

# ARTÍCULOS ORIGINALES

## Formación de biopelículas por micoplasmas de importancia médica

GABRIELA FUENTES-GARCÍA<sup>1</sup>  
LILIA CEDILLO-RAMÍREZ<sup>2</sup>  
JOSÉ ANTONIO RIVERA-TAPIA<sup>2</sup>

### Resumen

**Objetivo.** El objetivo de este estudio fue evaluar la formación de biopelículas por micoplasmas de interés médico.

**Métodos.** La formación de las biopelículas se realizó en microplacas, fueron enjuagadas con solución PBS para remover las células que no se adhirieron y se tiñeron con solución de cristal violeta al 0,5% durante 30 minutos. La formación de biopelículas por parte de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma penetrans* se analizó por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

**Resultados.** Los micoplasmas evaluados mostraron la capacidad para formar biopelículas, lo cual se evidenció por medio de la tinción de cristal violeta. Las biopelículas formadas en las microplacas y analizadas por microscopía mostraron agregados de microcolonias. La formación de biopelículas por parte de *M. fermentans*, *M. pneumoniae* y *M. penetrans* se presentó a las 72 horas de incubación. Se comparó la formación de biopelícula y la cuantificación de plancton, y se encontró correlación.

**Conclusión.** Se debe considerar que este estudio se hizo bajo condiciones de laboratorio y que, para trabajos futuros, se recomienda utilizar modelos animales para definir cómo contribuyen estos agregados en la persistencia en los huéspedes. Estos resultados sugieren que la capacidad de *M. fermentans*, *M. pneumoniae* y *M. penetrans* para formar biopelículas puede considerarse un factor de virulencia, y un evento importante en la patogénesis y evolución en infecciones asociadas con el uso de dispositivos médicos.

**Palabras clave:** *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, formación de biopelículas, estudio *in vitro*.

---

1 Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

2 Laboratorio de Micoplasmas, Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

**Title:**

Biofilm formation by mycoplasmas of medical importance

**Abstract**

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate the development of biofilms by mycoplasmas of medical importance.

**Methods:** Biofilms grown in microtiter plates were rinsed briefly in PBS to remove non-adherent cells and stained with 0,5% crystal violet solution for 30 minutes. The biofilm formation by mycoplasma species were analyzed by optical and scanning electron microscopy.

**Results:** Three mycoplasma species were assessed for their ability to form biofilms. Crystal violet staining of biofilms in microtiter plates revealed the ability of mycoplasma to form a biofilm. Microscopic analysis of crystal violet stained biofilms on microtiters indicated aggregation to form microcolonies. Biofilm growth by *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma penetrans* was followed over a time course of 72 hours. Mycoplasma were also analyzed quantitatively for biofilm formation and cell counts compared for both biofilm and plankton cells. Cell counts for biofilms showed a good correlation with results obtained using crystal violet staining.

**Conclusion:** This study has examined biofilm formation under *in vitro* laboratory conditions. Further studies on animal models will be crucial to determine if biofilms form *in vivo* and whether they contribute to mycoplasma persistence in the host. These results suggest that the ability of *M. fermentans*, *M. pneumoniae* and *M. penetrans* to form a biofilm may be a virulence factor, and an important event in the pathogenesis and evolution in infections associated with the use of medical devices.

**Key words:** *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, biofilm formation, *in vitro* study.

**Introducción**

Las biopelículas son comunidades microscópicas que consisten esencialmente de agregados que forman capas finas en diversas superficies; estos complejos no sólo están conformados por células microbianas, sino también por un biopolímero extracelular que producen esos microorganismos. En el caso de las bacterias, éstas se adhieren a la superficie por apéndices proteicos caracterizados por una estructura filiforme que se enlaza en la superficie donde van a permanecer. Ya fijos, comienzan a producir material polimérico que consiste básicamente de polisacáridos y agua. La cantidad producida puede exceder la masa de las células bacterianas por un factor de 100 veces o más. De tal forma, la estructura de la biopelícula ofrece protección para la supervivencia de los microorganismos[1,2].

Los micoplasmas son un grupo de microorganismos que pertenecen a la clase Mollicutes y se caracterizan por ser los procariontes más pequeños de vida libre hasta ahora descritos. No presentan los precursores para la síntesis de pared celular y su tamaño genómico oscila entre 577 y 2.220 kpb[3].

