, flagel·lats i ciliats) i les diatomees poden arribar al biofilm al cap de pocs dies, mentre que diferents larves i espores es poden dipositar al cap de setmanes (Marszalek et al. 1979, Dempsey 1981).

1.1.3. Avantatges del creixement sèssil

En general, els biofilms constitueixen un reservori d'espècies amb capacitat per resistir diferents fluctuacions ambientals (Carpentier & Cerf 1993). Les cèl·lules presents als biofilms estan protegides contra l'atac de l'ambient extern en forma de radiació UV, agents antibacterians, calor, bacteriòfags, predadors, etc. També com a conseqüència del creixement sèssil, els bacteris que formen part dels biofilms són més resistents a les estratègies de control adoptades per la indústria o la medicina (Blenkisopp & Costerton 1991).

Els bacteris sèssils són inherentment diferents dels que es troben en l'estat planctònic, degut especialment als canvis fenotípics que experimenten, a les barreres a la lliure difusió dins del biofilm i als canvis lligats a la taxa de creixement. De fet, els bacteris sèssils poden expressar diferents tipus de gens, alterar la seva morfologia, créixer a taxes força variades i produir polímers extracel·lulars en grans quantitats (Gilbert et al. 1990, Costerton 1995). La comparació bioquímica entre cèl·lules que formen part dels biofilms i cèl·lules planctòniques de la mateixa espècie mostra un mínim d'un 30% de diferències entre les proteïnes expressades en cada cas (Costerton et al. 1995). Així, l'adhesió induiria tota una sèrie de canvis importants en proteïnes de l'envolta cel·lular, membrana cel·lular i el citoplasma.

En molts casos, el comportament adherent no es pot explicar en termes d'un simple avantatge, sinó més aviat per l'efecte combinat de diferents factors, entre els quals caldria destacar la resistència enfront del rentat de la superfície, el comportament evasiu enfront dels predadors, el co-metabolisme de compostos recalcitrants, comportaments lligats al posicionament a les superfícies i dependències sintròfiques (Korber et al. 1995).

Captació de nutrients. La formació dels biofilms està controlada per la quantitat de nutrients disponibles per a la replicació cel·lular i la producció d'exopolisacàrids. La colonització de superfícies proporciona diferents avantatges als bacteris que viuen en ambients oligotròfics. De fet, l'increment del flux de nutrients a la superfície per la formació de pel·lícules orgàniques o com a resultat de la hidrodinàmica del fluid, pot alterar la fisiologia de les cèl·lules adherides. En aquest sentit, en els ambients oligotròfics els nutrients orgànics tendeixen a associar-se amb les superfícies disponibles, ajudant al desenvolupament dels biofilms que aprofiten les molècules orgàniques adsorbides al substrat (Kjelleberg et al. 1982). La formació d'aquestes

pel·lícules de condicionament tendeixen a concentrar els escassos nutrients, convertint el creixement adhesiu de bacteris en nutritivament avantatjós.

D'altra banda, la millora en la captació de nutrients de les cèl·lules adherides també es produeix en ambients amb flux. L'acció del flux en la reposició de nutrients a la superfície que envolta els bacteris adherits proporciona un mecanisme per mantenir el gradient de concentració necessari per a la difusió i el creixement. De fet, l'esforç de cisalla pot incrementar de forma significativa la utilització de diferents macromolècules (Confer & Logan 1991). Tanmateix, en molècules de baix pes molecular la captació sembla ser independent de l'esforç de cisalla.

Com a conseqüència, les poblacions adherides assimilen de 2-5 vegades més glucosa i presenten taxes de respiració més elevades que les cèl·lules en suspensió (Fletcher 1986), encara que aquest comportament no implica necessàriament un creixement ràpid. De fet, els bacteris sèssils aconsegueixen sobreviure i adaptar-se sobretot degut a la simplicitat, diversitat i capacitat d'adaptació metabòlica com a grup (Korber et al. 1995).

Per tant, el paper de l'adherència bacteriana no es pot fonamentar només en la captura de nutrients, doncs les condicions eutròfiques no resulten necessàriament en l'existència exclusiva de bacteris planctònics. Tanmateix, l'estratègia bacteriana va encaminada a créixer desenvolupant biofilms a les zones on els nutrients estiguin disponibles, mentre que persisteixen com a cèl·lules planctòniques - moltes vegades en forma d'ultramicrobacteris – als ambients on els nutrients són escassos (Costerton et al. 1995). A vegades, les cèl·lules presents a les zones més profundes del biofilm obtenen només els nutrients suficients per mantenir la viabilitat, entrant en un estat "quiescent", on no estan subjectes a la competència entre microorganismes (Lewis & Gattie 1990). D'altra banda, en ecosistemes extremadament pobres en nutrients els bacteris no s'adhereixen, generalment, a les superfícies.

Els EPS microbians també juguen un paper important en la nutrició dels bacteris sèssils. Així, els organismes poden concentrar nutrients extracel·lularment gràcies als EPS, els quals presenten una gran capacitat de sorció de matèria orgànica dissolta i metalls. Malgrat que existeixen poques evidències directes que confirmen la utilització dels propis EPS com a nutrients, la captació de matèria orgànica dissolta pot arribar a ser un 60% major a les cèl·lules sèssils que a les planctòniques (Ferris et al. 1989).

Posicionament i resistència al rentat. En general, els bacteris persisteixen a les zones que afavoreixen el seu creixement i desenvolupament. De fet, una gran varietat de bacteris confia en el comportament adhesiu per buscar l'aport òptim de nutrients orgànics, una major resistència al flux o condicions favorables de pH, oxigen, temperatura, etc. (Korber et al, 1995). D'aquesta manera, les estratègies adhesives de colonització són responsables indirectament de la formació de microhàbitats diversos i únics.

Resistència a la predació. L'adherència bacteriana també millora la supervivència dels microorganismes que, d'altre forma, podrien ser predats per protozous. Encara que existeixen protozous capaços d'exercir un efecte predador selectiu sobre agregats bacterians, la majoria dels bacteris adherits o formant agregats són predats en quantitats menors que les cèl·lules planctòniques (Caron 1987).

La formació d'un embolcall complex format pels EPS d'origen bacterià proporciona les forces adhesives que impedeixen que la cèl·lula es separi de la superfície (Costerton et al. 1987) i, alhora, disminueix la penetració d'enzims digestius secretats pels predadors de superfície. Alguns autors suggereixen que els predadors presenten una acció considerable sobre els EPS sense afectar als bacteris, ja que no existeix la suficient biomassa bacteriana com per suportar la biomassa mesurada de protozous depredadors (Sibbald & Albright 1988). D'aquesta forma, els EPS rics en sucres constituïrien una font d'energia important pels protozous, produint-se la transferència de nutrients cap a nivells tròfics més elevats de la cadena alimentària sense afectar de forma perjudicial les poblacions microbianes associades a les superfícies.

1.2. Factors que governen la interacció microorganismes-superfície

Per poder entendre el paper dels biofilms allà on intervien és fonamental conèixer els principals processos que es desencadenen en la seva formació, incloent les diferents formes i taxes d'adherència bacteriana, i la separació posterior de les superfícies. Processos físics, químics i biològics dirigeixen la formació dels biofilms a les interfases superfície-líquid, variant la seva contribució a l'acumulació en funció del període de desenvolupament. Cada un d'aquests processos intervé controlant la dinàmica de formació dels biofilms, tant en l'adherència com en la separació dels bacteris.

1.2.1. Processos físico-químics

A part de factores ambientals com la temperatura i el pH, també juguen un paper important en l'adherència les característiques del substrat, el tipus d'unió amb la superfície i el medi que envolta el propi biofilm. La taxa de formació inicial del biofilm depèn, en gran part, de la naturalitat química de la superfície. En general, quan la tensió superficial dels bacteris és més gran que la del medi que els envolta, l'adherència és més gran en els materials hidrofílics. Quan la tensió superficial del líquid és més gran que la dels bacteris, s'observa el patró invers de comportament (Absolom et al. 1983).

D'altra banda, la textura de la superfície sembla afectar de forma important la formació dels biofilms, ja que les superfícies rugoses proporcionen més llocs per a l'adherència i un grau més elevat de protecció al biofilm.

Pel·lícules de condicionament. Els microorganismes es mouen des de la fase aquosa als microambients presents a les superfícies, on estableixen un focus de creixement. En principi, qualsevol superfície neta exposada a l'ambient es veu ràpidament coberta amb material orgànic present a les solucions aquoses, desenvolupant una pel·lícula molecular o de condicionament, que pot estimular la colonització microbiana (Fletcher & Loeb 1979).

El medi líquid que envolta el substrat té un paper fonamental en el procés de l'adherència bacteriana, ja que controla la quantitat de nutrients dissolts en el medi aquàtic i afecta les interaccions amb el substrat. És conegut l'efecte de diferents cations (Na^+ , Ca^{2+} i Fe^{3+}) disminuint les distàncies de separació bacteri-superfície, i neutralitzant les càrregues negatives en els polímers de superfície dels bacteris. A més, el calci i el magnesi s'acumulen dins la matriu del biofilm i actuen com agents cohesionadors, entrecruant-se amb i entre els exopolisacàrids.

