

## Artículo original

## Capacidad adherente de *Nocardia brasiliensis* a superficies inertes como fase inicial en la formación de biopelículas

Laura Estela Castrillón Rivera,\* Violeta Karen Espinosa Antúnez,\* Alejandro Palma Ramos,\*  
María del Carmen Padilla Desgarenes\*\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización de los microorganismos. Crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y se adhieren a una superficie inerte o a un tejido vivo. La formación de las biopelículas es un proceso continuo que sigue varias fases: acondicionamiento, adhesión, síntesis de matriz extracelular, maduración y dispersión, lo que lleva al desarrollo de una estructura uniforme a manera de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeadas de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua.

**Objetivo:** evaluar diferentes tipos de soporte inerte que permitan la adherencia como fase inicial en la generación de las biopelículas por *Nocardia brasiliensis*, así como su cinética de formación sobre acetato, para corroborar su capacidad de crear filamentos.

**Material y método:** se utilizaron como soportes cubreobjetos de vidrio y acetatos de las marcas comerciales PCM, Kronalin-E y Office Max para impresora y copiadora. Se prepararon medios bifásicos en cuatro cajas de Petri de vidrio, con agar dextrosa Sabouraud en un volumen de aproximadamente 10 mL por cada caja, y caldo Sabouraud adicionado de *Nocardia brasiliensis* a una concentración de  $90 \times 10^6$  UFC/mL.

**Resultados:** se encontró adherencia en los tres tipos de acetatos, pero el mejor fue el acetato Office Max, seguido del PCM y del Kronalin-E; el vidrio no dio buenos resultados.

**Discusión:** se encontraron diferencias en la capacidad adherente y en la homogeneidad de crecimiento entre los distintos materiales. Se determinó la cinética de adherencia al acetato de esta bacteria, y se observó un aumento en las UFC/placa y la formación de filamento de las colonias en estas condiciones.

**Conclusión:** se logró la adherencia de *Nocardia brasiliensis* a materiales inertes como los acetatos y plásticos (en cajas de Petri desechables), que es el primer paso para lograr el modelo experimental para el desarrollo de biopelículas por este microorganismo.

**Palabras clave:** *Nocardia brasiliensis*, actinomicetos, actinomicetoma, biopelículas.

### ABSTRACT

**Background:** Biofilms are bacterial communities that are the most successful form of colonization of microorganisms. They are considered as bacterial communities enclosed in a self-produced exopolymeric matrix and attached to an inert surface or a living tissue. Biofilm's formation occurs as a continuous process with multiple steps of development; these steps are: conditioning, attachment, synthesis of extracellular matrix, maturation and dispersion, leading by surrounding oneself with the formation of a uniform structure like homogeneous deposits and viscous cell accumulation of a polymeric matrix with open channels for water movement.

**Objective:** To assess different types of inert surfaces that allow the attachment as an initial phase in the biofilm's formations by *Nocardia brasiliensis*, as well as its kinetics of formation on plastic, confirming its ability to form filaments.

**Material and method:** Glasses and printer acetate of the trademarks PCM, Kronalin-E and Office Max were used as inert surfaces. Biophasic media was prepared in four boxes of glasses Petri in which were placed 10 mL of Agar Dextrose Sabouraud and broth Sabouraud with a concentration of  $90 \times 10^6$  UFC/mL of *Nocardia brasiliensis* in each box.

**Results:** Adherence was found in the three types of acetate, the best one was Office Max followed by the PCM and the Kronalin-E; the glass didn't give good results.

**Discussion:** Differences in the capacity of adherence and homogeneity were found depending of the kind of the material used. Besides the kinetic of adherence to plastic plate was gotten by these bacterial, which showed an increase of UFC/plate and filamentation of this colony and in these conditions.

**Conclusion:** Adherence was achieved by *N. brasiliensis* into inert materials like acetate and plastics (boxes of disposable Petri); this is the first step for the experimental model in the development of biofilms by *N. brasiliensis*.

