

# Composición lipídica de la pared celular de tres especies de micobacterias ambientales y su posible correlación con la formación de biofilms y movilidad por sliding

Oriani, A.S.<sup>1\*</sup>; Gentili, A.R.<sup>1</sup>; Zúñiga, A.E.<sup>2</sup>; Oriani, D.S.<sup>3</sup> Baldini, M.D<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, Bahía Blanca, Argentina. <sup>2</sup>Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur. Avda. Alem 1253, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa Gral. Pico, La Pampa, Argentina.  
soledad.oriani@uns.edu.ar

## Resumen

La estructura de la pared de las micobacterias se asocia generalmente a la capacidad para formar biofilms y la movilidad por *sliding* o deslizamiento. Este estudio fue realizado con tres especies de micobacterias ambientales (MA): *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium porcinum*. Los objetivos fueron: a) establecer por espectrometría de masa (EM) MALDI-TOF si existían diferencias en la composición de las cadenas carbonadas lipídicas de la pared celular cuando las bacterias estaban en crecimiento planctónico o formando biofilms; b) evaluar la relación entre la composición de las cadenas lipídicas y la capacidad para deslizarse y de formar biofilms. *M. porcinum* y *M. smegmatis* formaron biofilms de diferentes magnitudes y presentaron movilidad. *M. gordonae* desarrolló pobre biofilm y no mostró movilidad. Los espectros MALDI-TOF mostraron diferente composición de las cadenas lipídicas entre las MA en

estado planctónico y formando biofilms. Los espectros de MA formando biofilms mostraron mayor diversidad presentando ácidos micólicos de cadena corta. Estos resultados sugieren la importancia de estos ácidos micólicos en la formación de biofilms, especialmente en su maduración. *M. gordonae* presentó una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga, en comparación con *M. smegmatis* y *M. porcinum*. La presencia de cadenas largas hidrofóbicas podría generar mayor fricción, reduciendo su movilidad.

**Palabras clave:** Micobacterias ambientales, EMMALDI-TOF, ácidos micólicos, biofilms, movilidad por *sliding*

*Lipid composition of cell wall of three species of environmental mycobacteria and its possible role in the biofilm formations and motility by sliding*

## Abstract

The wall structures of Mycobacteria are usually associated with the ability to form biofilm and motility by sliding. This study was performed

with three strain of Environmental Mycobacteria (MA): *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium porcinum*. The goals of this paper were: a) to establish by MALDI-TOF mass spectrometry (MS) whether there are differences in the lipid carbon chain composition in the cell wall when they are in planktonic growth or forming biofilm; b) to evaluate the relation between lipid carbon chain composition and their sliding and biofilm formation ability. *M. porcinum* and *M. smegmatis* formed biofilms of different sizes and presented motility. *M. gordonae* developed poor biofilm and did not move. MALDI-TOF spectra obtained from EM in a planktonic state differ from EM

biofilm-grown ones in their cell-wall lipidic carbon chain composition. EM biofilm-grown spectra show a greater diversity. All biofilm-grown EM spectra present short chain mycolic acids. These results suggest the importance of these mycolic acids in the formation of biofilm, especially in its maturation. *M. gordonae* presented also a higher proportion of long-chain fatty acid, compared to *M. smegmatis* and *M. porcinum*. The presence of long hydrophobic chains could possibly generate a greater friction, thus reducing its motility.

**Keywords:** Environmental mycobacteria, MALDI-TOF-MS, mycolic acids, biofilm, sliding motility

---

## Introducción

---

Las micobacterias continúan siendo una causa muy importante de morbi-mortalidad, especialmente en países con recursos sanitarios limitados. Como resultado del aumento mundial del uso de técnicas como la secuenciación de RNA ribosomal 16S, más de 50 nuevas especies fueron descritas a partir de 1990 (Schinsky *et al.*, 2004).

En la actualidad se han identificado más de 150 especies y subespecies, muchas de las cuales se relacionan con enfermedades en humanos (MuraroWildner *et al.*, 2014). El espectro de patogenicidad varía ampliamente entre las especies, siendo algunas patógenas estrictas (*M. tuberculosis*, *M. leprae*) y otras saprófitas, así como también su reservorio, que pueden ser el hombre, los animales o el ambiente (Han *et al.*, 2007). Aquellas especies cuyo nicho ecológico es el ambiente, no presentan hospedador animal primario y no se ha comprobado la transmisión entre individuos infectados se consideran Micobacterias Ambientales (MA) (Vaerewijcket *et al.*, 2005).