Entre els components que intervien en la formació d'aquests films orgànics cal destacar a diferents polímers de glicoproteïnes, proteïnes i, possiblement, d'àcids húmics (Baier 1980). La presència d'aquests compostos orgànics modifica algunes de les propietats de la superfície, adquirint una càrrega neta negativa. Tanmateix, altres paràmetres com el potencial z, l'energia lliure i l'angle de contacte variaran en funció de l'energia de la superfície original (Busscher et al. 1990).

En gran mesura, el moviment dels materials orgànics des de la fase líquida a la superfície és el resultat de la difusió molecular, resultant en la ràpida formació de dipòsits orgànics, significatius en només 15 minuts (Characklis et al. 1990). D'aquesta manera, s'han determinat films moleculars que resulten en 0,8-15 mg de matèria orgànica per m^2 de superfície exposada, equivalent a espessors d'entre 30-80 nm (Loeb & Neihof 1975).

No està del tot definit el paper d'aquests films moleculars en l'adherència bacteriana a les superfícies. En medis pobres en nutrients les cèl·lules creixen generalment millor a les interfases, perquè l'adherència permet als bacteris explotar una font de nutrients essencials que poden ser escassos en l'ambient que els envolta. En canvi, el subministrament d'un substrate com a font d'energia a bacteris en situació d'estrès per privació de nutrients, resulta en la disminució de l'adherència. En aquestes condicions d'estrès nutritiu els receptors per les fonts de carboni de les superfícies no estan saturats i, per tant, els bacteris poden interaccionar amb ells i adherir-se (Brown et al. 1977). En altres casos, les condicions d'estrès nutritiu provoquen la formació de bacteris més petits del normal, els ultramicrobacteris, amb una major capacitat d'adherència (Dawson et al. 1981).

Apart, alguns dels grups químics de les molècules orgàniques poden interaccionar amb els grups presents a les estructures superficials dels bacteris, com les fimbries, pili, flagels o substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS) (Sjollema et al. 1990). Aquests apèndix superen la barrera de l'energia lliure i fan contacte amb la matriu orgànica, formant unions electrostàtiques reversibles de curt abast, unions covalents o ponts d'hidrogen.

Forces de superfície físico-químiques i teoria de la doble capa. Moltes de les característiques físico-químiques de les superfícies, com la tensió superficial, poden influir en l'adsorció de bacteris i altres molècules (Absolom et al. 1983). Donada la seva grandària, la superfície carregada negativament i la densitat només lleugerament més gran que la de l'aigua, els bacteris es comporten com partícules col·loïdals. Segons la teoria de la doble capa (teoria DLVO), formulada originalment pels treballs de Derjaguin i Landau (1941), i Verwey i Overbeek (1948), la propensió a l'atracció col·loïdal i l'adhesió depèn de les interaccions electrostàtiques i de les forces de London-van der Waals actives a la superfície, tal com es descriu a la següent equació:

$$V_T(l) = V_A(l) + V_R(l) \quad (1.1)$$

on l'energia d'interacció total d'una partícula (V_T) en funció de la distància que la separa d'una superfície sòlida (l), és la suma de l'atracció produïda per les forces de van der Waals (V_A) i les interaccions electrostàtiques (V_R). La teoria prediu que l'atracció entre dues partícules es pot produir en distàncies al voltant de 5-10 nm, en l'anomenat mínim secundari, on es produirà l'adherència reversible.

En distàncies més curtes (≤ 1 nm), regió que s'anomena mínim primari, es manifesta l'adherència irreversible (van Loosdrecht et al. 1989, 1990), on a més de les forces electrostàtiques i les de van der Waals, intervenen les interaccions específiques entre la cèl·lula i el substrat (Lappin-Scott & Costerton 1989).

Entre aquestes dues posicions es troba una zona on les superfícies experimenten una repulsió màxima, degut a les interaccions electrostàtiques originades per la càrrega negativa neta que presenten la cèl·lula i el substrat. La magnitud d'aquesta repulsió depèn del potencial de superfície de la partícula i del substrat, de la separació existent entre les dues i del poder electrolític del medi aquós.

Tanmateix, l'adherència no es pot atribuir en exclusiva a cap tipus d'interacció adhesiva, doncs una mateixa soca es pot adherir amb una intensitat o força adhesiva variable a substrats amb diferents propietats. Això és possible gràcies als diferents tipus de forces de curt abast implicades, entre les quals cal destacar els ponts d'hidrogen, les interaccions iòniques, les unions covalents i electrostàtiques i les interaccions dipol. Un paper bàsic el tenen les forces de van der Waals, les quals ajuden a superar la repulsió elèctrica produïda per la càrrega negativa del substrat i el bacteri (a una distància d'aproximadament 10-20 nm), atraient el bacteri cap a la superfície (van Loosdrecht et al. 1989, Characklis & Marshall 1990). A part d'aquestes interaccions físico-químiques, caldria destacar també a tot un seguit d'unions específiques. En aquest cas s'acostuma a produir un reconeixement entre estructures bacterianes (adhesines) i un receptor situat a la superfície, com en el cas de les unions entre lectines i sucres (Lappin-Scott & Costerton 1995).

La utilització de la teoria de la doble capa per predir l'adsorció microbiana a les superfícies s'ha de fer tenint en compte algunes consideracions. Originalment, aquesta teoria es va desenvolupar per sistemes dins de la capa límit hidrodinàmica, lliures d'esforç de cisalla. És evident però, que en la majoria de sistemes naturals els fluids presenten moviments dinàmics, que apliquen esforços de cisalla a les cèl·lules que s'acosten a qualsevol superfície (Characklis & Marshall 1990). També es pot remarcar la diferència evident en grandària entre les partícules col·loïdals i les cèl·lules bacterianes, i la generació de gradients iònics, gradients de pH i la presència de diferències geomètriques – com diferents apèndix cel·lulars - en aquestes últimes. En l'últim cas, aquestes estructures cel·lulars no només alteren el diàmetre eficaç de la cèl·lula prop de la superfície, sinó que a més modifiquen les forces de repulsió a les zones on aquestes forces són més grans, entre el mínim primari i el mínim secundari (Sjollema et al. 1990).

Energia lliure superficial i teoria de la hidrofobicitat. L'adsorció inicial bacteriana també es pot explicar en termes de l'energia lliure del sistema. L'adsorció de la cèl·lula al substrat es pot produir quan l'energia lliure total del sistema disminueix, pel contacte de la cèl·lula amb una superfície (Absolom et al. 1983). Termodinàmicament es pot desenvolupar un balanç d'energia lliure, tenint en compte les energies lliures de les interfases de cada superfície implicada, com es mostra a la següent equació:

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{bs} - \gamma_l - \gamma_{bl} \quad (1.2)$$

on ΔF_{adh} és l'energia lliure d'adhesió, γ_{bs} és l'energia lliure per la interfase bacteri-substrat, γ_{sl} és l'energia lliure per la interfase substrat-líquid i γ_{bl} és l'energia lliure per la interfase bacteri-líquid. Per mesurar l'energia lliure és crític disposar d'un mètode apropiat per determinar la tensió superficial crítica (σ_c) del bacteri i del substrat. Normalment, es mesura de forma microscòpica l'angle de contacte entre líquids definits i la superfície o cèl·lules microbianes (Fletcher & Marshall 1982). En teoria, un líquid que proporciona un angle de contacte de 0° hauria de presentar una tensió superficial equivalent a l'energia lliure superficial del substrat. L'increment en l'angle de contacte mesurat es correspon amb l'augment en la hidrofobicitat superficial i la disminució en l'energia lliure superficial.

Els estudis que intenten explicar l'adhesió bacteriana amb el criteri de la tensió crítica superficial, mesurant l'angle de contacte del líquid amb el substrat, demostren una gran variabilitat en els resultats (Korber et al. 1995). Analitzant les dades bibliogràfiques existents es desprèn que no es poden fer generalitzacions referents a les propietats físico-químiques de la superfície dels microorganismes (van der Mei et al. 1998). Aquesta elevada variabilitat es pot explicar, en part, per la falta d'un mètode estàndard validat, així com per l'heterogènia naturalesa físico-química de la cèl·lula bacteriana. A més, les aproximacions físico-químiques simples de les interaccions superficials molt difícilment poden explicar tots els aspectes de l'adhesió bacteriana. En aquest sentit, la majoria dels models no incorporen algunes de les característiques típiques de l'estructura i del comportament adaptatiu de la cèl·lula bacteriana, assumint per exemple que les superfícies són petites, llises i energèticament homogènies, fet molt poc freqüent entre els bacteris (Busscher et al. 1990).