**Key words:** *Nocardia brasiliensis*, actinomycetes, actinomycetoma, biofilms.

Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización de los microorganismos; son ubicuas en la naturaleza y las responsables de la destrucción de diversas estructuras como cañerías y láminas metálicas, y del deterioro de barcos, puentes o cualquier construcción que tenga contacto directo con el agua y se vincule con el fenómeno de corrosión microbiana;<sup>1-3</sup> también son el origen de muchas enfermedades, como fibrosis quística, otitis media, periodontitis e infecciones nosocomiales, entre otras.<sup>4-6</sup> Se consideran comunidades bacterianas que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y adheridas a una superficie inerte o un tejido vivo.<sup>7</sup>

La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases que son: acondicionamiento, adhesión, síntesis de matriz extracelular, maduración y dispersión,<sup>8</sup> lo que lleva a la generación de una estructura uniforme a manera de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeadas de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua.<sup>9,10</sup> La interrupción de cualquiera de estas fases puede evitar el desarrollo de biopelículas.

Se tomó como ejemplo de estas comunidades bacterianas el actinomicetoma, ya que el microorganismo entra por medio de un traumatismo en la piel y se adhiere a la dermis profunda y al tejido celular subcutáneo, donde inicia su proliferación y producción del exopolisacárido englobando al microorganismo hasta formar un grano.<sup>11</sup> En varios procesos infecciosos se ha demostrado que la

biopelícula ofrece protección al microorganismo contra el sistema inmunitario del huésped, y que se requieren concentraciones elevadas de antibióticos para su tratamiento debido a que proporciona una barrera de resistencia a los antibióticos mil veces mayor que su forma planctónica.<sup>12</sup> El crecimiento microbiano se hace lento en las biopelículas debido a la limitación de nutrientes.<sup>13</sup> Debido a estas características se distingue a la infección como crónica, ya que no es eliminada, y ocurren episodios recurrentes. La biopelícula es, por tanto, fundamental para la supervivencia y propagación del microorganismo al interior del huésped.<sup>14,15</sup>

Para estudiar la formación de biopelículas *in vitro* de agentes patógenos del actinomicetoma por especies de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*<sup>16,17</sup> es importante tener un modelo experimental que favorezca el desarrollo de estas estructuras y establecer estrategias para su degradación.

## OBJETIVOS

Evaluar diferentes tipos de soporte inerte que permitan la adherencia como fase inicial en la formación de las biopelículas por *Nocardia brasiliensis*, así como su cinética de formación sobre acetato, y corroborar su capacidad de crear filamentos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron como soportes para el estudio de adherencia cubreobjetos de vidrio de 2 x 2 cm y acetatos de las marcas comerciales PCM de impresora y copiadora de toner seco, así como acetatos de retroproyección para impresora láser y copiadoras a color Kronalin-E y Office Max. Los acetatos se cortaron en cuadros de 2 x 2 cm y se esterilizaron por autoclave a 121°C a 15 libras de presión. Antes de esterilizar y usar el vidrio, éste fue pretratado con ácido sulfúrico para remover cualquier material orgánico.

Para elaborar la solución de *Nocardia brasiliensis* se colocaron 15 mL de solución salina fisiológica con perlas de vidrio en un tubo de vidrio con tapón de rosca, el cual se esterilizó a 15 libras (121°C) durante 15 minutos; posteriormente, se agregó una gran cantidad de *N. brasiliensis* y se agitó hasta formar una suspensión homogénea que se ajustó al tubo 3 del nefelómetro de McFarland (900 x 10<sup>6</sup> UFC/mL).

\* Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

\*\* Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, SS.

Correspondencia: Dra. Laura Estela Castrillón Rivera. Laboratorio de Inmunología N. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, colonia Villa Quietud, CP 04960, México, DF. Correo electrónico: lcrivera@correo.xoc.uam.mx  
Recibido: agosto, 2010. Aceptado: octubre, 2010.

Este artículo debe citarse como: Castrillón-Rivera LE, Espinosa-Antúnez VK, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Capacidad adherente de *Nocardia brasiliensis* a superficies inertes como fase inicial en la formación de biopelículas. Dermatol Rev Mex 2011;55(1):17-23.

