

María Luisa Gómez-Lus¹
María Teresa Corcuera²
Rafael Gómez-Lus³
Claudia Sánchez-Serrano³
Fernando Gómez-Aguado²
María José Alonso²
José Prieto¹

Dinámica estructural de colonias/biofilm de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii*

¹Departamento de Medicina, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

²Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Carlos III de Madrid.

³Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina e Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Universidad de Zaragoza.

RESUMEN

Objetivos. El género *Legionella* engloba especies muy pleomórficas responsables de brotes infecciosos en humanos. En la aparición de los mismos tiene gran importancia el desarrollo de biofilms en ecosistemas acuáticos artificiales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de crecimiento y la evolución de la estructura interna de colonias de especies representativas del género como modelo de biofilm estático.

Material y métodos. Colonias aisladas de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii* crecidas en medios específicos durante tres y quince días fueron procesadas por métodos histológicos de inclusión en parafina y resina epoxi para su análisis mediante microscopía óptica, microscopía electrónica y análisis de imagen.

Resultados. En las colonias de ambas especies se observaron patrones arquitecturales definidos y específicos, basados en la estratificación y que evolucionan en el tiempo. Los estratos se diferencian por la cantidad de matriz extracelular, la morfología y densidad poblacional y la proporción de células muertas. La estructura interna de las colonias de tres días presentaba grandes diferencias entre *L. pneumophila* (dos estratos) y *L. bozemanii* (cuatro estratos). Sin embargo, en las colonias de quince días ambas especies evolucionaron hacia un patrón único común formado por tres estratos. En ambas especies se comprobó también el crecimiento en el interior del medio de cultivo, aunque este fenómeno fue mucho más intenso en *L. bozemanii*, con invasiones únicas, centrales y de gran tamaño.

Conclusiones. Nuestros resultados demuestran que las colonias de *Legionella* sobre medio de cultivo sólido son un buen modelo de biofilm estático, con una dinámica estructural compleja caracterizada por la presencia de subpoblaciones morfológicas y funcionales. La aproximación histológica em-

pleada en este modelo permitirá estudiar adaptaciones evolutivas de comunidades multicelulares a medios hostiles, así como la respuesta a los antimicrobianos de las especies de *Legionella* de interés clínico.

Palabras clave: *Legionella*, biofilm, colonia, comunidad bacteriana.

Structural dynamics of *Legionella pneumophila* and *Legionella bozemanii* colony/biofilm

ABSTRACT

Objectives. The genus *Legionella* includes very pleomorphic species responsible for disease outbreaks in humans. The appearance of such has great importance to develop artificial biofilms in aquatic ecosystems. The aim of this work was to study the dynamics of growth and evolution of the internal structure of colonies of representative species of the genus as static biofilm model.

Methods. Isolated colonies of *Legionella pneumophila* and *Legionella bozemanii* grown in specific media for three and fifteen days were processed for histological methods and embedded in paraffin and epoxy resin for analysis by light microscopy, electron microscopy and image analysis.

Results. In colonies of both species were observed and defined specific architectural patterns, based on stratification and evolve over time. The strata differ in the amount of extracellular matrix, the morphology and population density and the proportion of dead cells. The internal structure of three days colonies showed large differences between *L. pneumophila* (two layers) and *L. bozemanii* (four layers). However, in the fifteen days colonies of both species evolved towards a common unique pattern formed by three layers. In both species the growth was also found within the culture medium, although this phenomenon was more intense in *L. bozemanii* with unique, central and larger invasions.

Conclusions. Our results demonstrate that *Legionella* colonies on solid culture media are a good model of static biofilm with a complex structural dynamics characterized by the

Correspondencia:
María Luisa Gómez-Lus
Departamento de Medicina, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.
Avda Complutense s/n
28040 Madrid
E-mail: mglus@med.ucm.es

presence of morphological and functional subpopulations. We bring here an histological approach model, allowing, in further research, detailed studies in evolutionary adaptations in multicellular communities to adverse media and to antimicrobials in *Legionella* species of clinical interest.