Difusió. La difusió es defineix com el moviment aleatori de partícules, des de regions amb concentracions elevades cap a zones amb baixa concentració. Tal com es descriu a la primera llei de Fick, aquest flux (dq/dt) depèn del gradient de concentració del solut (dC/dX), de l'àrea del material a través del qual el solut està difonent (A) i de la constant de difusió del solut (D):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -DA \frac{\partial C}{\partial X} \quad (1.3)$$

La difusió no només governa una part important dels moviments bacterians cap a les superfícies, sinó que també ajuda a explicar una part important del transport molecular i de la nutrició dins dels biofilms. Així, el desenvolupament dels biofilms pot afectar la transferència de nutrients essencials com l'oxigen o altres metabolits cap al seu interior, perquè augmenta la longitud de difusió i el seu consum pot limitar la concentració abans d'arribar a la capa basal (Christensen & Characklis 1990). S'han mesurat taxes de difusió a través de biofilms entre un 60-100 % del valor obtingut, per una substància determinada, en l'aigua pura (Nielsen 1987). De fet, tant el gruix com la pròpia concentració del substrate poden influir en la resistència a la difusió. La difusió es torna un mecanisme de transport molecular menys efectiu en sistemes amb flux. A més de mantenir un gradient de concentració més abrupte, els fluxos elevats tendeixen a reduir l'espessor de la capa límit.

Hidrodinàmica del sistema. La hidrodinàmica del sistema és un aspecte fonamental per comprendre la formació dels biofilms, influint en els sistemes industrials, mèdics i naturals, on la colonització bacteriana és el pas previ a la corrosió i la infecció microbiana (Lappin-Scott & Costerton 1989). L'èxit de la colonització bacteriana d'una superfície depèn del flux de cèl·lules des de la fase líquida als microambients superficials on es pot produir l'adherència. En gran part, aquest flux cel·lular està governat per la hidrologia del sistema líquid (estàtic, turbulent o laminar), el gradient de concentració i la naturalesa del microorganisme

(incloent sobretot la seva grandària i les característiques superficials) (van Loosdrecht et al. 1989). A més, els factors hidrodinàmics controlen la separació i erosió en biofilms ja formats, mitjançant el transport de metabolits i nutrients i l'esforç de cisalla. D'altra banda, l'acumulació del biofilm pot arribar a canviar la hidrodinàmica del sistema, incrementant la rugositat de la superfície (Bouwer 1987), i com a conseqüència protegint de l'esforç de cisalla i augmentant l'àrea de la superfície, la turbulència del sistema i el transport per convecció.

Els dos tipus extrems de flux, flux laminar i flux turbulent, poden afectar de forma diferent tant a les cèl·lules planctòniques com a les adherides. La majoria dels fluxos, en sistemes naturals i artificials, són turbulents. No obstant, el flux turbulent és molt complex i difícil de predir, de manera que gran part del treball experimental descrit a la bibliografia s'ha realitzat utilitzant el flux laminar, que es pot descriure analíticament i és d'interès en l'estudi dels moviments de bacteris mòbils a través de líquids quiescents o amb circulació lenta (Characklis & Marshall 1990).

Tot i que és pràcticament impossible predir el moment exacte en que el flux laminar passa a flux turbulent, es pot aconseguir una estimació utilitzant el **nombre de Reynolds (Re)**. Aquest paràmetre sense dimensió ens descriu la magnitud de la inèrcia de les forces viscoses:

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot v \cdot D}{\mu} \quad (1.4)$$

on D és la longitud constant del sistema com el diàmetre de la tuberia (en metres), v és la velocitat del fluid que es mou a través de la tuberia (en m s^{-1}), ρ és la densitat del fluid (en kg m^{-3}) i μ és la viscositat del fluid (en N s m^{-2}).

Generalment s'accepta que per a un flux a través d'una tuberia circular de diàmetre constant, Re igual o inferior a 2000 és representatiu del flux laminar, mentre que les condicions del flux turbulent es trobarien amb Re igual o superior a 4000. Quan el número de Reynolds es troba entre 2000 i 4000, es parla de flux de transició, doncs les condicions poden alternar entre el flux laminar i el turbulent depenent de les condicions ambientals i, especialment, la temperatura –que afecta a ρ i μ –, la rugositat de la tuberia o les condicions d'entrada a la mateixa (Characklis & Marshall 1990).

Quan un fluid entra en una tuberia té un perfil de velocitat quasi uniforme. A mesura que el fluid es mou a través d'aquesta tuberia, els efectes viscosos provoquen que el flux s'enganxi a la paret de la tuberia. Per tant, el fluid que es mou prop del centre ho fa més ràpidament que el fluid proper a les parets de la canonada, degut al fregament provocat per la viscositat (Caldwell & Lawrence 1986). Les diferències observades entre els dos tipus de flux es deuen fonamentalment a l'esforç de cisalla, força que es produeix quan les dues parts llisquen una contra l'altra. En el flux laminar, l'esforç de cisalla està produït pel gradient de velocitat combinat amb la viscositat del fluid, mentre que en el flux turbulent, és el resultat del moment de transferència entre els feixos –de magnitud finita– de les partícules del fluid, els quals es mouen aleatòriament.

Tant en el flux laminar com en el turbulent, l'efecte de les forces viscoses – més importants que les forces d'acceleració o inèrcia –, determinen que el fluid proper a la superfície de les parets de la tuberia desenvolupi la **capa límit**. Aquesta, es pot definir com la regió del fluid més propera a la superfície i que separa el fluid que es troba al seu interior del que es troba fora, on les forces viscoses són negligibles comparades amb altres forces (Sotelo 1994). Quan la capa límit és turbulent, el flux immediatament proper a la superfície sòlida no ho és. En aquestes condicions, i a prop de la superfície sòlida on el flux té velocitat zero, es produeix una capa extremadament prima (sovint de menys de $1 \mu\text{m}$) anomenada subcapa laminar o viscosa.

Dinàmica de fluids en flux laminars. En el flux laminar les partícules del fluid es mouen en línies o làmines paral·leles sense produir-se barreja lateral, mantenint les mateixes posicions relatives en les seccions transversals (Fletcher & Marshall 1982). Es produeixen diferències en la velocitat del fluid, amb el característic perfil de velocitat parabòlic del flux laminar, on el flux és molt més lent prop de la superfície.

De fet, el flux del líquid prop de la superfície pot ser negligible en el flux laminar, de manera que alguns autors parlen de microambient per definir l'àrea propera a la superfície de la canonada, diferent del flux principal de la tuberia o macroambient (Caldwell & Lawrence 1989).

En un ambient on el fluid es mou en absència total de barreja és difícil imaginar com les cèl·lules planctòniques i els nutrients poden passar del medi líquid a la superfície de la tuberia. De fet, això es pot convertir en un factor limitant important pel creixement del biofilm, degut als efectes evidents sobre l'arribada de cèl·lules i nutrients. Tanmateix, algunes cèl·lules poden utilitzar els seus mecanismes de mobilitat, mentre que la difusió molecular i la gravetat poden ajudar als microorganismes no mòbils a arribar a la superfície de la tuberia (Characklis & Marshall 1990).

Els fenòmens d'adherència i separació de les superfícies – que es poden produir al mateix temps –, depenen en una part important del flux: l'augment del flux incrementa l'adherència d'aquells bacteris que estan creixent lentament, encara que disminueix l'adherència dels que creixen a taxes més elevades (Fletcher & Marshall 1982). En gran part, sembla que els processos fisiològics dirigeixen l'adherència dels bacteris quan aquests creixen activament, mentre que l'adsorció físico-química és el principal factor relacionat amb l'adherència de les cèl·lules que creixen lentament.

La falta de barreja i la baixa velocitat del fluid prop de la superfície pot limitar el creixement del biofilm establert en condicions de flux laminar. De fet, la taxa de creixement del biofilm dependrà de la velocitat del flux laminar i de la concentració del substrate. En ambients naturals, els biofilms madurs acostumen a estar limitats per la difusió, fins i tot a velocitats elevades. Així, la quantitat de substrate present a la paret de la canonada pot disminuir ràpidament i, alhora, pot augmentar l'acumulació de metabolits tòxics i productes residuals (Caldwell & Lawrence 1989). Això es pot explicar pel desequilibri provocat per la gran densitat de cèl·lules que es poden acumular a les parets de la tuberia, comparat amb la velocitat del fluid en aquesta zona. L'estrès produït no només afectarà el creixement dels biofilms que s'estan desenvolupant, sinó que també pot provocar el trencament de biofilms gruixuts ja desenvolupats (Caldwell et al. 1992).

Dinàmica de fluids en flux turbulents. El flux es torna turbulent quan el moviment a qualsevol punt particular es converteix en erràtic i irregular, ocupant les partícules posicions relatives diferents en successives seccions transversals. Diferents factors com la presència de bombolles d'aire o la rugositat de la superfície de la canonada, poden afectar el flux turbulent. Si la rugositat de la paret de la tuberia comença a ser suficient degut a l'acumulació del biofilm, es poden desenvolupar remolins fins i tot en condicions de flux laminar, que poden resultar en pèrdues d'energia (Characklis & Marshall 1990).