Los antígenos de superficie (proteínas Vsa) de *Mycoplasma pulmonis* modulan la susceptibilidad al complemento, la susceptibilidad a fagos y la capacidad para la formación de bio-

películas[4,5]. La formación *in vitro* de biopelículas por *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma cotewii*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma putrefaciens*, y *Mycoplasma yeatsii*, entre otros, que no son de importancia médica, tienen la capacidad para la formación de biopelículas al igual que otras bacterias [6,7]. En relación con lo anterior, proponemos el estudio de la formación de biopelículas por micoplasmas de importancia médica.

## Métodos

### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

*Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma penetrans* fueron proporcionados por el cepario del laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; se cultivaron en caldo Eaton y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación, se sembraron 5 µl del cultivo e incubaron bajo las mismas condiciones, esto con la finalidad de obtener el inóculo para evaluar 1 x 10<sup>6</sup> UFC/ml.

### Análisis de la formación de la biopelícula por tinción de cristal violeta

En microplacas de 96 pozos se colocaron 50 µl de caldo Eaton más 50

µl de cultivo de *M. pneumoniae* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC/ml, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurridas 24, 48 y 72 horas, se sembraron 5 µl de la fase de plancton en agar Eaton se adicionaron a cada pozo 25 µl de caldo Eaton, y se incubaron bajo las mismas condiciones. Transcurridas las 72 horas, se eliminó el cultivo y se enjuagaron las microplacas con solución PBS para remover las células que no se encontraban adheridas. Se procedió a agregar 200 µl de solución de cristal violeta al 0,5% y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Se enjuagaron las microplacas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para *M. fermentans* y *M. penetrans*, se realizó el mismo esquema de trabajo. Las microplacas se sometieron a microscopía óptica con la finalidad de observar la formación de la biopelícula.

### Microscopía electrónica de barrido

Se realizaron cortes de los pozos y se deshidrataron las muestras con alcohol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100%, durante una hora cada concentración. Las muestras se fijaron con solución de etanol: acetona 30:70, 50:50 y 70:30, durante 20 minutos cada concentración. Las muestras se trataron a punto crítico en acetona al 100% y se revistieron con oro, y se examinaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410-LV.

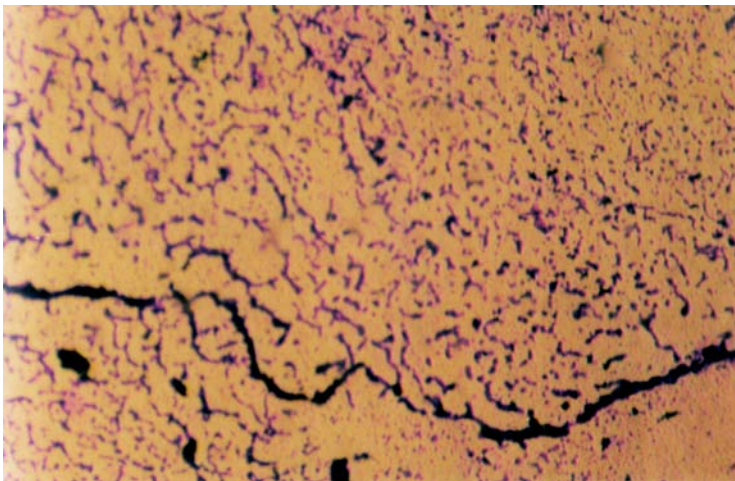
## Resultados

Durante las 72 horas de incubación se revisaron las microplacas con el fin de determinar los cambios presentados en la formación de las biopelículas por parte de las especies de micoplasmas estudiadas. Se observó crecimiento de biopelícula en las paredes de las microplacas; en estas zonas de los pozos teñidos con cristal violeta y observados por microscopía óptica, se determinó para *M. fermentans* formación de biopelícula en forma de aglomerados e hilos; estas formaciones corresponden a adherencia de tipo específica (figura 1). Por su parte, la cuantificación de plancton se encontró disminuida hacia las 72 horas, respecto al inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