Keywords: *Legionella* biofilm colony, bacterial community.

INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies del género *Legionella* se distribuyen ampliamente en ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales. Sus ciclos vitales son relativamente complejos, pudiendo desarrollarse extracelularmente o como parásitos intracelulares de amebas y otros protozoos acuáticos. Cuando crecen extracelularmente forman comunidades organizadas de células agregadas, denominadas biofilms, que pueden presentar diferentes estructuras e incluso integrar otros microorganismos, como protozoos y algas¹.

Aunque el género *Legionella* engloba a más de 45 especies, el 90% de las infecciones humanas son causadas por *Legionella pneumophila*. Esta especie es extremadamente pleomórfica² y muchos de sus cambios morfológicos se acompañan de cambios fisiológicos durante su ciclo vital, siendo capaz de sobrevivir largos periodos de falta de nutrientes en el agua y en las fases entre huéspedes³.

Habitualmente, los biofilms se estudian en la interfase entre un soporte inerte y un medio líquido que aporta los nutrientes. Usando microscopía electrónica de barrido, microscopía confocal y técnicas de genética molecular se ha analizado la morfología externa del biofilm, se han identificado subpoblaciones funcionales en distintas localizaciones espaciales, se han descrito interacciones tróficas y se han desarrollado modelos tridimensionales evolutivos⁴⁻⁶. Sin embargo, la arquitectura interna del biofilm no ha sido todavía desvelada.

Recientemente, el análisis de colonias bacterianas mediante métodos histológicos⁷ ha desvelado que éstas no consisten en un acúmulo homogéneo de células, sino que constituyen auténticas comunidades organizadas con una estructura espacial interna característica de cada especie e independiente de su perfil de resistencia a antibióticos^{7,8}, por lo que podrían considerarse un tipo de biofilm que se desarrolla en la interfase entre un medio de cultivo sólido que aporta los nutrientes y un medio gaseoso, la atmósfera.

Dada la importancia que tiene la formación de biofilm en el desarrollo y crecimiento de especies de *Legionella* en ambientes acuáticos artificiales, por su implicación en la aparición de brotes infecciosos en humanos, en el presente trabajo planteamos estudiar la dinámica de crecimiento y la evolución de patrones arquitecturales en las colonias de dos especies representativas del género.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y técnicas de cultivo. Se utilizaron dos cepas de

colección: *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (UZ72189) y *Legionella bozemanii* serogrupo 2 (ATCC 35545). Suspensiones bacterianas en solución salina se ajustaron a 0.5 McFarland. Con el fin de obtener colonias aisladas, cinco diluciones seriadas en base 10 de las suspensiones iniciales fueron sembradas (20 µL) por triplicado en medio glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (GVPC) e incubadas durante 3 y 15 días a 35°C, manteniendo constantes las condiciones de humedad para evitar la desecación del medio.

Procesamiento histológico de las colonias. Al finalizar cada período de incubación, las placas de cultivo fueron inundadas con 20 ml de una solución de agar al 2% a 45°C, dejando enfriar hasta solidificación. Para cada especie y tiempo de incubación, se tallaron un mínimo de 10 bloques de agar conteniendo colonias aisladas. Los bloques se fijaron por inmersión en formaldehído al 4% durante 24 h y se incluyeron en parafina en un procesador automático de tejidos a vacío Leica TP 1050, utilizando el protocolo convencional para biopsias humanas. Secciones transversales finas de las colonias (4 µm) fueron teñidas con técnicas histoquímicas, como Hematoxilina-Eosina, Gram, Giemsa y Rojo Nilo, para su estudio por microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia.