La turbulència afecta a les taxes de deposició dels organismes i a l'alliberament dels nutrients. També incrementa la transferència calorífica i el moment entre les masses adjacents d'aigua (Fletcher & Marshall 1982). En el flux turbulent, les partícules en suspensió dins del fluid són transportades a la superfície sòlida de la tuberia, de forma majoritària, per les forces hidrodinàmiques del fluid. En contrast amb el que passa en condicions de flux laminar, la difusió, la mobilitat cel·lular i la gravetat semblen contribuir poc en condicions de flux turbulent (Stanley 1983, Characklis & Marshall 1990).

La capa límit serà en aquest cas la capa propera a la superfície de la canonada on predomina el flux laminar i, on es produeix gran part de la resistència al transport de masses. A diferència del flux laminar, la capa límit roman propera a la superfície i no omple el radi de la tuberia (Silvester & Sleight 1985). Però a més, i degut a la naturalesa del flux turbulent, fluctuacions turbulents arriben a entrar dins d'aquesta zona, provocant perturbacions en totes direccions de la velocitat local, fins i tot en sentit contrari a la direcció principal del flux. Això pot ajudar al transport de substractes i altres nutrients al biofilm, així com al transport de partícules col·loïdals com els bacteris a les superfícies de les canonades (Escher & Characklis 1990). A mesura que els bacteris entren a través de la subcapa, les forces de fregament disminueixen la seva velocitat, ja que les forces d'acceleració de les partícules microbianes són molt petites degut a la seva reduïda grandària i densitat (en relació a l'aigua).

La turbulència també pot afectar a l'estructura del biofilm. Biofilms desenvolupats en el laboratori sota condicions de fluxos reduïts ($0,5 \text{ m s}^{-1}$) són menys compactes però més gruixuts i amb una distribució aleatòria en l'adherència, comparat amb els crescuts sota fluxos elevats ($2,5 \text{ m s}^{-1}$), més primers i amb les cèl·lules alineades en la direcció del flux per oferir la menor resistència (Santos et al. 1991). En general, els biofilms primers i densos sembla que estan induïts per la turbulència del líquid i per la gran quantitat de contactes partícula a partícula.

La turbulència pot incrementar l'adherència en un biofilm, però quan el biofilm és massa gruixut i sobresurt de la capa límit augmenta la resistència a la fricció en el sistema, fet que repercuteix en l'increment de la separació. De fet, la resistència a la fricció només s'incrementa, proporcionalment al gruix del biofilm, quan les irregularitats del mateix sobresurten a través de la subcapa. En aquest punt, el biofilm bacterià té un efecte directe en el flux incrementant el fregament del sistema, fet que provoca una important disminució del flux a través de la tuberia (Brading et al. 1995).

D'altra banda, quan el biofilm sobresurt de la subcapa s'incrementa la turbulència al seu voltant, augmentant la taxa de separació per erosió, abracció i despreniment. En aquest sentit, els biofilms poden incrementar la resistència a la fricció dels fluids en aproximadament un 200-300% (Bryers 1987). Això provocarà problemes importants no només pel propi creixement dels biofilms, sinó també per l'increment del consum d'energia i de les despeses de manteniment del sistema de distribució.

Si el biofilm es localitza dins de la capa límit no hi ha resistència a la fricció, més que la pròpia del valor hidràulic per la tuberia llisa (Trulear & Characklis 1982). D'aquesta forma, el biofilm pot continuar creixent sense veure's afectat pel flux, exceptuant les fluctuacions turbulents que penetren la subcapa portant nutrients i cèl·lules a la superfície de la tuberia (Escher & Characklis 1990).

Tots aquests processos depenen en gran mesura del nombre de Reynolds (Escher & Characklis 1990). Com més gran és Reynolds, més elevada serà la velocitat en la tuberia i menor el gruix de la capa límit, sobresortint el biofilm més enllà de la subcapa i augmentant la separació dels microorganismes de la superfície. De fet, la separació és un procés important en la formació i el manteniment del biofilm, que pot ser beneficiós en certs casos per als propis bacteris. Així, els biofilms amb taxes de separació més elevades presenten una quantitat més gran de bacteris actius, ja que s'exclou la formació d'una zona inert prop del substrat (Rittmann 1989). D'altra banda, la separació es pot produir en resposta a les necessitats de dispersió, especialment sota condicions de limitació pels nutrients, permetent que es produeixi la colonització de zones més favorables nutricionalment (Marshall 1985).

Per tant, el gruix del biofilm en una superfície arriba a un màxim a la zona de transició entre el flux laminar i el turbulent. El transport de substrates limitaria el creixement a la zona laminar, mentre que l'erosió ho faria a la zona turbulent.

1.2.2. Processos biològics

La majoria d'ambients naturals són sotmesos a la invasió contínua per una gran varietat de microorganismes. Una vegada els bacteris han colonitzat una superfície comencen a secretar material polimèric extracel·lular (EPS) per formar el glicocàlix, que uneix tant els bacteris com altre material extracel·lular dins d'una matriu. En alguns bacteris l'adherència és un procés passiu, doncs ja presenten les estructures necessàries per l'adherència abans que aquesta es produeixi. D'altre banda, l'adherència activa es produeix quan els bacteris necessiten una exposició prolongada per adherir-se fermament a la superfície, sovint amb producció de EPS.

Entre els tres components fonamentals de l'adherència bacteriana a les superfícies sòlides, el microorganisme, el substrat i el medi líquid, el primer és el que presenta un clar i evident component biològic, influint sobre l'adherència segons les seves propietats de superfície . En aquest sentit, la hidrofobicitat i la càrrega neta superficial semblen afectar de forma significativa la taxa d'adherència bacteriana (Martinez-Martinez et al. 1991). A més, cal destacar les característiques de l'envolta cel·lular, segons si es tracta d'un bacteri gram-positiu o gram-negatiu. L'estructura de l'envolta cel·lular dels bacteris gram-negatius conté

proteïnes, lípids i glucopèptids amb lipopolisacàrids a la superfície externa. Els lipopolisacàrids tenen cadenes de diferent longitud, les quals influeixen en el grau d'hidrofobicitat de la superfície cel·lular i, per tant, en les taxes d'adherència. L'estructura de l'envolta dels bacteris gram-positius és molt més simple, formada fonamentalment per glucopèptid amb petites quantitats d'àcids teicoïcs i teicourònics, polisacàrids o proteïnes.

La taxa d'adherència també es veu afectada per la morfologia cel·lular i l'estructura del microorganisme. En aquest sentit, els bacils i els cocs tenen una baixa rugositat superficial, si es comparen amb els bacteris filamentosos (Brading et al. 1995). També és important el fet que un bacteri sigui mucoide o no, doncs en el primer cas semblen presentar una major adherència.

D'altra banda, alguns estudis mostren com el cicle de creixement influeix sobre la hidrofobicitat cel·lular. En general, la proporció de cèl·lules capaces d'adherir-se disminueix significativament durant el creixement actiu (5-8 h. d'incubació). Amb *Escherichia coli* i *Staphylococcus epidermidis* l'adhesivitat i la hidrofobicitat superficial disminueix durant els inicis i a meitat de la fase exponencial de creixement (Gilbert et al. 1991). Altres autors troben que les taxes d'adherència són més grans en la fase de latència, disminuint de forma progressiva en les fases estacionària i de mort dels cultius (Fletcher 1977), fenomen lligat molt probablement als canvis en la mobilitat cel·lular i en la quantitat o qualitat dels polímers de la superfície cel·lular.

La maduració i diferenciació de les microcolònies adherides per formar un biofilm sembla seguir una seqüència de fets programats genèticament. Recentment, alguns autors han remarcat la importància de diferents senyals cèl·lula a cèl·lula en el desenvolupament dels biofilms. Davant d'una determinada concentració cel·lular, l'acumulació d'aquests senyals desencadenaria l'expressió d'un set específic de gens. Així, *Pseudomonas aeruginosa* produeix al menys dues senyals extracel·lulars involucrades en la comunicació cèl·lula a cèl·lula i que tenen un paper en la diferenciació dels biofilms: LasI, que dirigeix la síntesi de la lactona 3-oxododecanoil-homoserina i RhII, que catalitza la síntesi de la lactona butil-homoserina (Davies et al. 1998). Experiments realitzats amb un mutant *lasI*, mostren com es produeixen biofilms plans no diferenciats i sensibles a un biocida, a diferència de les soques salvatges. Afegint la molècula senyal (lactona 3-oxododecanoil-homoserina) al mutant *lasI*, es restaura el desenvolupament del biofilm. Per tant, en aquest cas la diferenciació de cèl·lules individuals de *Pseudomonas aeruginosa* en estructures complexes multicel·lulars requereix un senyal de comunicació cèl·lula a cèl·lula (Davies et al. 1998).

