

UCH-FC
Biotecnología
M 475
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Efecto del frío en la movilidad y producción de biopelícula de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Felipe José Maza Fajardo

Director del Seminario de Título: Dra. Angélica Reyes

Patrocinante del Seminario de Título: Dr. Francisco Chávez

Marzo 2017
Santiago – Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

FELIPE JOSÉ MAZA FAJARDO

“Efecto del frío en la movilidad y producción de biopelícula de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Angélica Reyes Jara
Director Seminario de Título:

Firma manuscrita en azul de Dra. Angélica Reyes Jara sobre una línea horizontal.

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Prof. Patrocinante del Seminario

Firma manuscrita en azul de Dr. Francisco Chávez Espinosa sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Nicolás Guiliani Guerin
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Dr. Nicolás Guiliani Guerin sobre una línea horizontal.

Dr. Carlos Jerez Guevara
Evaluador

Firma manuscrita en azul de Dr. Carlos Jerez Guevara sobre una línea horizontal.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que me apoyaron y ayudaron durante este proceso.

En primera instancia, agradezco a mi tutora Dra. Angélica Reyes por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y por su constante empuje para ser un mejor profesional. Le agradezco también a los profesores Guillermo Figueroa y Miriam Troncoso por permitirme usar las dependencias de su laboratorio y sus implementos.

A Fondecyt por financiar mi tesis y toda la investigación mediante el proyecto N°11121449 dirigido por la Dra. Angélica Reyes y llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA de la Universidad de Chile.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Probióticos, en especial a Patata, Rosa, Cote, María Elena, Pati, Isa y Don Crís.

A Ani Q. le agradezco en particular por nuestras innumerables conversaciones, sus múltiples consejos y su apoyo durante este difícil proceso.

A mis compañeros de carrera que estuvieron conmigo durante toda mi estadía en la facultad de Ciencias. En particular a Salo, Arantza, Mística, Nía, Viole, Pito, Luisfe, Camilo y Carlos. Siempre serán mis compañeros y amigos de formación.

A mis amigos Martín y Sayaka les agradezco profundamente por su compañía y apoyo incondicional. Gracias por estar ahí para escucharme y aconsejarme durante todos estos años.

Por último agradezco a mi mamá y mi papá por su constante apoyo. A mi hermana por su compañía, sus consejos y su ayuda cuando la he necesitado. Sin el cariño y dedicación de ustedes no sería la persona que soy.

Muchas gracias a todos.

Índice de contenidos

Agradecimientos	ii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras.....	vi
Resumen	ix
Abstract.....	xi
1 Introducción.....	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria de alimentos.....	1
1.2 Mecanismos moleculares de <i>L. monocytogenes</i> en respuesta a frío.....	3
1.3 <i>L. monocytogenes</i> y su capacidad de formar biopelículas	7
1.4 Propuesta de investigación	12
1.5 Hipótesis	14
1.6 Objetivo General	14
1.6.1 Objetivos Específicos.....	14
2 Materiales y Métodos.....	15
2.1 Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	15
2.2 Cultivo bacteriano en frío.....	15
2.3 PFGE para <i>L. monocytogenes</i>	17
2.4 Movilidad de <i>L. monocytogenes</i>	17
2.5 Ensayo de adherencia de <i>L. monocytogenes</i> a superficies de acero	18
2.6 Biopelícula de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero	18
2.7 Biopelícula de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de vidrio	19
2.8 Extracción de RNA de <i>L. monocytogenes</i>	20
2.9 Ensayos de qPCR.....	20
2.10 Estadística	24
3 Resultados.....	25
3.1 Determinación de clonalidad de aislados de <i>L. monocytogenes</i>	25
3.2 Determinación de la movilidad celular.....	25
3.3 Formación de biopelícula de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	27
3.3.1 Formación de biopelículas en acero.....	27

3.3.2	Producción de biopelícula de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de vidrio.....	30
3.4	Determinación de la respuesta transcripcional.....	35
4	Discusión	40
5	Conclusiones.....	47
6	Bibliografía.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción de los aislados de <i>L. monocytogenes</i> seleccionados	16
Tabla 2. Partidores de <i>L. monocytogenes</i> diseñados para el estudio de expresión génica.....	22
Tabla 3. Condiciones de la reacción de qPCR para ensayos de expresión génica	23
Tabla 4. Operones que conforman el flagelo de <i>L. monocytogenes</i>	36

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de adaptación al estrés por frío	5
Figura 2. Formación de biopelícula en tres etapas.....	8
Figura 3. Dendrograma de 8 aislados de <i>L. monocytogenes</i> pertenecientes al grupo rápido o lento a 8°C.....	26
Figura 4. Movilidad a 8°C de cepas de <i>L. monocytogenes</i> rápidas y lentas.....	28
Figura 5. Comparación de la capacidad de adherencia de cepas rápidas y lentas de <i>L. monocytogenes</i> a superficie de acero a 8°C.....	29
Figura 6. Formación temporal de biopelícula a 8°C de cepas de <i>L. monocytogenes</i> en discos de acero.....	31
Figura 7. Formación de biopelícula a 8°C en superficie de vidrio por cepas del grupo rápido.....	33
Figura 8. Formación de biopelícula a 8°C en superficie de vidrio por cepas del grupo lento.....	34
Figura 9. Cinética de expresión de genes asociados a biopelículas en <i>L. monocytogenes</i>	37
Figura 10. Cinética de expresión del gen <i>gmaR</i> de <i>L. monocytogenes</i>	39