### Ensayo de adherencia

Se prepararon medios bifásicos en cuatro cajas de Petri de vidrio con agar dextrosa Sabouraud a un volumen de aproximadamente 20 mL por caja; se colocaron cuadros de los diferentes materiales clavándolos en forma inclinada: tres con cada tipo de acetato y uno con los cubreobjetos de vidrio (aproximadamente cinco por caja). Se hizo una suspensión con 90 mL de caldo dextrosa Sabouraud y 10 mL de suspensión de *Nocardia brasiliensis*. De esta disolución se agregaron 20 mL aproximadamente a cada caja y se incubaron a 37°C con agitación constante y lenta durante 15 días (Figura 1).



**Figura 1.** Medio bifásico de agar Sabouraud y caldo Sabouraud adicionado de *Nocardia brasiliensis*.

Para el análisis de la adherencia a los materiales utilizados en los días 1, 2, 4, 7, 8, 10 y 15, se realizó la tinción de la siguiente forma: en una caja de Petri con agua destilada se introdujo un cuadro de cada tipo de material para eliminar el exceso de agar, posteriormente se colocó en un portaobjetos que contenía una gota de azul de metileno (1 g/100 mL) y se analizó al microscopio; también se determinó la homogeneidad y la dispersión bacteriana.

### Tinción de Gram

Se lavaron los acetatos y cubreobjetos, y se colocaron en una caja de Petri con agua destilada para eliminar el exceso de agar y las bacterias que no quedaron unidas; se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente hacer la tinción de Gram. Se colocó primero el colorante cristal violeta durante dos minutos, y después se enjuagaron con agua destilada mediante pases en una caja de Petri para no exponerlos a la presión de la llave y desprender las bacterias unidas; se agregó entonces el lugol, también durante dos minutos. Los cuadros se decoloraron con alcohol-acetona por 30 segundos para eliminar el exceso de colorante, luego se cubrieron con safranina

aproximadamente 30 segundos; por último, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente antes de colocarlos en un portaobjetos para observarlos al microscopio. El objetivo de esta tinción es apreciar la morfología bacteriana.

### Cinética de adherencia

Se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración de  $90 \times 10^6$  UFC/mL, y de esta mezcla se agregaron 5 mL a cajas de Petri desechables (de 6 x 1.5 cm), con una concentración final de  $450 \times 10^6$  UFC/mL. Se incubaron a 37°C y se tomaron muestras diariamente durante 17 días.