Adicionalmente, otras 10 colonias aisladas fueron incluidas en resina epoxi como se ha descrito previamente⁷. Brevemente, los bloques de agar se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.4; se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% en tampón Sym-collidine, pH 7.4; se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, incluyendo el tratamiento con acetato de uranilo al 1% en alcohol al 70%; y finalmente se incluyeron en resina epoxi (Eponate 12) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Ted Pella, Inc., California). Secciones transversales semifinas de las colonias (0.5 µm) se tiñeron con azul de toluidina al 1% para su observación por microscopía óptica. Secciones ultrafinas (50 nm) se tiñeron con citrato de plomo de Reynolds para su observación por microscopía electrónica de transmisión.

Análisis de imagen. El estudio morfométrico de las colonias se realizó con el software de análisis de imagen Leica QWin. Las placas de cultivo se fotografiaron con una cámara digital convencional antes de ser inundadas con la solución de agar al 2%. Las imágenes obtenidas se procesaron para medir diámetro máximo y área de las colonias aisladas. Se midieron 20 colonias por cada especie y tiempo de incubación, siendo la media \pm desviación estándar de las 20 medidas el valor asignado a cada lote.

Para cuantificar los distintos componentes de la estructura interna de las colonias, se obtuvieron microfotografías de las secciones transversales semifinas teñidas con azul de toluidina mediante una cámara digital Leica DC300 acoplada a un microscopio Leica DM5000B. Concretamente se analizaron 10 secciones por cada especie y tiempo de incubación, correspondientes a otras tantas colonias. En cada sección se midió el grosor de cada uno de los estratos observados en el punto en el que la distancia entre la línea del agar y la superficie de la colonia es máxima. Para cada estrato, se consideró su grosor

como la media de las 10 medidas realizadas y se expresó como porcentaje de la altura total de la colonia.

RESULTADOS

Macroscópicamente, las colonias de ambas especies fueron circulares y convexas, con bordes regulares. Las colonias de *L. pneumophila* crecieron más rápidamente, alcanzando a los 15 días un diámetro máximo de $6,85 \text{ mm} \pm 0,10$ y un área de $36,91 \text{ mm}^2 \pm 0,13$, frente a un diámetro máximo de $4,15 \text{ mm} \pm 0,29$ y un área de $13,61 \text{ mm}^2 \pm 1,90$ de las colonias de *L. bozemanii*.

La observación microscópica de las secciones transversales de las colonias, perpendiculares a la superficie del agar, puso de manifiesto la existencia de patrones arquitecturales definidos y específicos, característicos de cada especie, basados en la estratificación y que evolucionaban en el tiempo. Estos patrones diferían en gran medida en tiempos cortos de incubación

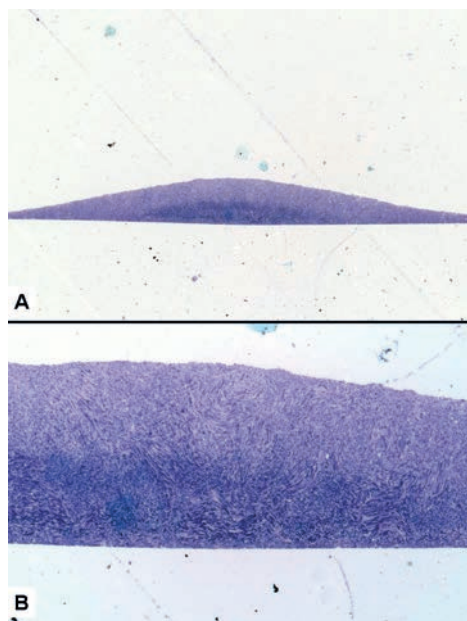


Figura 1

Sección semifina transversal de una colonia de *L. pneumophila* de 3 días de evolución, teñida con azul de toluidina. A) Vista panorámica a bajo aumento (50x) en la que se aprecia un estrato central y basal con alta densidad poblacional, recubierto por un grueso estrato superficial de menor densidad poblacional. B) A mayor aumento (400x) se observan densos cordones de bacilos en disposición radial desde el estrato basal hacia la superficie.