1.2.3. Separació cel·lular de la superfície

Diferents factors afecten la separació dels bacteris una vegada aquests s'han aconseguit adherir. Es poden diferenciar tres **processos físics** principals: erosió per efecte de l'esforç de cisalla, abrasió i despreniment (Rittmann 1989). L'erosió és la separació contínua de petits fragments del biofilm, procés altament dependent de les condicions hidrodinàmiques del fluid i que augmenta amb el gruix del biofilm i l'esforç de cisalla del fluid a la interfase biofilm-líquid. L'abrasió és la pèrdua de biofilm com a resultat de les col·lisions entre partícules, mentre que el despreniment és la pèrdua ràpida i massiva de part del biofilm, separant-se trossos sencers del biofilm des de les zones més profundes en contacte amb la superfície (Brading et al. 1995). Aquest últim procés pot passar al mateix temps que l'erosió, encara que es produeix més en biofilms gruixuts desenvolupats en ambients rics en nutrients. Mentre que l'erosió és un procés continu que afecta a la biomassa de les superfícies externes, el despreniment sembla ser un procés esporàdic i aleatori que afecta a grans quantitats de biomassa. Entre les explicacions que justifiquen aquest fenomen cal parlar de la limitació per nutrients o la disminució d'oxigen en zones profundes del biofilm. En alguns casos, les limitacions a la transferència d'oxigen en biofilms gruixuts determinen que bacteris aeròbics facultatius es converteixin en anaeròbics produint-se el debilitament de l'estructura del biofilm.

Altres factors importants són la disponibilitat de nutrients i el tipus de medi que envolta el substrat. En aquest sentit, alguns dels components del medi poden ajudar a la separació com l'acció d'agents quelants. Aquests agents, com l'EGTA, redueixen la quantitat de calci del biofilm, fet que condueix a la disminució de la cohesivitat del biofilm (Turakhia et al. 1983).

Altres experiments mostren com la disminució de glucosa o nitrogen condueixen a la separació activa de les cèl·lules del biofilm (Delaquis et al. 1989), demostrant la importància de la disponibilitat de nutrients. Sota aquestes condicions limitants la biomassa adherida disminueix ràpidament, incrementant-se de forma simultània la biomassa de cèl·lules planctòniques. Per tant, la limitació per glucosa i nitrogen indueixen la migració activa i la separació de cèl·lules.

En aquest procés de separació també cal considerar a **processos biològics** com la producció de cèl·lules filles no adhesives, la falta d'oxigen i l'acumulació de productes residuals tòxics que poden afectar biològicament les cèl·lules actives i, en ambients naturals, la predació realitzada per protozous alimentant-se en la superfície externa del biofilm (Ritmann 1989, Lawrence et al. 1998). En general, el cicle de creixement també influeix activament en la separació bacteriana dels biofilms, ja que els bacteris creixent molt ràpidament no s'adhereixen bé als biofilms. Així, en experiments on s'augmentava la càrrega de substrate de forma considerable els biofilms experimentaven episodis de despreniment o separació massiva (Bakke et al. 1984).

1.3. Impacte del desenvolupament de biofilms

1.3.1. Distribució i ubiqüitat dels biofilms

Els bacteris constitueixen la forma de vida més estesa al planeta en termes de biomassa total, i de varietat i extensió dels hàbitats colonitzats. Malgrat la gran diversitat del genoma bacterià, la raó fonamental d'aquest èxit es troba en la plasticitat fenotípica, és a dir, l'habilitat del genotip per respondre fenotípicament als estímuls ambientals (Brown & Williams 1985).

En ambients naturals els bacteris tendeixen a existir com a poblacions sèssils. De fet, en sistemes aquàtics, per cada bacteri en forma planctònica n'hi han 1.000 o 10.000 adherits a les superfícies (Brading et al. 1995). Així, la formació de biofilms es produirà a pràcticament qualsevol superfície submergida, en qualsevol ambient on els bacteris siguin presents. Això és degut a que, com ja s'ha comentat anteriorment, els biofilms bacterians són capaços d'explotar els nutrients que s'acumulen en forma d'ions i macromolècules a la interfase superfície-aigua. Això els hi proporciona un avantatge ecològic en ambients nutricionalment desfavorables (Brown et al. 1977, Dawson et al. 1981).

D'altra banda, no existeix cap metall –fins i tot en el cas del coure que és tòxic- ni cap plàstic, ni cap material fabricat per l'home que resisteixi la colonització bacteriana (Costerton & Lappin-Scott 1989). Tampoc es coneix un bacteri que sigui 100% no adherent (Christensen 1989). Una roca dins l'aigua d'un rierol, les canonades d'aigua, un implant dins del cos humà, les dents, la superfície interna dels inodors, etc., són només alguns dels llocs on es poden arribar a desenvolupar els biofilms.

De fet, les úniques superfícies que resisteixen la colonització bacteriana degut a les seves característiques inherents, són les superfícies de molts teixits. La presència de cèl·lules fagocitàries, mucus, surfactants, anticossos i altres agents antimicrobians naturals recobrint les mucoses i el desprendiment periòdic de les cèl·lules dels teixits són alguns dels mecanismes coneguts que converteixen als teixits en resistents a la colonització microbiana encara que estiguin exposats a elevades concentracions de bacteris planctònics (Costerton & Lappin-Scott 1995).

1.3.2. Aspectes beneficiosos dels biofilms

Encara que sovint la formació de biofilms s'ha considerat com perjudicial, en molts casos pot ser beneficiosa. De fet, els biofilms s'utilitzen en el tractament d'aigües residuals per a la degradació de components orgànics solubles o residus nitrogenats. A la natura, la descomposició de fibres de cel·lulosa requereix primer l'adherència de bacteris cel·lulolítics, mentre que cèl·lules de *Rhizobium* formant biofilms a les arrels de plantes lleguminoses ajuden en la fixació del nitrogen atmosfèric. Els biofilms també actuen de forma positiva estabilitzant el sòl, bé actuant com a agents cimentadors o floculant les partícules, millorant l'aïreació i la percolació d'aigua i permetent més creixement microbià.

Sens dubte, el tractament d'aigües residuals és una de les aplicacions més importants que es fonamenta en l'habilitat dels microorganismes per formar biofilms. En aquest sentit, existeix una gran varietat de reactors amb diferents geometries, com els reactors de llit empaquetat, filtres percoladors, filtres amb medis plàstics, contactors biològics rotatoris (RBC), reactors de llit fluiditzat i reactors de cèl·lules immobilitzades en membranes (Byers 1993). Amb l'ajuda d'aquests reactors s'han tractat aigües residuals amb l'objectiu de millorar els processos de desnitrificació, eliminar cadmi, fenols i urani, i degradar compostos hidrocarbonats policlorats, toluè, glifosfats i altres (Byers 1993). Molt sovint, l'èxit d'aquests sistemes depèn de la dinàmica d'un cultiu microbià enriquit selectivament, el qual es capaç de metabolitzar substractes múltiples.

L'habilitat dels microorganismes per obturar medis porosos s'ha començat a utilitzar els darrers anys per crear "bio-barreres" que limitarien l'extensió d'abocaments tòxics. La barrera de microorganismes pot aïllar el plomall contaminant i, alhora, ajudar en la seva degradació (Jones et al. 1989, Blenkinsopp & Costerton 1991).

1.3.3. Problemes causats pels biofilms

Malgrat el gran esforç realitzat i els milers de milions de dòlars gastats, avui en dia no existeix un material resistent a la colonització bacteriana (Costerton 1995). Per tant, la formació de biofilms és important i pot significar l'origen de nombrosos problemes en sistemes naturals, biomèdics i industrials. Els efectes perjudicials documentats inclouen el deteriorament de materials i la corrosió, la colonització de canonades en torres de refrigeració, intercanviadors de calor, instal·lacions d'extracció de cru i vaixells, indústries alimentàries i en el tractament d'aigües, provocant increments en la resistència per fricció del fluid i a la transferència calorífica, adherència i infecció en implants biomèdics, teixits i dents, colonització de bioreactors i alteració dels seus paràmetres operacionals (Bryers 1993). El desenvolupament dels biofilms a les canonades pot arribar a restringir el flux i, alhora, disminuir la transferència calorífica efectiva entre la superfície i el líquid, disminuint l'eficàcia en sistemes de refrigeració industrials. En realitat, la formació de biofilms a les indústries ocasiona unes despeses molt importants, quantificades en més de 100.000 milions de pessetes anuals només a la Gran Bretanya (Bott 1997).

L'acceleració metabòlica i la concentració local d'àcids orgànics i altres productes corrosius pot ajudar en l'atac a diferents tipus de substrats. Atès que la difusió de les molècules produïdes per les microcolònies a través de la matriu es realitza a un ritme força més lent que la seva producció, en certes zones s'arriben a acumular concentracions realment elevades de productes corrosius (Costerton & Lewandowski 1997), els quals poden presentar efectes devastadors per a molts tipus de superfícies.