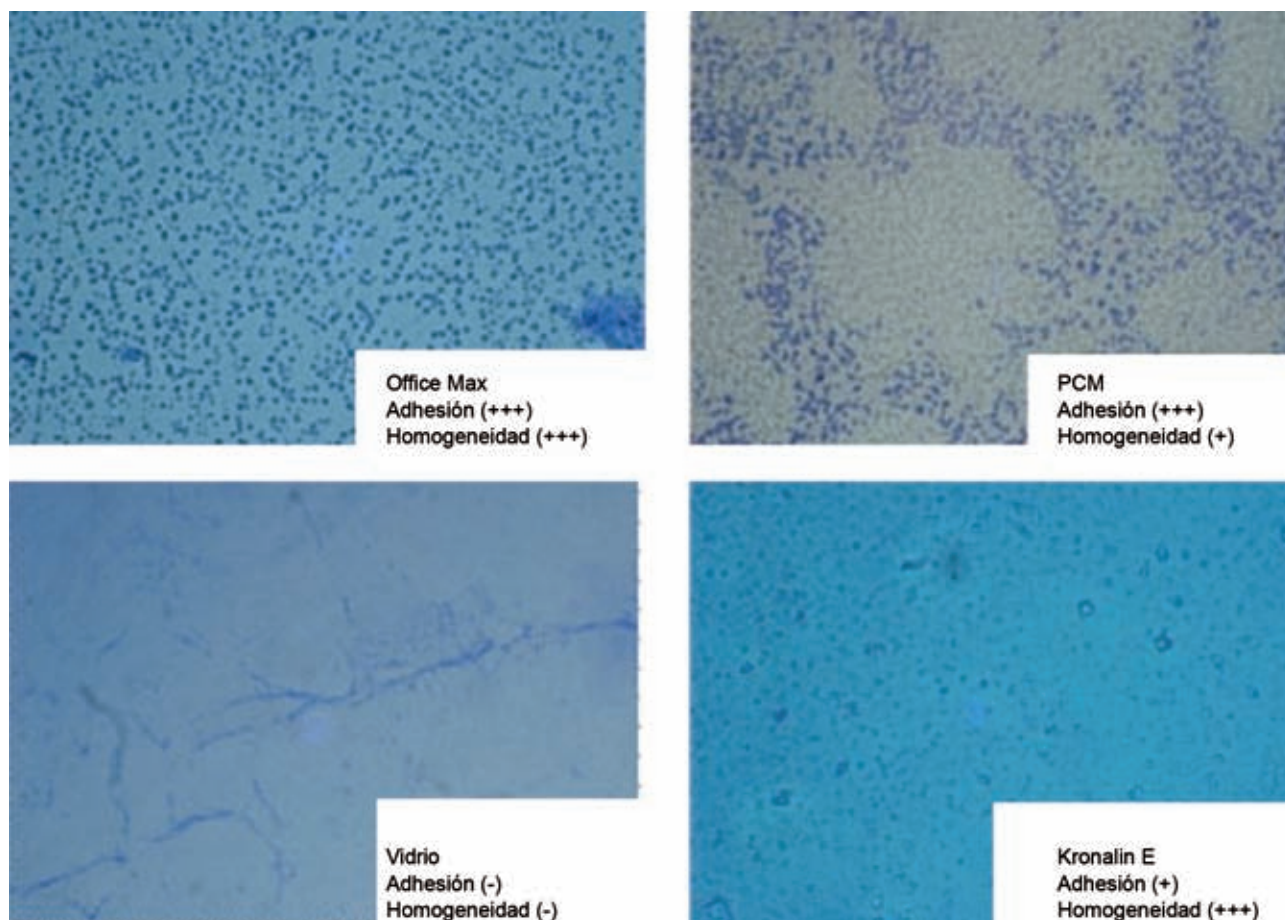
Para observar a los microorganismos se eliminó el medio de cultivo de las cajas, las cuales se lavaron con un poco de solución salina para poder teñir las bacterias que se quedaron adheridas; posteriormente, se les agregó azul de metileno diluido con solución salina (1:1), y se observaron al microscopio. El objetivo de este experimento fue determinar la distribución y evolución de las colonias de bacterias adheridas en las cajas.

El conteo de las microcolonias adheridas se hizo después de que fueron teñidas de la siguiente manera: en una hoja de papel milimétrico se contaron las microcolonias existentes en un cuadro de 1 cm<sup>2</sup> (por medio de microscopio estereoscópico), y el resultado se multiplicó por 21, que es el número de cuadros que comprende el área total de la caja de Petri.

## RESULTADOS

En la Figura 2 y el Cuadro 1 se muestran los resultados del ensayo de adherencia de *Nocardia brasiliensis* en los diferentes materiales, utilizando el medio bifásico (agar/caldo) de dextrosa Sabouraud, incubados a 37°C, con agitación continua y lenta durante 15 días. En este experimento también se observó la distribución y la formación de agregados.

Como puede apreciarse en la Figura 2, hubo diferentes grados de adhesividad indicados por la población remanente después del lavado para eliminar las bacterias libres; la homogeneidad se consideró distribución uniforme o dispersa, de tal manera que los resultados se presentan en forma semicuantitativa para poder determinar en qué material se encontró mejor adhesividad y homogeneidad con un sistema de cruces. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1.



**Figura 2.** Análisis de la capacidad adherente de *N. brasiliensis* en vidrio y acetatos. Se observan diferencias en la adhesión: máximo (+++), mínimo (+) y nulo (-), así como su distribución en los diferentes materiales.