Una de las principales características de las micobacterias es la complejidad de sus estructuras de cubierta. Rigurosos

análisis químicos han demostrado que las células están rodeadas por una membrana externa que contiene ácidos micólicos covalentemente unidos a un complejo arabinogalactano-peptidoglicano (Murray *et al.*, 2007).

Esta compleja pared celular está rodeada por polisacáridos, proteínas y pequeñas cantidades de lípidos y glicolípidos (Martinez *et al.*, 1999). La inusual arquitectura de la pared celular micobacteriana imprime a muchos miembros del género altos niveles de resistencia intrínseca (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014) a una amplia variedad de antibióticos hidrofílicos y desinfectantes (Falkinham III, 2009). Asimismo, numerosos estudios sugieren que jugaría un rol importante en procesos como la movilidad por *sliding* y la formación de biofilms (Sonden *et al.*, 2005; Schorey and Sweet, 2008).

Si bien durante mucho tiempo se consideró que las micobacterias eran inmóviles, hoy se sabe que ciertas especies exhiben la capacidad de moverse por *sliding*, la cual se observa como halos monocapa sobre la superficie de un agar blando (Martinez *et al.*, 1999; Recht and Kolter, 2001; Oriani *et al.*, 2016). Esta se produce por las fuerzas expansivas de la población bacteriana en crecimiento, en combinación con propiedades de la superficie celular que favorecen la reducción de la fricción entre las células y el sustrato, y resulta en el movimiento lento de una monocapa de células uniforme, como una unidad. Estudios realizados por Carter *et al.* (2003), asociaron esta movilidad con la capacidad de producir biofilms sobre superficies de policloruro de vinilo (PVC), tanto en suministros de agua potable como *in vitro*. Ambas propiedades serían de crucial importancia en la virulencia de las MA. La movilidad podría contribuir a la invasión de células epiteliales luego de la ingestión o inhalación (Yamazaki *et al.*, 2006) aunque aún es un tema controvertido (Howard *et al.*, 2006). La habilidad de colonizar sistemas de distribución de agua les permitiría persistir en ellos, transformando al agua de red en una de las más importantes fuentes de infección en humanos (Hilborn *et al.*, 2006).

El tipo de interacción entre una bacteria y una superficie, ya sea que se una o se deslice sobre ella, depende ampliamente de la superficie celular. Recht *et al.* (2000) proponen un modelo para explicar la movilidad por *sliding*, en el cual los glicopeptidolípidos (GPLs) localizados sobre la superficie celular, con sus porciones hidrofóbicas de ácidos grasos expuestas, crean un

ambiente hidrofóbico que disminuye la fricción entre la bacteria y la superficie hidrofílica. Los autores también proponen que las mutantes defectivas en la producción de GPLs exponen productos más hidrofílicos, tales como polisacáridos, resultando en un incremento de la fricción con la superficie y disminución de la movilidad.

Es clara la ventaja que significa para las micobacterias, patógenas o ambientales, la habilidad de colonizar superficies (animadas o inanimadas) mediante la formación de biofilms, ya que les brinda mayor disponibilidad de nutrientes y protección contra factores ambientales (Ojha *et al.*, 2010).

La espectrometría de masas en sus distintas modalidades, ha sido una técnica muy utilizada para la identificación de moléculas en diferentes ramas de la ciencia durante buena parte del siglo XX. En sus inicios el rango de masas estaba limitado a pequeñas moléculas, lo que restringía las aplicaciones a lípidos bacterianos. EM MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry*, en español: desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos, sobre todo mediante el análisis de espectros de proteínas (Zárate *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio, se la utilizó, para conocer las características de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la pared celular micobacteriana.

EM MALDI-TOF es un método que, mediante la aplicación de energía láser a una muestra embebida en una matriz, consigue vaporizar e ionizar esa matriz, arrastrando una porción representativa de las biomoléculas contenidas en la muestra. Esas moléculas tienden a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos convencionales, en el caso de la EM MALDI-TOF se utiliza una matriz para protegerlas. Estos compuestos una vez ionizados son sometidos a aceleración en un campo eléctrico y a una migración a través de un tubo de vacío hasta un detector. El tiempo que transcurre desde su vaporización/ionización hasta su detección depende del cociente masa/carga ( $m/z$ ) de esa biomolécula y éste permite determinar su masa exacta de manera extremadamente fiable (Muñoz Bellido *et al.*, 2012).