En sistemes industrials la proliferació de biofilms formats per bacteris heteròtrofs creixent a les parts externes, i bacteris reductors de sulfats a les parts internes, pot provocar danys considerables. Aquests biofilms permeten l'establiment de zones anaeròbies on creixen els bacteris reductors de sulfats. La producció de sulfur d'hidrogen pot deteriorar les canonades de ciment i provocar la corrosió de les estructures metàl·liques. A més, els microorganismes creen ànodes i càtodes a les superfícies metàl·liques, de forma que la distribució desigual dels ions provoca corrents elèctriques que resulten en la pèrdua de part de la superfície metàl·lica (Costerton & Lappin-Scott 1989).

Tal com es comentarà més endavant (veure 3.1.4) la indústria del tractament d'aigües es pot veure afectada pel despreniment de grans quantitats de biofilm acumulats a les parets de les canonades, que pot incrementar el nombre de microorganismes planctònics per sobre dels nivells recomanables per al consum públic. Els biofilms existeixen en tots els sistemes de distribució d'aigua amb temperatures per sota dels 60°C (Keevil et al. 1995), actuant moltes vegades com a reservoris per patògens potencials (Lappin-Scott & Costerton 1989). De fet, una proporció relativament important dels sistemes de distribució d'aigua potable experimenten de forma ocasional proliferacions bacterianes, sense que existeixin defectes apreciables dins de la xarxa de distribució (Smith et al. 1990). Increments en els nivells dels bacteris heteròtrofs i dels indicadors bacterians a l'aigua es poden produir com a resultat del creixement a la superfície de les canonades i el posterior alliberament a la fase aquosa (Camper 1994, LeChevallier et al. 1996). Això pot ocasionar problemes per les empreses que gestionen l'aigua de consum, doncs no es compleix amb els estàndards de qualitat de l'aigua i, alhora, s'erosiona la confiança del consumidor.

En general, qualsevol indústria que fabriqui productes on existeixi la presència d'algun tipus de líquid presenta el risc de desenvolupar biofilms, com a la indústria alimentària. Bacteris d'importància per a la salut pública, com *Listeria monocytogenes*, poden trobar refugi en els biofilms que es desenvolupen en poques hores als guants de goma, carros que transporten les carcasses, sistemes col·lectors d'aigües i altres (Carpentier & Cerf 1993). Fins i tot en el cas de tractar-se d'un biofilm de pocs dies, les cèl·lules estaran protegides dels agents antimicrobians.

1.3.4. Control de la formació i l'extensió dels biofilms

Atès que la formació de biofilms perjudicials és difícil de controlar, els mètodes per aconseguir-ho inclouen intents per eradicar els biofilms ja existents, prevenir l'adherència bacteriana i retardar-ne la seva formació. La neteja mecànica i els antimicrobians químics són els mètodes més utilitzats. Cal recordar que els bacteris que formen part dels biofilms (bacteris sèssils) són més resistents als agents antimicrobians que els bacteris en suspensió (bacteris planctònics) de la mateixa espècie (Brown et al. 1988). De fet, les cèl·lules sèssils són més resistents als surfactants, metalls pesants, antibiòtics, desinfectants, bacteriòfags, cèl·lules fagocitàries i predadors com amebes (Costerton 1995).

Els mecanismes fonamentals que explicarien aquesta millora en la resistència de les cèl·lules sèssils són la limitació en el transport i l'adaptació fisiològica. En el primer cas, la neutralització de l'agent antimicrobià és més ràpida que el seu transport cap a l'interior del biofilm (Stewart 1996). En general, els soluts difonen de forma més lenta dins dels biofilms que en l'aigua, segurament per l'efecte d'algunes de les substàncies polimèriques que es troben dins la matriu del biofilm (Costerton et al. 1999). La segona hipòtesi es basa en l'heterogeneïtat espacial que determina una distribució característica, on cèl·lules amb estats fisiològics diversos ocupen zones diferents. En molts casos, els microorganismes que creixen a l'interior del biofilm creixen lentament, limitats per la manca de nutrients. La deficiència de nutrients incrementa la resistència a diferents agents antimicrobians (Berg et al. 1982, Cargill et al. 1985, LeChevallier et al. 1988), desencadenant l'expressió de gens responsables de la síntesi de noves proteïnes (Matin & Harakeh 1990). Aquesta variabilitat podria ajudar a mantenir un "pool" de cèl·lules amb diferents estats metabòlics, fet que milloraria la capacitat de supervivència enfront de condicions ambientals adverses (Gilbert et al. 1990).

Tanmateix, és innegable que algunes de les cèl·lules sèssils són fenotípicament molt diferents de les planctòniques, com ja s'ha comentat anteriorment (veure 1.1.3). Aquest fenotip no és una resposta a la limitació per nutrients, sinó que es tracta d'una resposta biològica programada al creixement en superfícies (Costerton et al. 1999). A més, molts desinfectants no acaben de destruir l'estructura del biofilm. Això determina, sovint, la selecció dels microorganismes supervivents, els quals acostumen a produir grans quantitats de EPS que protegeixen les cèl·lules microbianes reaccionant amb els biocides i reduint-ne el seu efecte (Characklis & Dydek 1976).

D'altra banda, els processos de neteja, desinfecció o la manca de nutrients produeixen l'estrès de les cèl·lules de l'interior del biofilm, fins al punt que moltes d'aquestes cèl·lules no es poden arribar a cultivar. De fet, a la majoria dels ambients naturals només una petita fracció (0,1–1%) de la població de microorganismes vius consisteix en cèl·lules cultivables (Bianchi & Bianchi 1991). La presència d'aquests microorganismes no es podrà detectar amb els mètodes tradicionals que impliquen la utilització de cultius. No obstant, el fet que les cèl·lules no es poden arribar a cultivar no significa que siguin cèl·lules mortes, perquè poden multiplicar-se i transferir-se a altres ambients quan les condicions es tornen favorables. Aquesta situació es pot produir per mètodes de neteja que creen aerosols, els quals poden ajudar al transport de microorganismes com *Listeria monocytogenes*, els quals poden mantenir-se a l'aire durant 3_{1/2} hores (Spurlock & Zottola 1991).

En situacions industrials, s'ha demostrat com el control absolut de la formació de biofilms a les superfícies no és possible. S'ha intentat l'eliminació o eradicació dels biofilms existents amb l'ajuda de neteges mecàniques, reemplaçant els materials o unitats afectades, utilitzant biocides químics o eliminant nutrients essencials pel creixement microbià. En indústries petroquímiques i refineries, s'utilitzen els biocides i oxidants de forma habitual, per suprimir la colonització, especialment en intercanviadors de calor, encara que moltes vegades s'inactiven les cèl·lules bacterianes però no s'afecta la matriu del biofilm (Bryers 1993). La modificació de les propietats químiques de la superfície del substrat, adsorbint surfactants catiónics o amb la reducció de la rugositat superficial, ha ajudat a prevenir l'adherència a biomaterials en certs casos. La incorporació dins del substrat d'antisèptics com la clorhexidina o antibiòtics d'alliberament lent com la gentamicina, ha ajudat a retardar l'activitat microbiana i la formació dels biofilms. En vaixells, s'ha controlat l'extensió de la colonització incorporant metalls pesants en la pintura (Bryers 1993). No obstant, moltes vegades aquests tractaments només són efectius durant curts períodes de temps.

1.4. Plantejament i objectius del treball

El desenvolupament de tècniques i metodologies cada vegada més sofisticades, on cal destacar la microscòpia confocal, han obert una porta a la comprensió de l'estructura i del desenvolupament dels biofilms. Malgrat tot, la gran varietat de mètodes existents per a l'anàlisi de les mostres de biofilms dificulten la comparació dels resultats obtinguts. De fet, avui en dia no existeix encara un mètode estandarditzat i àmpliament acceptat per separar, desagregar i quantificar la població de bacteris adherits (Levy et al. 1997).

L'estudi de la formació de biofilms en sistemes de distribució d'aigua plantejava una sèrie d'interrogants:

- I. És possible analitzar in situ la formació de biofilms en sistemes de distribució d'aigua, així com determinar el potencial de formació de biofilms a partir d'aigües d'origen diferent?
- II. S'estructuren de manera semblant les comunitats de microorganismes dels sistemes de distribució de característiques diferents?
- III. En quin grau aquestes comunitats de microorganismes adherides poden ser diferents de les comunitats de microorganismes planctònics?
- IV. El desenvolupament de biofilms als sistemes de distribució pot representar un risc per a la salut pública? Es pot quantificar aquest risc?