**Cuadro 1.** Adherencia y homogeneidad en los diferentes materiales por *Nocardia brasiliensis*, en el medio bifásico de dextrosa Sabouraud, incubados a 37°C, con agitación continua (lenta) durante 15 días

Material	Adherencia	Homogeneidad
Acetato Office Max	+++	+++
Acetato PCM	+++	+
Acetato Kronalin-E	+	+++
Cubreobjetos de vidrio	-	-

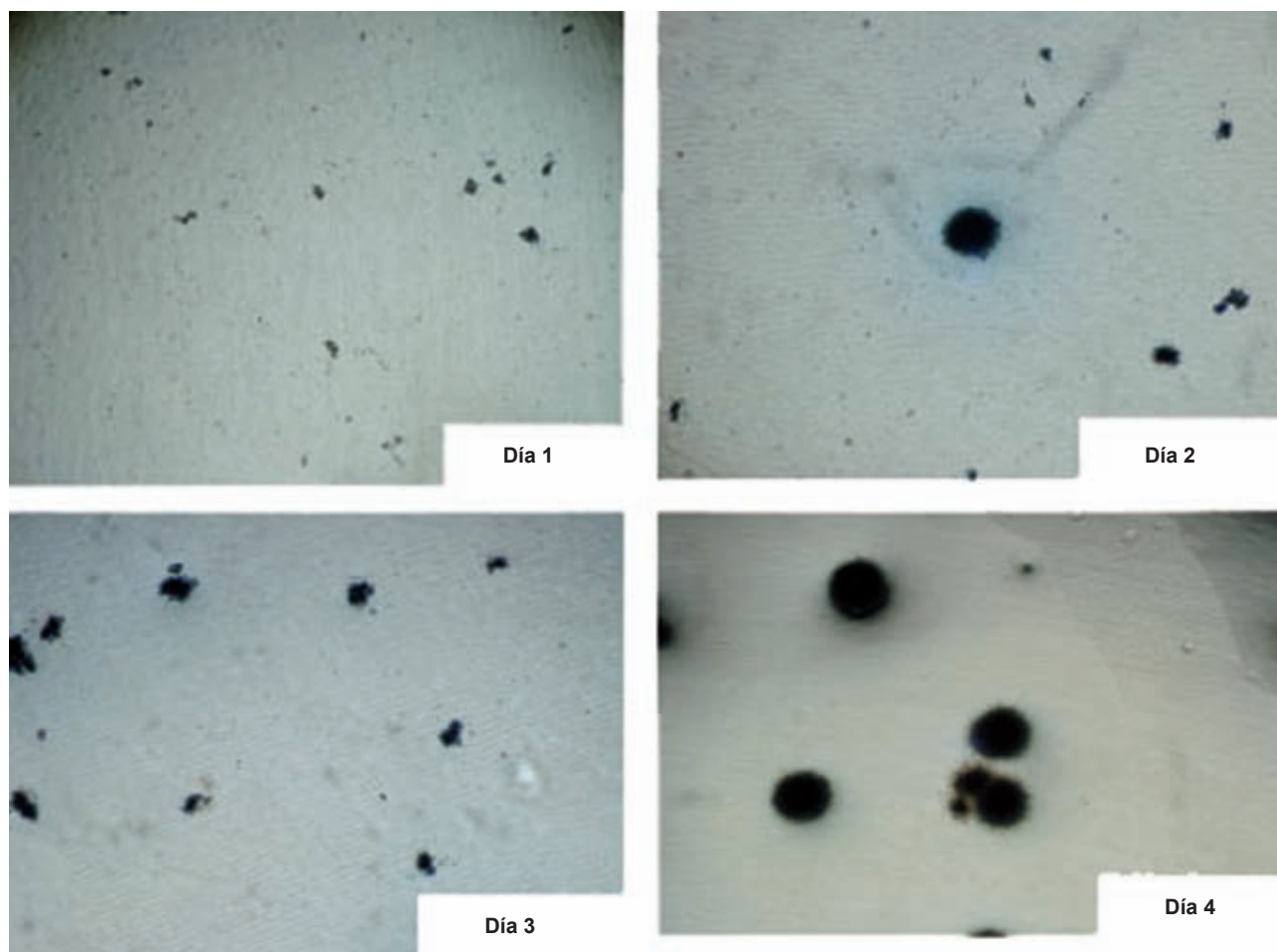
Los símbolos indican lo siguiente: (+++) muy buena adhesión u homogeneidad, (++) buena adhesión u homogeneidad, (+) deficiente o mala adhesión u homogeneidad y (-) nula adhesión u homogeneidad; por tanto, el mejor material para la adhesión y homogeneidad del microorga-

nismo (*Nocardia brasiliensis*) es el acetato (plásticos), en comparación con el vidrio. De los tres tipos de acetatos, el mejor fue el Office Max, ya que induce muy buena adhesión y homogeneidad, el PCM produce muy buena adhesión aunque no buena homogeneidad, y el acetato Kronalin-E genera adhesión leve y buena homogeneidad.