entre las dos especies estudiadas, pero convergían en un patrón común a los 15 días. Concretamente se observaron las siguientes características morfológicas:

A) 3 días de incubación:

Las colonias de *L. pneumophila* estaban constituidas por dos estratos: un estrato basal, de gran densidad poblacional, con predominio de formas cocobacilares, del que salen en disposición radial densos cordones de bacilos hacia un amplio estrato superficial, de menor densidad poblacional, que ocupa aproximadamente el 50% del espesor de la colonia en su zona central (figuras 1 y 2). En un número muy reducido de colonias se observaron microinvasiones del medio de cultivo en forma de pequeñas masas esféricas de bacilos, separadas de la base de la colonia, creciendo en el espesor del agar.

Las colonias de *L. bozemanii*, por el contrario, estaban constituidas por cuatro estratos (figura 3): 1) un estrato basal, muy fino y uniforme, en contacto con el medio de cultivo, en el que predominan las formas cocobacilares; 2) un amplio estrato central, que ocupa casi el 60% del espesor de la colonia, constituido fundamentalmente por restos celulares muy poco degradados; 3) un estrato intermedio, de alta densidad poblacional, en el que predominan formas bacilares; 4) un estrato superficial, claro, similar en grosor al anterior, de muy baja densidad poblacional, constituida principalmente por formas bacilares dispersas en el seno de una abundante matriz extracelular de aspecto homogéneo. En numerosas colonias se observó una invasión única del medio de cultivo, en forma de estructura esférica de gran tamaño (alrededor del 15% del tamaño del crecimiento sobre la superficie del agar), en posición

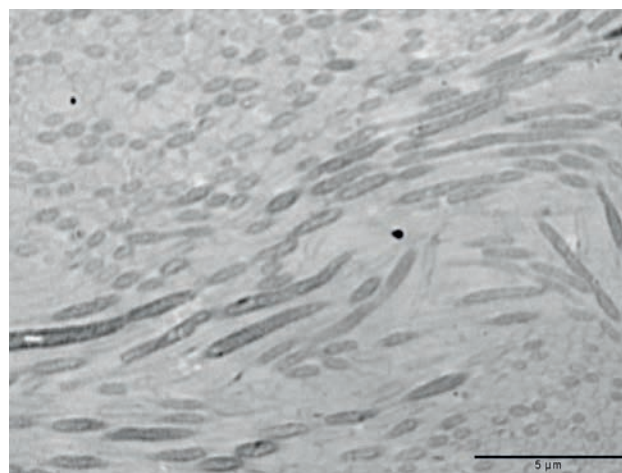


Figura 2

Detalle de uno de los cordones de bacilos observados en las colonias de *L. pneumophila* de tres días de evolución, obtenido por microscopía electrónica de transmisión (citrato de plomo, 5000x).

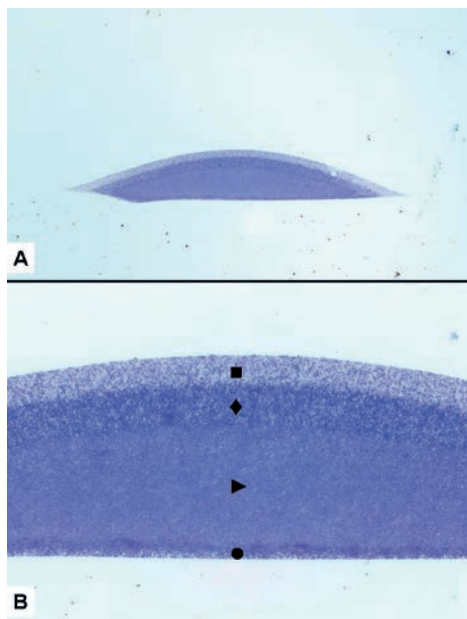


Figura 3

Sección semifina transversal de una colonia de *L. bozemanii* de 3 días de evolución, teñida con azul de toluidina. A) Vista panorámica a bajo aumento (50x) en la que se observa un patrón estratificado. B) A mayor aumento (400x) se distinguen claramente los cuatro estratos descritos en el texto: basal (●), central (▶), intermedio (◆) y superficial (■).