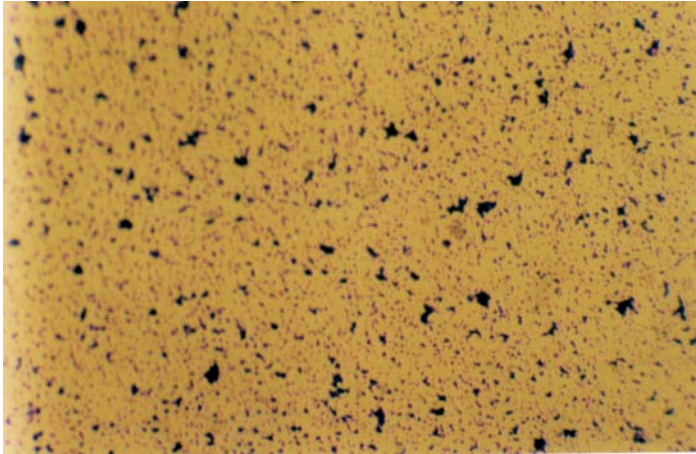
*M. pneumoniae* y *M. penetrans* también presentaron crecimiento en las paredes de los pozos de las microplacas, caracterizado por la presencia de aglomerados, pero en menor cantidad que *M. fermentans* (figuras 2 y 3), y el examen con microscopía electrónica de barrido confirmó la formación de biopelícula sobre las paredes de los pozos (figura 4). La cuantificación de plancton para *M. pneumoniae* y *M. penetrans* fue mayor de  $1 \times 10^6$  UFC/ml hacia las 72 horas (tabla 1).

## Discusión

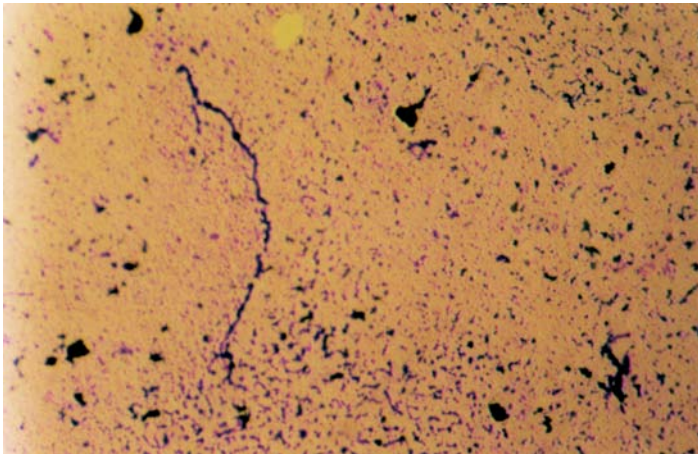
Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o crecer de forma de plancton. Con un mismo genotipo, la bacteria



**Figura 1.** Imagen de microscopía óptica de la formación de biopelícula en microplacas por *Mycoplasma fermentans*, 72 horas posincubación y teñidas con cristal violeta (40x).



**Figura 2.** Formación de biopelícula por *Mycoplasma pneumoniae*, 72 horas después de la incubación y teñida con cristal violeta (40x).



**Figura 3.** Crecimiento de la biopelícula de *Mycoplasma penetrans*, 72 horas posincubación y teñida con cristal violeta (40x).

**Tabla 1**  
**Capacidad de los micoplasmas evaluados para formar biopelículas**

Especie	Ensayo cualitativo	Cuantificación planctónica
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+++	1 <sup>3</sup> UFC/ml
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	++	1 <sup>6</sup> UFC/ml
<i>Mycoplasma penetrans</i>	++	1 <sup>6</sup> UFC/ml

+ nivel bajo de adherencia, ++ moderada adherencia, +++ alta adherencia.

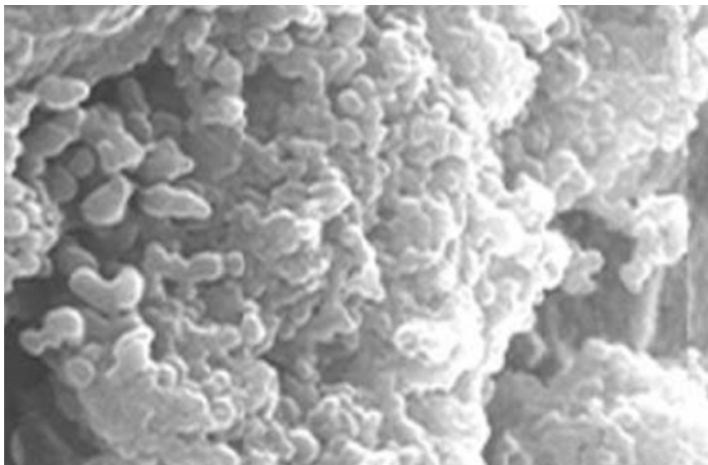
expresa un fenotipo distinto. Aunque existe una variación considerable entre los distintos ensayos, se ha demostrado que hasta 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre una bacteria crecida en condiciones de plancton o de biopelícula. Entre estos genes, de forma reiterada se encuentra una gran proporción de genes cuya función es desconocida, lo que indica que hay genes específicos del estilo de vida en biopelícula[8-12].