Amb aquestes qüestions prèvies, el treball realitzat va començar amb un clar **objectiu general**:

- ✓ *Desenvolupar un sistema experimental per analitzar la colonització microbiana de superfícies, especialment a partir de sistemes de distribució d'aigua.*

Aquest sistema havia de presentar una sèrie de requisits per ajudar a respondre les preguntes anteriors. S'havia de:

- ✓ Desenvolupar un sistema fàcilment operatiu, de baix manteniment i aplicable tant en condicions de camp com de laboratori.
- ✓ Obtenir el màxim de mostra de biofilm amb el mínim espai i temps necessari.
- ✓ Quantificar alhora les cèl·lules adherides i les planctòniques, identificant grups de microorganismes dins dels dos tipus de poblacions.
- ✓ Realitzar un seguiment de l'evolució al llarg del temps de les poblacions que formen part dels biofilms desenvolupats.
- ✓ Comprovar l'efecte de diferents paràmetres, com el tipus de material de suport o l'esforç de cisalla, sobre la colonització microbiana.
- ✓ Determinar el potencial de formació de biofilms a partir d'aigües d'òrgens diferents.
- ✓ Avaluar el risc sanitari de la formació de biofilms.

Per poder assolir aquests objectius, es va escollir el reactor de llit empaquetat com a sistema experimental, i esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a material de suport per a la colonització. Amb l'objectiu de respondre a les preguntes plantejades prèviament al treball experimental i, a les que han anat sorgint al llarg d'aquest camí, va ser necessari:

- 1) Desenvolupar el sistema experimental per la colonització de superfícies i procedir a la seva instal·lació al laboratori de Microbiologia de la EUOOT (UPC), així com en dues zones al camp, a partir d'aigües subterrànies.
- 2) Posar a punt la metodologia òptima d'extracció dels biofilms i quantificació de la població bacteriana adherida i planctònica. S'ha partit dels protocols previs utilitzats pel Grup Europeu d'Estudi de Biomasses Adherides.
- 3) Optimitzar el rendiment del sistema per obtenir el màxim de mostra, comprovant l'efecte de diferents paràmetres, com el tipus de material de suport o l'esforç de cisalla, sobre la colonització microbiana.
- 4) Optimitzar l'observació directa de les mostres amb diferents mètodes microscòpics i de tinció.
- 5) Controlar la formació dels biofilms utilitzant un condicionador catalític d'aigües
- 6) Quantificar el risc sanitari en la reutilització d'aigües subterrànies per a la irrigació de parcs i jardins urbans, desenvolupant prèviament la metodologia d'avaluació del risc.

1.5. Estructura de la memòria del treball

El treball presentat s'estructura en forma de 6 capítols. El capítol 2 segueix l'estructura d'un article presentat (en premsa), on es descriuen les principals característiques del sistema experimental per a la colonització microbiana de superfícies. Es descriuen les característiques generals i la forma d'operar del sistema experimental utilitzat per a la colonització de superfícies. També es mostra la posta a punt, calibratge en laboratori, reproductibilitat del mostreig, optimització del mètode i primers resultats de camp, descrivint el rendiment del reactor utilitzat. Apart, es mostren els resultats de colonització segons el tipus de material de suport i l'estrès de cisalla utilitzat, així com la influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós.

Després de descriure la metodologia utilitzada per a les analítiques microbiològiques i la identificació dels microorganismes planctònics i sèssils, incloent l'equipament de laboratori, medis de cultiu i reactius químics, protocols de treball i procediments utilitzats, en el capítol 3 es mostren els resultats obtinguts en aplicar el sistema experimental en situacions de camp. El sistema s'ha utilitzat per avaluar la formació de biofilms a partir d'aigües subterrànies, en dues zones de mostreig diferents. Els resultats s'han comparat amb els obtinguts a partir del mostreig d'una xarxa de distribució d'aigua potable.

En el capítol 4 s'ha fet un seguiment de les comunitats microbianes presents als tres sistemes al llarg del temps, i s'ha intentat caracteritzar l'estructura dels biofilms formats a partir de la seva visualització per microscòpia confocal.

En el capítol 5 s'ha aplicat un condicionador catalític al sistema experimental utilitzat, per determinar la seva influència sobre la colonització microbiana i avaluar la seva eficàcia en el control de la formació de biofilms, en sistemes de distribució a partir d'aigües subterrànies.

Finalment, els resultats obtinguts als capítols 2, 3, 4 i 5, s'han utilitzat en el capítol 6 per determinar la contribució del biofilm a la càrrega microbiana de l'aigua de la xarxa de distribució. Malgrat les evidents dificultats, s'ha intentat avançar en la definició de l'avaluació del risc sanitari de la formació de biofilms en aigües subterrànies reutilitzades.

Una discussió general, seguida de les conclusions que es desprenen del treball realitzat, així com d'un annex en format CD-Rom – on consten tots els PNT de cada una de les tècniques utilitzades en aquest treball -, completen el contingut d'aquesta memòria.

1.6. Bibliografia

- Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J. & A.W. Neumann. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:90-97.
- Amann, R.L., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. & D.A. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 614-623.
- Anwar, H., Dasgupta, M.K. & J.W. Costerton. 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:2043-2046.
- Anwar, H., Strap, J.L. & J.W. Costerton. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1347-1351.
- Baier, R.E. 1980. Substrate influence on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In *Adsorption of microorganisms to surfaces*, ed. G. Bitton & K.C. Marshall. pp. 59-104. New York: Wiley.
- Bakke, R., Trulear, M.G., Robinson, J.A. & W.G. Characklis. 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnol. Bioeng.* 26:1418-1424.
- Banks, M.K. & J.D. Bryers. 1991. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1874-1879.
- Berg, J.D., Matin, A. & P.V. Roberts. 1982. Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 814-818.
- Bianchi, A. & M. Bianchi. 1991. Ecologie microbienne et environnement global. *Bulletin de la Societe Française de Microbiologie.* 6: 7-10.
- Blenkissopp, S.A. & J.W. Costerton. 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology*, 9, 138-143.
- Bott, T.R. 1997. Biofilms in process and industrial waters. *In International Conference on Biofilms in Aquatic Systems*, Warwick, UK.
- Bouwer, E.J. 1987. Theoretical investigation of a particle deposition in biofilm systems. *Wat. Res.* 21:1489-1498.
- Brading, M.G., Jass, J. & H.M. Lappin-Scott. 1995. Dynamics of bacterial biofilm formation. In *Microbial Biofilms*, ed. H.M. Lappin-Scott & J.W. Costerton. pp. 46-63. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Brown, C.M., Ellwood, D.C. & J.R. Hunter. 1977. Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation. *FEMS Microbiol. Lett.* 1:163-166.
- Brown, M.R.W. & P. Williams. 1985. The influence of the environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:527-556.
- Brown, M.R.W., Allison, D.G. & P. Gilbert. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* 22:777-783.
- Bryers, J.D. 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol. Prog.* 3: 57-68.
- Bryers, J.D. 1993. Bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnol.* 4:197-204.
- Busscher, H.J., Bellon-Fontaine, M.N., Sjollema, J. & H.C. van der Mei. 1990. Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to solid surfaces. In *Microbial cell surface hydrophobicity*, ed. R.J. Doyle & M. Rosenberg, pp. 335-359. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Caldwell, D.E. & J.R. Lawrence. 1986. Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb. Ecol.* 12:299-312.
- Caldwell, D.E. & J.R. Lawrence. 1989. Study of attached cells in continuous flow slide culture. In *Handbook of laboratory model systems for microbial ecosystem research*, ed. J.W.T. Wimpenny, pp. 117-138. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Caldwell, D.E., Korber, D.R. & J.R. Lawrence. 1992. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 12:1-67.
- Camper, A.K. 1994. Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: a review. In *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems* (Geesey, G.G., Lewandowski, Z. & H.C. Flemming, eds), pp. 91-105. CRC Press: Boca Raton.