### Cinética de adherencia

Se muestra la adhesión de *Nocardia brasiliensis* en cajas de Petri (6 x 1.5 cm) de plástico, en relación con el tiempo (17 días), contando las unidades formadoras de colonias (UFC)/caja, también se observa la evolución del crecimiento y la generación de filamento de las microcolonias durante este periodo. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.





**Figura 3.** Distribución y crecimiento de *N. brasiliensis* con la formación de colonias en cajas de plástico de 6 x 1.5 cm, observadas con microscopio objetivo 40X. Se aprecia la formación de filamentos de la colonia a partir del día 4 de cultivo.

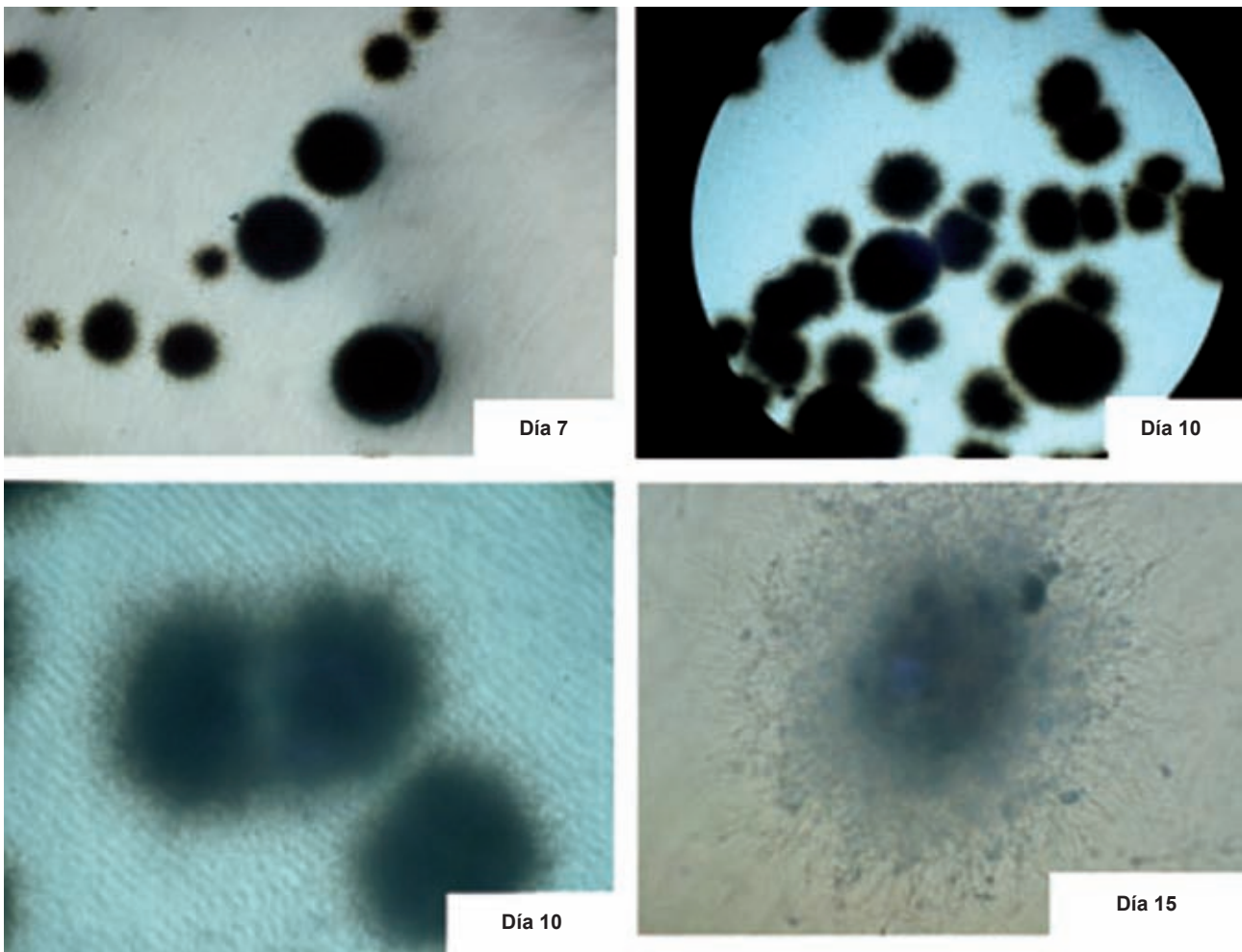
En las Figuras 5 y 6 se presentan los resultados de la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/caja) que se adhirieron a las cajas de plástico de 6 x 1.5 cm, las cuales se tomaron en un lapso de 1 a 17 días (muestra/día), y se tiñeron con azul de metileno. A partir del día 4 se aprecian colonias adheridas a la placa, las cuales alcanzan el mayor número de UFC entre los días 14 al 17.