Figura 4

Sección fina transversal de una colonia de *L. bozemanii* de 3 días de evolución teñida con Rojo Nilo, en la que se observa una macroinvasión única del medio de cultivo en forma de estructura circular de gran tamaño en posición central. (50x)

características similares al estrato basal de las colonias de *L. bozemanii* de tres días de evolución; 2) central, de baja densidad poblacional, constituido principalmente por formas bacilares, matriz extracelular y restos celulares degradados, que ocupa aproximadamente la mitad del espesor de la colonia; 3) superficial, de alta densidad poblacional. La única diferencia entre ambas especies radica en el grosor de los estratos basal (mayor en *L. bozemanii*) y superficial (mayor en *L. pneumophila*). En la tabla 1 se comparan los grosores de estos estratos.

En las dos especies se observaron invasiones del medio de cultivo similares a las descritas a los tres días de evolución. Sin embargo, en las colo-

nias de *L. pneumophila* no se observaron los cordones de bacilos característicos de las colonias de 3 días.

En todas las colonias, independientemente de la especie y el tiempo de incubación se apreció una gran cohesión, no observándose dispersión de bacilos en la superficie.

En la tabla 2 se resumen de manera comparativa las principales características que definen los distintos patrones de crecimiento observados.

Tabla 1

Grosores relativos, expresados como porcentaje respecto a la altura total de la colonia, de los distintos estratos identificados en las colonias de *L. pneumophila* y *L. bozemanii*.

| Estratos | <i>L. pneumophila</i> | | <i>L. bozemanii</i> | |
|-----------------|-----------------------|---------|---------------------|---------|
| | 3 días | 15 días | 3 días | 15 días |
| 4 (Superficial) | 47,3 % | 43,6 % | 15,0 % | 33,7 % |
| 3 (Intermedio) | --- | --- | 19,2 % | --- |
| 2 (Central) | --- | 53,0 % | 58,2 % | 55,4 % |
| 1 (Basal) | 52,7 % | 3,4 % | 7,6 % | 10,9 % |

central, que se desprende desde el estrato basal sin mantener contacto con el mismo y que muestra una alta densidad poblacional (figura 4).

En la tabla 1 se detallan los grosores relativos de los distintos estratos identificados en cada una de las especies.

B) 15 días de incubación:

Ambas especies presentaron un patrón arquitectural similar constituido por tres estratos (figura 5): 1) basal, de

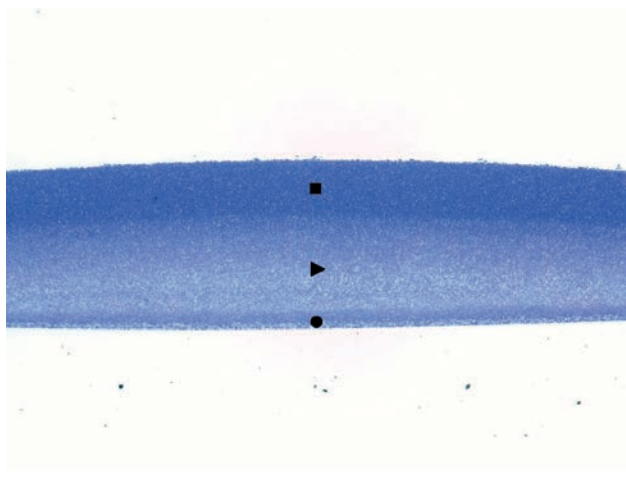


Figura 5

Sección semifina transversal teñida con azul de toluidina de una colonia de *L. bozemanii* tras 15 días de evolución, en la que se observa una estructura interna constituida por tres estratos: basal (●), central (►) y superficial (■), cuyas características se describen en el texto. (400x).