- Cargill, K.L., Pyle, B.H., Sauer, R.L. & G.A. McFeters. 1985. Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol.* 38, 423-429.
- Caron, D.A. 1987. Grazing of attached bacteria by heterotrophic microflagellates. *Microbial Ecology*, 13:203-218.
- Carpentier, B. & O. Cerf. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 499-511.
- Confer, D.R. & B.E. Logan. 1991. Increased bacterial uptake of macromolecular substances with fluid shear. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3093-3100.
- Costerton, J.W. & H.M. Lappin-Scott. 1989. Behaviour of bacteria in biofilms. *Am.Soc. Microbiol. News.* 55, 650-654.
- Costerton, J.W. & H.M. Lappin-Scott. 1995. Introduction to microbial biofilms. In *Microbial Biofilms*. Lappin-Scott, H.M. & J.W. Costerton. Pp. 1-11.
- Costerton, J.W. & Z. Lewandowski. 1997. The biofilm lifestyle. *Adv. Dent Res.* 11(1):192-195.
- Costerton, J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15:137-140.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I. & J.C. Nickel. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. & H.M. Lappin-Scott. 1995. *Microbial Biofilms*. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & G. James. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176(8):2137-2142.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- Characklis, W.G. & K.C. Marshall. 1990. *Biofilms*. New York: Wiley.
- Characklis, W.G. & K.E. Cooksey. 1983. Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl. Microb.* 29: 93-138.
- Characklis, W.G. & S.T. Dydek. 1976. The influence of carbon-nitrogen ratio on the chlorination of microbial aggregates. *Wat. Res.* 10, 515-522.
- Characklis, W.G., McFeters, G.A. & K.C. Marshall. 1990. Physiological ecology in biofilm systems. In *Biofilms*, ed. W.G. Characklis & K.C. Marshall, pp. 341-393. New York, Wiley.
- Christensen, B.E. & W.G. Characklis. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In *Biofilms*, ed. W.G. Characklis & K.C. Marshall, pp. 93-130. New York: Wiley.
- Christensen, B.E. 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J. Biotechnol.* 10, 181-202.
- Dagostino, L., Goodman, A.E. & K.C. Marshall. 1991. Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling*, 4:113-119.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M. & G.G. Geesey. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1181-1186.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton J.W. & E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-298.
- Dawson, M.P., Humphrey, B.A. & K.C. Marshall. 1981. Adhesion: a tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr. Microbiol.* 6:195-199.
- DeBeer, D., Stoodley, P. & Z. Lewandowski. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotech. Bioeng.* 44: 636-641.
- Delaquis, P.J., Caldwell, D.E., Lawrence, J.R. & A.R. McCurdy. 1989. Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology*, 18:199-210.
- Dempsey, M.J. 1981. Marine bacterial fouling: A scanning electron microscopy study. *Marine Biology*, 61:305-315.
- Derjaguin, B.V. & L. Landau. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions and electrolytes. *Acta Physicochimica URSS*, 14:633-662.
- Escher, A. & W.G. Characklis. 1990. Modeling the initial events in biofilm accumulation. In *Biofilms*, ed. W.G. Characklis & K.C. Marshall, pp. 445-486. New York: Wiley.
- Ferris, F.G., Schultze, S., Witten, T.C., Fyfe, W.S. & T.J. Beveridge. 1989. Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1249-1257.

- Fletcher, M. & G.I. Loeb. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:67-72.
- Fletcher, M. & K.C. Marshall. 1982. Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:184-192.
- Fletcher, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* 23:1-6.
- Fletcher, M. 1986. Measurement of glucose utilization by *Pseudomonas fluorescens* that are free-living and that are attached to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 672-676.
- Gilbert, P., Collier, P.J. & M.R.W Brown. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1856-1868.
- Gilbert, P., Evans, D.J., Evans, E., Duguid, I.G. & M.R.W. Brown. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Appl. Bacteriol.* 71:72-77.
- Hamilton, A. 1988. Biofilms at the interface between microbiology and engineering. *Trends Biotechnol.* 7:19-20.
- Hamilton, W.A. & W.G. Characklis. 1989. Relative activities of cells in suspension and in biofilms. In *Structure and Function of Biofilms*. Characklis, W.G. & P.A. Wilderer, eds., pp. 199-219. John Wiley & Sons Ltd.
- Jahn, A. & P.H. Nielsen. 1996. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech.* 32:157-164.
- Jones, W. L., Bucklin, K.E. & A.K. Camper. 1989. Determination of a method for optimization of in situ biodegradability of subsurface soil contaminants. Presented at the Conference on Hazardous Waste Research, Kansas State Univ., Kansas.
- Keevil, C.W., Rogers, J. & J.T. Walker. 1995. Potable-water biofilms. *Microbiol. Eur.* 3(6):10-14.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. & K.C. Marshall. 1982. The effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1166-1172.
- Kolebrander, P.E. 1989. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregation and their mediators. *Critical Reviews in Microbiology.* 17:137-159.
- Korber, D.R., Lawrence, J.R., Lappin-Scott, H.M. & J. W. Costerton. 1995. Growth of microorganisms on surfaces. In *Microbial Biofilms*, ed. H.M. Lappin-Scott & J.W. Costerton, pp.15-45. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Lappin-Scott, H.M. & J. W. Costerton. 1989. Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling.* 1:323-342.
- Lappin-Scott, H.M. & J. W. Costerton. 1995. *Microbial Biofilms*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Lawrence, J.R. & D.E. Caldwell. 1987. Behaviour of bacterial stream populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb. Ecol.* 14: 15-27.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. & D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558-6567.
- Lawrence, J.R., Scharf, B., Podemski, C., Culp, J.M. & T.R. Neu. 1998. Effect of invertebrate grazing on the distribution of algae, bacteria and exopolymer in river biofilms. Pp. 411. In *International Conference on Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*. IAWQ. Lake Bluff, Illinois, USA.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. & R.G. Lee. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 649-654.
- LeChevallier, M.W., Welch, N.J. & D.B. Smith. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2201-2211.
- Levy, Y. c/o Chairman. 1997. Standard method to evaluate aquatic biofilms. In *International Conference on Biofilms in Aquatic Systems*, 1997, Warwick, UK.
- Lewandowski, Z., Altobelli, S.A., Majors, P.D. & E. Fukushima. 1992. NMR imaging of hydrodynamics near microbially colonized surfaces. *Wat. Sci. Tech.* 26: 577-584.
- Lewis, D.L. & D.K. Gattie. 1990. Effects of cellular aggregation on the ecology of micro-organisms. *Am. Soc. Microbiol. News.* 56, 263-268.
- Loeb, G.I. & R.A. Neihof. 1975. Marine conditioning films. *Advances in Chemistry Series.* 145:319-335.
- Marshall, K.C. 1980. Bacterial adhesion in natural environments. In *Microbial adhesion to surfaces*, ed. R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter & B. Vincent, pp. 187-196. Chichester: Ellis Harwood.

- Marshall, K.C. 1985. Bacterial adhesion in oligotrophic habitats. *Microbiological Sciences*, 2:323-326.
- Marszalek, D.S., Gerchakov, S.M. & L.R. Udey. 1979. Influence of substrate composition on marine microfouling. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:987-995.
- Martinez-Martinez, L. Pascual, A. & E.J. Perea. 1991. Kinetics of adherence of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to plastic catheters. *J. Med. Microbiol.* 34:7-12.
- Matin, A. & S. Harakeh. 1990. Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants. In *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments* ed. McFeters, G.A. pp. 88-104. New York: Brock/Springer Series in Contemporary Science, Springer Verlag.
- Nielsen, P.H. 1987. Biofilm dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:27-32.
- Powell, M.S. & N.K.H. Slater. 1983. Deposition of bacterial cells from laminar flows onto solid surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* 25:891-900.
- Ritmann, B.E. 1989. Detachment from biofilms. In *Structure and function of biofilms*, ed. W.G. Characklis & P.A. Wilderer, pp. 49-58. New York: Wiley.
- Santos, R., Callow, M.E. & T.R. Bott. 1991. The structure of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in contact with flowing systems. *Biofouling*, 4:319-336.
- Schmitt, J. & H.C. Flemming. 1998. Water binding in biofilms. In *Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*, pp. 104-111. Lake Bluff, Illinois: IAWQ.
- Shapiro, J.A. & C. Hsu. 1989. *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. *J. Bacteriol.* 171:5963-5974.
- Sibbald, M.J. & L.J. Albright. 1988. Aggregated and free bacteria as food sources for heterotrophic microflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:613-616.
- Silvester, N.R. & M.A. Sleight. 1985. The forces on microorganisms at surfaces in flowing waters. *Freshwater biology*. 15:433-448.
- Sjollema, J., van der Mei, H.C., Uyen, H.M.W. & H.J. Busscher. 1990. The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral streptococci in a parallel plate flow cell. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 4:765-777.
- Smith, D.B., Hess, A.F. & S.A. Hubbs. 1990. Survey of distribution system coliforms occurrences in the United States. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, San Diego, California, November, pp. 1103-1116.
- Sotelo, G. 1994. *Hidráulica General*. Vol. 1: Fundamentos. México D.F.: Limusa Ed.
- Spurlock, A.T. & E.A. Zottola. 1991. The survival of *Listeria monocytogenes* in aerosols. *Journal of food protection*. 54: 910-912, 916.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. & L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079-1084.
- Stanley, P.M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* 29:1493-1499.
- Stewart, P.S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2517-2522.
- Stewart, P.S., Peyton, B.M., Drury, W.J. & R. Murga. 1993. Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:327-329.
- Trulear, M.G. & W.G. Characklis, W.G. 1982. Dynamics of biofilm processes. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* 54: 1288-1301.
- Turakhia, M.H., Cooksey, K.E. & W.G. Characklis. 1983. Influence of calcium-specific chelant on biofilm removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1236-1238.
- van der Mei, H.C., Bos, R. & H.J. Busscher. 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*. 11:213-221.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., & A.J.B. Zehnder. 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17:1-15.

van Loosdrecht, M.C.W., Lyklema, J., Norde, W. & A.J.B. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* 54:75-87.

Verwey, E.J.W. & J.T.G. Overbeek. 1948. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Amsterdam: Elsevier.