## DISCUSIÓN

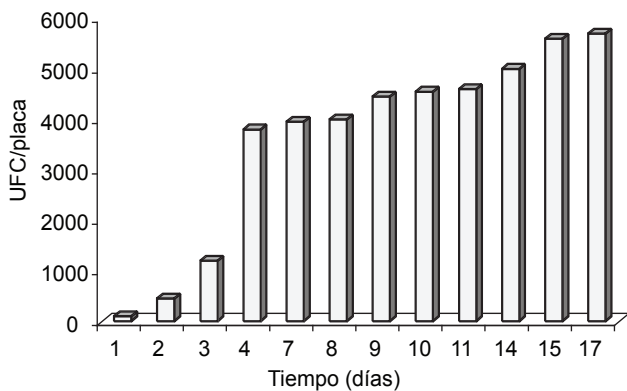
De acuerdo con la bibliografía, las propiedades fisico-químicas de las superficies ejercen gran influencia en la adhesión de los microorganismos.<sup>18</sup> En este caso, *Nocardia brasiliensis* tiene mayor afinidad hacia las superficies hidrófobas no polarizadas como los plásticos, puesto que

la adhesión a los acetatos fue uniforme y abundante en comparación con materiales hidrofílicos como el vidrio, al que se adhirieron escasamente. Por tanto, para poder crear biopelículas *in vitro* de *Nocardia brasiliensis* deben utilizarse materiales de plástico, puesto que uno de los pasos críticos para la formación de biopelículas es la adhesión del microorganismo a una superficie.

La formación de la biopelícula es un proceso continuo que sigue varias fases: 1) acondicionamiento, 2) adhesión, 3) síntesis del exopolisacárido, 4) maduración y 5) dispersión mediante las cuales se estructuran acumulaciones celulares rodeadas de una matriz de polímeros. En este experimento se observó que en los primeros tres días se logra la fase de acondicionamiento y adhesión del microorganismo (gracias al análisis con el microscopio de las microcolonias adhiri-

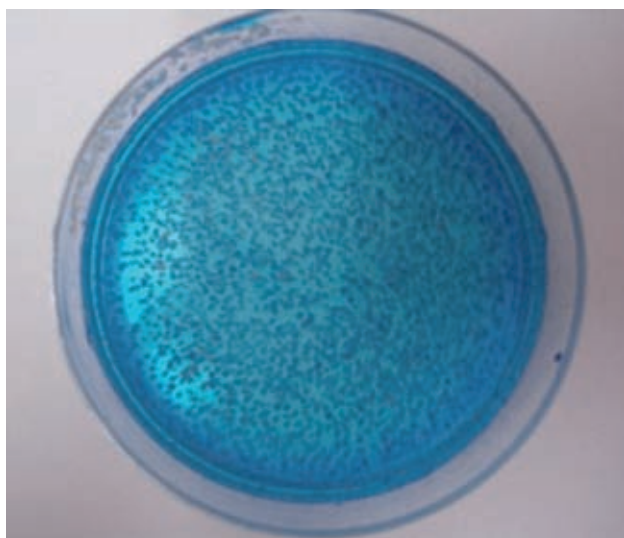


**Figura 4.** Crecimiento en placa de Petri desechable de 6 x 1.5 cm de *N. brasiliensis*. Se observa aumento en la formación de filamentos de las colonias, sobre todo a partir del día 15 de crecimiento.