Recientemente, se demostró que algunas especies de micoplasmas que no son de interés médico pueden formar biopelículas, no obstante que estos microorganismos presenten mínimos sistemas genéticos de regulación[7].

Aunque algunos micoplasmas pueden producir estructuras complejas

como “organelos” de colonización, su genoma sólo codifica pocos cientos de proteínas. La proteína denominada antígeno variable de superficie (*variable surface antigen*, Vsa) del patógeno respiratorio de ratón *M. pulmonis* está asociada como factor de virulencia y en la modulación de diferentes propiedades del micoplasma, que incluyen la susceptibilidad al complemento, la capacidad de hemadsorción y la formación de biopelículas[4-6,13].

Las variaciones observadas entre *M. fermentans*, *M. pneumoniae* y *M. penetrans*, respecto a la formación de biopelículas y la cuantificación de plancton, se puede relacionar con la producción de fragmentos cortos de la proteína VsaA, VsaG o VsaH, lo cual favorece la formación de biopelículas en cristal o poliestireno. En contraste, cuando los micoplasmas



**Figura 4.** Microscopía electrónica de barrido (6000x) que muestra formación de biopelícula por parte de *Mycoplasma fermentans*, 72 horas posincubación.

producen fragmentos largos de la proteína VsaA-R40 o VsaG-R40, no se observa formación de biopelícula en vidrio o poliestireno[6].

En conclusión, ya que se ha demostrado que diversas especies de micoplasmas forman biopelículas en superficies inertes se puede sugerir la participación de estos microorganismos en la formación de biopelículas en instrumental médico y condicionar infecciones intrahospitalarias.

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo otorgado al proyecto RITJ-NAT08-I.

## Bibliografía

- Christensen BE. *The role of extracellular polysaccharides in biofilms*. J Biotechnol. 1989;10:181-202.
- Davies D, Geesey GG. *Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture*. Appl Environ Microbiol. 1995;61:860-7.
- Razin S, Yogev D, Naot Y. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1094-156.
- Simmons WL, Denison AM, Dybvig K. *Resistance of Mycoplasma pulmonis to complement lysis is dependent on the number of Vsa tandem repeats: shield hypothesis*. Infect Immun. 2004;72:6846-51.
- Simmons WL, Dybvig K. *The Vsa proteins modulate susceptibility of Mycoplasma pulmonis to complement, hemadsorption, and adherence to polystyrene*. Infect Immun. 2003;71:5733-8.
- Simmons WL, Bolland JR, Daubenspeck JM, Dybvig K. *A stochastic mechanism for biofilm formation by Mycoplasma pulmonis*. J Bacteriol. 2007;189:1905-13.
- McAuliffe L, Ellis RJ, Miles K, Ayling RD, Nicholas RAJ. *Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival*. Microbiology. 2006;152:913-22.
- Uzcudan IL. *Biofilms bacterianos*. Actualidad SEM. 2004;37:14-8.
- Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, Gorur A, Gotsch F, Webster P, et al. *Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection*. Am J Obstet Gynecol. 2008;198:135.
- Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville AS. *Staphylococcus aureus biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis*. Infect Immun. 2007;75:4219-26.
- Lynch SV, Dixon L, Benoit MR, Briode EL, Keyhan M, Hu P, et al. *Role of the rapA gene in controlling antibiotic resistance of Escherichia coli biofilms*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3650-8.

12. Pal Z, Urban E, Dosa E, Pal A, Nagy E. *Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use.* J Med Microbiol. 2005;54:1199-203.
13. Talkington DF, Fallon MT, Watson HL, Throp RK, Casell GH. *Mycoplasma pulmonis V-1 surface protein variation: occurrence in vivo and association with lung lesions.* Microb Pathol. 1989;7:429-36.