Tabla 2

Características fenotípicas que definen los distintos patrones arquitecturales observados en las colonias de *L. pneumophila* y *L. bozemanii*.

| Carácter fenotípico | <i>L. pneumophila</i> | | <i>L. bozemanii</i> | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| | 3 días | 15 días | 3 días | 15 días |
| Nº de estratos | 2 | 3 | 4 | 3 |
| Presencia de cordones | Sí | No | No | No |
| Invasión del agar | | - Rara | | - Frecuente |
| | | - Múltiple | | - Única y central |
| | | - Esférica | | - Esférica |
| | | - Microinvasión | | - Macroinvasión |

DISCUSIÓN

En este estudio se analiza la evolución temporal de la estructura interna de colonias de *L. pneumophila* y *L. bozemanii* mediante técnicas histológicas. Esta aproximación metodológica es válida desde el momento en que se asimilan las poblaciones bacterianas organizadas (colonias y biofilms) a "tejidos procariotas", toda vez que las células que las integran tienen un origen común, se desarrollan en el seno de una matriz extracelular producida por ellas mismas y se diferencian en subpoblaciones funcionales⁶. En este sentido, nuestros resultados

demuestran que las colonias de las dos especies estudiadas siguen patrones arquitecturales dinámicos y complejos basados en la estratificación, como ocurre en especies del género *Staphylococcus* y en *Escherichia coli*⁷⁻⁹. Los distintos estratos observados se diferencian por la cantidad y propiedades tintoriales de la matriz extracelular, la densidad poblacional, la morfología celular y la proporción de células muertas. El análisis morfológico de los mismos permite intuir una diferenciación celular funcional. Así, en el estrato superior de las colonias de tres días de ambas especies se identifica una subpoblación de células bacilares que probablemente producen gran cantidad de matriz extracelular. Este fenómeno es especialmente intenso en las colonias de *L. bozemanii*, en las que el estrato superficial recuerda una cubierta protectora, similar a la capa córnea de un epitelio estratificado, posibilitando, probablemente, el desarrollo de microambientes concretos en el interior de la colonia. En el estrato basal de las colonias de 15 días, por el contrario, predominan las formas cocobacilares, características de subpoblaciones con alta tasa de replicación e intensa actividad metabólica, recordando la capa basal de un epitelio estratificado.

En colonias jóvenes (3 días) se observan arquitecturas diferentes en las dos especies estudiadas, por lo que se podría considerar como un carácter fenotípico característico de especie. Sin embargo, en colonias envejecidas (15 días) se observa una convergencia hacia un patrón estructural único, característico de género, similar al observado en *S. epidermidis*⁹ y micobacterias¹⁰ y caracterizado por la organización en tres estratos. Dado que este patrón se repite en especies alejadas filogenéticamente, es probable que presente alguna ventaja evolutiva para el mantenimiento de la comunidad bacteriana en situaciones de empobrecimiento de nutrientes. Una característica importante de este patrón de largo plazo es la presencia de un grueso estrato central constituido por matriz extracelular y una elevada proporción de células muertas y restos celulares poco degradados. Este estrato podría tener una doble funcionalidad: por una parte ejercería una función mecánica de sostén, impidiendo el colapso de la colonia y, por otra parte, podría constituir una reserva de nutrientes para las células del estrato superficial, muy alejadas del medio de cultivo empobrecido. En este sentido, se ha descrito el crecimiento necrotrófico de *L. pneumophila* a expensas de restos de elementos estructurales de bacilos gram negativos¹¹, por lo que es posible que las bacterias del estrato superficial utilicen como nutrientes los restos celulares del estrato central mediante fenómenos de canibalismo similares a los descritos en *Bacillus subtilis*¹².