**Figura 5.** Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Nocardia brasiliensis* por caja de plástico (6 x 1.5 cm) durante 17 días de cultivo en caldo dextrosa Sabouraud.

das), lo que demuestra que *Nocardia brasiliensis* es capaz de vencer las fuerzas electrostáticas de la superficie y queda adherida a la base de la caja. Con el paso de los días más células logran vencer estas interacciones; por ello, se apreció un aumento de unidades formadoras de colonias al terminar el estudio de 17 días. En el experimento se muestra que la mayor adherencia del microorganismo ocurre del decimocuarto al decimoséptimo día; también pudo observarse que las colonias se fueron haciendo cada vez más voluminosas (incremento en la concentración bacteriana), puesto que una vez que la bacteria queda adherida a la superficie comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando la microcolonia.



**Figura 6.** Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en placas de Petri desechables (6 x 1.5 cm) teñidas con azul de metileno para su cuantificación.

Estos hallazgos son importantes, ya que la descripción del crecimiento de *Nocardia brasiliensis* como biopelícula puede modificar sustancialmente el conocimiento de la posibilidad de interferencia en las respuestas inmunológicas para eliminar a este patógeno; incluso se puede considerar un factor de virulencia que facilite la persistencia de esta bacteria en el huésped y la posibilidad de que el exopolisacárido que ésta secreta interfiera en la resistencia a los antibióticos en el tratamiento del actinomicetoma. Para determinar la continuidad del desarrollo de estas organizaciones bacterianas como biopelículas es necesario establecer la metodología que ayude a analizar la síntesis del exopolisacárido<sup>19,20</sup> en estas comunidades bacterianas, lo que representa la siguiente fase de este estudio.

## CONCLUSIÓN

Se logró la adherencia de *Nocardia brasiliensis* a materiales inertes como los acetatos y plásticos (en cajas de Petri desechables); éste es el primer paso hacia el modelo experimental para el desarrollo de biopelículas por este microorganismo.

## REFERENCIAS

- Bethencourt M, García de Lomas J, Corzo A, Villahermosa D, Matres V. Efecto de la biopelícula de aceros inoxidables austeníticos en estaciones depuradoras de aguas residuales. *Rev Metalurgia* 2010;46(1):37-51.
- Block JC, Dutang M, Maillard J, Reasoner D. Growth of attached bacteria in water distribution systems. *Wat Supply* 1994;12(1-2):SS1-8-SS1-12.
- Beech IW, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding the interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:181-186.
- Hall-Stoodley L, Costerton WJ, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
- Donlan RM, Costerton WJ. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167-193.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
- Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatol Rev Mex* 2010;54(1):14-24.
- Sutherland WI. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001;147:3-9.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20-26.
- Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Rosas HLI, Márquez C. Purificación y determinación de la estructura de los polisacáridos que forman el cemento de unión en granos de actinomicetoma causados por *Actinomadura maduræ* y *Nocardia brasiliensis*. *Dermatol Rev Mex* 2006;50(3):165-173.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
- Stewart SP, Franklin JM. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:199-210.
- Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 2001;84:235-254.
- Gristina AG. Biofilms and chronic bacterial infections. *Clin Microbiol Newsletter* 1994;16:171-178.
- Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC. Avances en el estudio de la relación huésped-parásito en infecciones por *Actinomadura*. *Monogr Dermatol* 2006;19(1):5-42.
- Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Sanpedro-Pérez JG. Actinomicetoma. *Bioquímica* 1998;23(1):1-7.
- Bos R, van der Mei CH, Busscher JH. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions. Its mechanisms and methods of study. *FEMS Microbiol Rev* 1999;23:179-230.
- Djordjevic D, Wiedmann M, LcLansborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2950-2958.
- Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyashta MS. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:1-4.