Los objetivos de este trabajo fueron: a) conocer, aplicando la técnica de EM MALDI-TOF, la composición de las cadenas carbonadas lipídicas de la pared de tres MA y establecer si presentan

diferencias cuando las bacterias se hallan en crecimiento planctónico o formando biofilm; b) evaluar la posible relación de esta composición con la capacidad de las MA estudiadas de deslizarse (*sliding*) y de formar biofilm.

## ***Materiales y Métodos***

Los estudios se realizaron sobre tres cepas de MA de diferentes orígenes y velocidades de crecimiento: *Mycobacterium smegmatis*, bacteria no cromógena y de rápido crecimiento, provista por el Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, utilizada como especie de referencia, por ser ampliamente estudiada, *Mycobacterium gordonae*, bacteria escotocromógena y de lento crecimiento, y *Mycobacterium porcinum*, bacteria no cromógena y de crecimiento rápido. Estas dos últimas fueron aisladas de muestras de agua de red e identificadas por pruebas bioquímicas (Jorge *et al.*, 2005) y por secuenciación de un fragmento del genARNr16S y secuenciación hsp65 (Ringuet *et al.*, 1999).

### ***Análisis de las cepas por EM MALDI-TOF***

Preparación del inóculo: las cepas seleccionadas se sembraron en Middlebrook 7H9 Difco (MB) con glicerol y se incubaron a 30 °C durante 7 o 14 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento. Se centrifugaron, el sedimento se lavó con buffer salino y se resuspendió en el mismo buffer, hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de la escala de Mc Farland.

*En células en crecimiento planctónico (de vida libre):* Se realizó la extracción de lípidos según la técnica de Ojha *et al.* (2005) a partir de un inóculo preparado como se explicó anteriormente. Diez mililitros de suspensión se trataron con 2 ml de hidróxido de tetrabutilamonio (40%, Merck) a 100 °C durante una noche, se agregaron 2 ml de diclorometano (Merck) y 200 µl de yoduro de metilo (Merck). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por el lapso de una hora y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. La fase orgánica fue lavada con HCl (0,25 N; Merck) y con agua destilada antes de secarla bajo vacío. Los micolatos totales de cada cepa fueron analizados utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF modelo Ultraflex II (Empresa Bruker Daltonics). La matriz utilizada fue ácido dihidroxibenzoico.

*En células formando biofilm:* las cepas seleccionadas se sembraron en un tubo de PVC estéril conteniendo MB adicionado con glicerol. Se incubó durante 21 días a 30 °C. Con el fin de recuperar el biofilm formado en las paredes del tubo, se descartó el medio líquido, se lavó con agua estéril para eliminar las células no adheridas, se resuspendió con solución de NaCl (0,85%) estéril y se sonicó tres veces (1 min cada vez). Se agitó en vórtex durante 30 segundos y se llevó a volumen hasta alcanzar una turbidez de 0,4 de D.O. (595 nm). A partir de aquí se procedió de la misma manera que en el inciso a).

### ***Prueba de movilidad por sliding***

Para el ensayo se utilizaron cajas de Petri conteniendo MB suplementado con glicerol y solidificado con 0,3% de agar agar. Una colonia de cada cepa se sembró con aguja en el centro de dichas cajas, se sellaron con parafina y se incubaron a 30 °C por 14 días (Martinez *et al.*, 1999).

### ***Evaluación de la capacidad de formar biofilm***

Se realizó *in vitro* mediante la técnica en microplacas de PVC. Se sembraron 50 µl de inóculo preparado como se describió anteriormente, en policubetas con tapa de 96 pocillos, se adicionaron 150 µl de los distintos medios de cultivo (agua estéril de grifo, MB y MB con glicerol). Se incubaron 21 días a 30 °C.

Para cuantificar la formación del biofilm se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se agregó una solución acuosa al 1 % de cristal violeta. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron vigorosamente cuatro veces con agua y se secaron sobre papel secante (Carter *et al.*, 2003). El colorante incorporado en el biofilm se disolvió con mezcla de etanol y acetona 70:30 (Johansen *et al.*, 2009). La lectura se realizó a 595 nm en un lector de microplacas SINERGY HT.