Otro fenómeno interesante observado en ambas especies es el crecimiento en el interior del medio de cultivo, aunque con diferencias en frecuencia, número y tamaño

de las invasiones. Este carácter fenotípico se ha descrito recientemente en varias especies bacterianas, tanto gram positivas, como gram negativas¹³. Sin embargo, *Legionella bozemanii*, mediante la tinción de Rojo Nilo, soluble en lípidos, presenta la peculiaridad de producir invasiones únicas, esféricas y de gran tamaño. Estas invasiones del medio se originan a expensas del estrato basal de la colonia y pueden representar una estrategia adicional de supervivencia mediante tropismo a favor de gradiente de nutrientes. Pero también pueden representar una estrategia de diseminación y colonización, toda vez que las estructuras invasoras acaban desprendiéndose de la base de la colonia en forma de émbolos que profundizan en el medio de cultivo. Permanece por aclarar si la invasión del medio de cultivo es una característica de género, común a todas las especies de *Legionella*, o es un carácter fenotípico expresado sólo por algunas cepas y si guarda relación con una mayor patogenicidad, al igual que sucede en levaduras¹⁴.

Finalmente, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las colonias bacterianas crecidas sobre medio de cultivo sólido a partir de unidades formadoras de colonias, constituyen un tipo de biofilm estático, similar a las colonias/biofilm obtenidas a partir de suspensiones celulares¹⁵, que posibilita la realización de estudios sobre formación y desarrollo de comunidades bacterianas organizadas, así como la respuesta a agentes antimicrobianos, como alternativa a los modelos de flujo continuo. En concreto, en el caso de un género tan pleomórfico como *Legionella*, se plantean nuevos interrogantes para futuros trabajos sobre las adaptaciones evolutivas morfológicas de las comunidades multicelulares que les permiten sobrevivir en medios hostiles y colonizar nuevos nichos ecológicos acuáticos que resisten a los biocidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 2004; 53: 29-40.
- Young KD. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 660-703.
- Faulkner G, Garduño RA. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 2002; 184: 7025-41.
- Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PLoS One* 2011; 6: e16177.
- Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 2010; 12: 557-66.
- Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Control of cell fate by the formation of an architectural complex bacterial community. *Genes Dev* 2008; 22: 945-53.
- Gómez-Aguado F, Alou L, Corcuera MT, Sevillano D, Alonso MJ, Gómez-Lus ML, Prieto J. Evolving architectural patterns in microbial colonies development. *Microsc Res Tech* 2011; 74: 925-30.
- Gómez-Aguado F, Gómez-Lus ML, Corcuera MT, Alou L, Alonso MJ, Sevillano D et al. Colonial architecture and growth dynamics of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22: 224-7.
- Gómez-Lus ML, Gómez-Aguado F, García-Rey C, Corcuera MT, Ramos C, Prieto J. Comparative spatio-temporal evolving histology of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* colony/biofilm. *App Cell Biol* 2012; 1: 38-46.
- Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Esteban J, Ramos C, Gómez-Lus ML, Prieto J. Dinámica poblacional de *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum*. XV Reunión Científica del grupo español de Micobacteriología, 2010.
- Temmerman R, Vervaeren H, Nosedá B, Boon N, Verstraete W. Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4323-8.
- González-Pastor JE, Hobbs ED, Losick R. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 2003; 301: 510-3.
- Gómez-Aguado F, Corcuera MT, García-Rey C, Gómez-Lus ML, Ramos C, Alonso MJ et al. Invasion of solid culture media: a widespread phenotypic feature of clinical bacterial isolates. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26: 97-102.
- Zupan J, Raspor P. Quantitative agar-invasion assay. *J Microbiol Methods* 2008; 73: 100-104.
- Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 2011; 22: 1B.1.1-1B.1.18.