Todas las experiencias se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

## ***Resultados y Discusión***

El uso de espectrometría de masa MALDI-TOF en extractos lipídicos de microorganismos en crecimiento planctónico y formando biofilm permitió determinar micolatos con diferentes longitudes de ácidos grasos. Los espectros de MALDI-TOF de las

cepas *M. smegmatis* y *M. porcinum* en crecimiento planctónico mostraron un pico correspondiente a m/z 868 compatible con ésteres metílicos de ácidos micólicos (MAMES) de cadena corta de hasta C<sub>58</sub> (Fig. 1A y 1C). Como se observa en la figura 1B, *M. gordonae* presenta picos compatibles con cadenas de hasta C<sub>54</sub> y señales entre el 1046 y 1515 de m/z correspondientes a MAMES de cadena larga (C<sub>72</sub>-C<sub>105</sub>). En las muestras analizadas de MA formando biofilm, *M. smegmatis* mostró picos atribuibles a MAMES de longitudes entre C<sub>39</sub> - C<sub>51</sub> (Fig. 1D). Además, *M. gordonae* presentó una secuencia de picos regulares de m/z 617 a 1175, asimilables a cadenas alquílicas de C<sub>39</sub> a C<sub>79</sub> (Fig. 1E). *M. porcinum* mostró picos regulares correspondientes a cadenas entre C<sub>39</sub> y C<sub>75</sub> (Fig. 1F). La comparación de los espectros obtenidos de MA creciendo en estado planctónico y formando biofilm, mostró diferencias en la composición de las cadenas carbonadas lípidicas de sus paredes celulares. Siendo éstos últimos los que mostraron un aumento en el número de picos que sugieren la presencia de una mayor diversidad de cadenas alquílicas. Los tres espectros de las MA creciendo en biofilm presentaron una composición común de MAMES de C<sub>39</sub>-C<sub>45</sub> correspondientes a masas de hasta 701, observadas en la primera fracción del espectro. Estos resultados coinciden con Ojha *et al.* (2005) sobre el papel fundamental de la síntesis de micolatos de cadena corta en la formación de biofilms. De hecho, aquellas cepas que no los sintetizan, son incapaces de formar biofilm maduro. Como se indicó anteriormente, *M. gordonae* no fue capaz de translocar sobre superficies. Además, presentó MAMES de cadenas más largas que *M. smegmatis* y *M. porcinum*, ambos móviles. Probablemente, la presencia de cadenas hidrofóbicas largas podría generar mayor fricción disminuyendo su movilidad.

*M. porcinum* y *M. smegmatis*, formaron biofilm de diferentes magnitudes en todos los medios probados (Fig. 2) y presentaron movilidad por *sliding* en MB con glicerol (Fig. 3A y B). *M. porcinum*, mostró la más consistente producción de biofilm (Fig. 2). *M. gordonae* formó débil biofilm en MB sin y con glicerol (DO 0,08 y DO 0,37 respectivamente) y no se desplazó por *sliding* (Figs. 2 y 3C). Esta correlación entre la capacidad de deslizarse y de formar biofilm es coincidente con otros hallazgos bibliográficos sobre *M. avium* (Carter *et al.*, 2003), sin embargo, no se halló bibliografía sobre estudios en cepas de *M. gordonae*. aisladas del ambiente.

Si bien algunos autores (Carter *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2009) describen al agua como el mejor medio para la formación de biofilm, nuestras experiencias muestran que su producción se correlaciona positivamente con el aumento en la disponibilidad de nutrientes en los medios, coincidentemente con los resultados obtenidos por Johansen *et al.* (2009), quienes estudiaron distintas subespecies de *Mycobacterium avium*. La discrepancia puede deberse a que se trabajó con otras especies de MA y a las condiciones experimentales impuestas. Por otro lado, el agua de red no es un medio estandarizado y el contenido de materia orgánica, iones y pH, depende de factores locales.

## Conclusiones

Se puso en evidencia la utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el estudio de las cadenas carbonadas lipídicas de las MA. La técnica permitió visualizar la variación en la composición lipídica de la pared de las micobacterias estudiadas de acuerdo a que estuvieran en crecimiento planctónico o formando biofilm, evidenciando la ausencia de MAMES de cadena corta en la especie no móvil, que también presentó débil biofilm.

Asimismo, se aporta información que permite un mejor conocimiento de las estructuras de cubierta de algunas MA comunes en agua de red, de modo de poder inferir su comportamiento ambiental y potencial implicancia en la salud de la población.

Sería de interés un estudio más amplio que incorporara otras cepas de MA a fin de evaluar si es posible generalizar estos hallazgos.

## Bibliografía

- Bansal-Mutalik, R.; Nikaido, H. 2014.** Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidyl inositol dimannosides. *Proc Natl Acad. Sci U S A.*, 111: 4958–4963.
- Carter, G.; Wu, M.; Drummond, D.C.; Bermudez, L.E. 2003.** Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.*, 52: 747-752.
- Falkinham III, J.O. 2009.** Physiological ecology of environmental saprophytic and potentially pathogenic mycobacteria. En: *The Ecology of Mycobacteria: impact on animal's and human's*

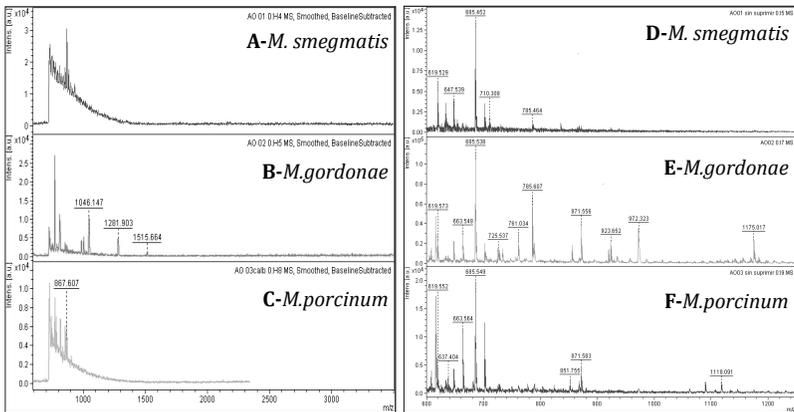
- health. Kazda J, Pavlik I, Falkinham III J.O, Hruska, K, editors. Springer Business+Science Media B V, XVIII, p81-87.
- Han, X.Y.; Dé, I.; Jacobson, K.L. 2007.** Rapidly growing mycobacteria clinical and microbiologic studies of 115 cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 128: 612-621.
- Hilborn, E.D.; Covert, T.C.; Yakrus, M.A.; Harris, S.I.; Donnelly, S.F.; Rice, E.W.; Toney, S.; Bailey, S.A.; Stelma, G.N. 2006.** Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5864-5869.
- Howard, S.T.; Rhoades, E.; Recht, J.; Pang, X.; Alsup, A.; Kolter, R.; Lyons, C.R.; Byrd, T.F. 2006.** Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology*, 152:1581-1590.
- Johansen, T.B.; Agdestein, A.; Olsen, I.; Nilsen, S.F.; Holstad, G.; Dønne, B. 2009.** Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC Microbiol.*, 9: 159-169.
- Jorge, M.C. Alito, A. Bernardelli, A.; Canal, A.M.; Cataldi, A.; Cicuta, M.E.; Gentile, F.; Kistermann, J.C.; Magnano, G.; Martínez Vivot, M.E.; Oriani, D.S.; Paolicchi, F.A.; Pérez, A.M.; Romano, M.I.; Schneider, M.; Torres, P.; Zumárraga, M.J. 2005.** Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Santa Fe, Argentina, 1-132.
- Martínez, A.; Torello, S.; Kolter, R. 1999.** Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 181: 7331-7338.
- Muñoz Bellido, J.L.; Vega Castaño, S.; Ferreira, L.; Sánchez Juanes, F.; González Buitrago, J.M. 2012.** Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 30: 383-393.
- Muraro Wildner, L.; Bazzo, M.L.; Coutinho Liedkes, S.; Lourenço Nogueira, C.; Segat, G.; Gonçalves Senna, S.; Schlindwein, A.D.; de Oliveira, J.G.; Rovaris, D.B.; Bonjardim, C.A.; Kroon, E.G.; Ferreira, C.P. 2014.** Mycobacteria mobility shift assay: a method for the rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. p.1-6.
- Murray, P.R.; Rosenthal, K.; Pfaller, M.A. 2007.** Mycobacterium. En: Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA, editors. *Medical Microbiology*, 7<sup>th</sup> edition. Washington DC, ASM Press, p. 297-310.
- Ojha, A.; Anand, M.; Bhatt, A.; Kremer, L.; Jacobs, W.R. Jr.; Hatfull GF. 2005.** GroEL1: A dedicated chaperone involved

- in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, 123: 861-873.
- Ojha, A.; Trivelli, X.; Guerardel, Y.; Kremer, L.; Hatfull, G.F. 2010.** Enzymatic hydrolysis of trehalose dimethyl acetal releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J. Biol. Chem.*, 285: 17380-17389.
- Oriani, A.; Gentili, A. y Baldini, M. 2016.** Movilidad por sliding de *Mycobacterium chubuense*. *Rev. Argent. Microbiol.*, 48: 1, en prensa.
- Recht, J.; Martinez, A.; Torello, S.; Kolter, R. 2000.** Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 182: 4348-4351.
- Recht, J.; Kolter, R. 2001.** Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 183: 5718-5724.
- Ringuet, H.; Akoua-Koffi, C.; Honore, S.; Varnerot, A.; Vincent, V.; Berche, P.; Gaillard, J.L.; Pierre-Audigier, C. 1999.** hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 852-857.
- Schinsky, M.F.; Morey, R.E.; Steigerwalt, A.G.; Douglas, M.P.; Wilson, R.W.; Floyd, M.M.; Butler, W.R.; Daneshvar, M.I.; Brown-Elliott, B.A.; Wallace, R.J. Jr.; McNeil, M.M.; Brenner, D.J.; Brown, J.M. 2004.** Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp nov, *Mycobacterium houstonense* sp nov, *Mycobacterium neworleansense* sp nov and *Mycobacterium brisbanense* sp nov and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1653-1667.
- Schorey, J.S.; Sweet, L. 2008.** The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*, 18: 832-841.
- Sonden, B.; Kocincova, D.; Deshayes, C.; Euphrasie, D.; Rhyat, L.; Laval, F.; Frehel, C.; Daffe, M.; Etienne, G.; Reytrat, J.M. 2005.** Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol. Microbiol.*, 58: 426-440.
- Vaerewijck, M.; Huys, G.; Palomino, J.; Swings, J.; Portaels, F. 2005.** Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 911-934.
- Williams, M.M.; Yakrus, M.A.; Arduino, M.J.; Cooksey, R.C.; Crane, C.B.; Banerjee, S.N.; Hilborn, E.D.; Donlan, R.M. 2009.** Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 2091-2098.
- Yamazaki, Y.; Danelishvili, L.; Wu, M.; Hidaka, E.; Katsuyama, T.; Stang, B.; Petrofsky, M.;**

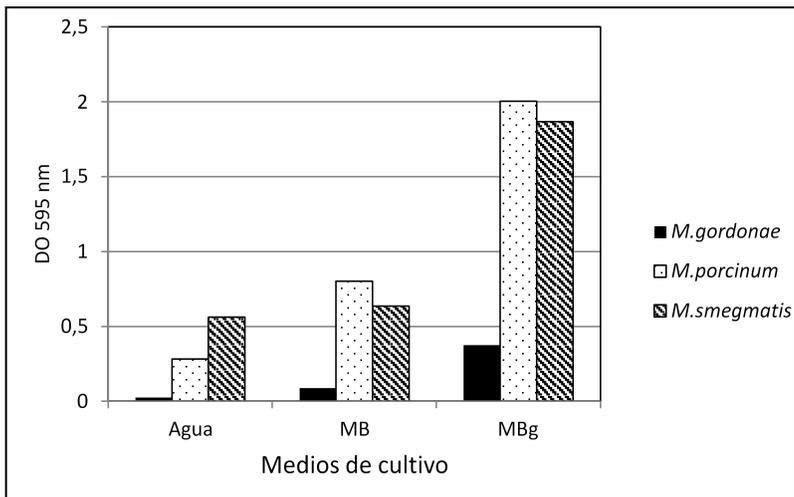
**Bildfell, R.; Bermudez, L.E. 2006.** The ability to form bio-film influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. Cell Microbiol., 8: 806-814.

**Zárate, M.S.; Romano, V.; Nievas, J.; Smayevsky, J. 2014.** Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. Rev. Argent. Microbiol., 46: 98-102.

**Figura 1.** Espectros obtenidos por EM MALDI-TOF de las cepas estudiadas en estado planctónico (A, B y C) y formando biofilm (D, E y F).



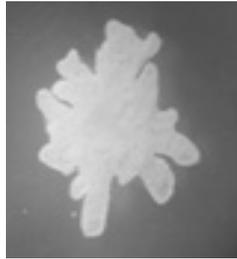
**Figura 2.** Cuantificación del biofilm formado por las MA estudiadas en diferentes medios de cultivo (Valores medios  $\pm$  DE. 3 series de 8 pocillos).



**Figura 3.** Movilidad por *sliding*. Morfología macroscópica de las colonias deslizando sobre la superficie de medio MB con 0,3% de agar, durante 14 días a 30 °C. A) *M. porcinum*, B) *M. smegmatis* C) *M. goodnae*. Magnificación 6,7 X. Estas imágenes son representativas de estudios realizados con 5 colonias de cada especie.



A



B



C