Lista de abreviaturas

CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades
cDNA	DNA complementario
CIPS	Proteínas inducidas por frío
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Exopolisacáridos
M-MLV RT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murino moloney
mRNA	RNA mensajero
DO	Densidad óptica
PB	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
qPCR	PCR cuantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SOD	Superóxido dismutasa
TE	Buffer Tris EDTA
Tg	Tiempo de generación
TLR	Receptores tipo toll
TM	Temperatura de melting
TSAYE	Agar tripticasa soya con extracto de levadura

TSBYE	Caldo tripticasa soya con extracto de levadura
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

Resumen

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, ubicua, psicrótrófa, causante de listeriosis, que forma biopelículas en diferentes superficies que se encuentran en la industria de alimentos. En el proceso de formación de biopelículas la presencia de flagelo ha sido vinculada con la capacidad de adherencia a superficies y su ausencia se traduce, en algunas cepas, en una reducción de la formación de biopelículas. En un trabajo publicado por nuestro grupo, se analizó el perfil de expresión global de cepas de *L. monocytogenes* con distinta velocidad de proliferación a 8°C, describiendo una represión de genes flagelares en aquellas cepas de rápida proliferación. Dada esta diferencia de expresión de genes flagelares y al vínculo que existe entre la presencia de flagelo y formación de biopelícula, es que se planteó la siguiente hipótesis: "Aislados de *Listeria monocytogenes* con distintas velocidades de proliferación en frío presentan capacidades diferenciales de movilidad y formación de biopelícula que se relacionan con los niveles de expresión de los genes relacionados a estas funciones en respuesta a la baja temperatura".

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron 8 cepas de *L. monocytogenes* (4 de rápida y 4 de lenta proliferación en frío) que fueron tipificadas genéticamente mediante PFGE. Se evaluó la movilidad de estas cepas en frío, utilizando medios semisólidos. Las cepas de proliferación lenta, resultaron ser significativamente más móviles que las cepas rápidas. Posteriormente se evaluó su capacidad de adherencia a superficies de acero a 8°C pasadas 24 horas. Se observó que la capacidad de adherencia es independiente de la velocidad de proliferación en frío. Luego se evaluó la capacidad de formar biopelículas en acero y vidrio durante 24 días. Las cepas rápidas presentaron una mayor producción de

biopelícula al sexto día de incubación en ambas superficies, mientras que las cepas lentas variaron su máxima producción entre el sexto y el decimoctavo día de incubación. Finalmente se realizó un análisis de los niveles de expresión génica de los genes asociados a la formación de biopelículas, incluyendo genes de "quorum sensing" (*agrD* y *agrB*), genes flagelares (*flgD* y *motB*), un gen de quimiotaxis (*cheR*) y genes reguladores (*mogR* y *gmaR*). Estos fueron evaluados durante las primeras 24 horas de exposición a frío y luego a las 96 horas. El conjunto de genes estudiados presentó niveles de expresión que resultó ser equivalente entre las cepas de clasificación rápida y lenta durante las primeras 24 horas, sin embargo, estos niveles de expresión se diferenciaron a las 96 horas de incubación resultando en una represión de los genes nombrados en las cepas rápidas y una ligera sobreexpresión en las cepas lentas. Estos niveles de expresión fueron vinculados a la función del inhibidor GmaR, el cual inhibe la acción del regulador transcripcional MogR, dado que el gen *gmaR* presenta mayores niveles de expresión en las cepas de proliferación lenta, que en las cepas rápidas, lo que se traduce en una mayor inhibición de MogR, resultando en una mayor expresión de genes flagelares.

A modo de conclusión, en este trabajo se observó que en cepas de *L. monocytogenes* existe una relación inversa entre la velocidad de proliferación y movilidad a 8°C; todas las cepas fueron capaces de formar biopelículas en superficies de vidrio y de acero de forma independiente a su velocidad de proliferación en frío; y la represión del gen *gmaR* en cepas de *L. monocytogenes* de proliferación rápida en frío, favorece la represión de genes flagelares a 8°C.

Abstract

Listeria monocytogenes is a Gram positive, ubiquitous, psychrotrophic bacterium, and it is the cause of Listeriosis. This pathogen is able to form biofilm on different surfaces that are commonly used in the food industry. *L. monocytogenes* flagella has been linked to the bacterium ability to adhere to surfaces during biofilm formation, and its absence results in a decrease of the biofilm formation in some strains. Previously, our group analysed the global gene expression profile of *L. monocytogenes* displaying different proliferation rates at 8°C. We concluded that “fast” growing strains repressed flagellar genes at 8°C. Given the difference in the flagellar gene expression pattern and the link between the presence of flagella and biofilm formation, is that we proposed the following hypothesis: “Isolates of *Listeria monocytogenes* that display different proliferation rates at cold temperatures show differential motility and biofilm-forming ability which is related to flagellar gene expression levels at low temperatures”.

We used 8 *L. monocytogenes* strains (4 fast and 4 slow proliferation strains at 8°C) which were genetically typed using PFGE. Strain motility was evaluated using semi-solid agar plates. The slow proliferating strains were significantly more motile than the fast proliferating strains. Then, we evaluated the surface adhesion ability of these bacteria at 8°C after 24 hours of incubation. We observed that the adhesion ability was unrelated to the proliferation rate at low temperatures. After that, we evaluated the bacterial biofilm-forming ability on stainless steel and glass surfaces over 24 days. The fast proliferating strains showed a higher biofilm production on the sixth day of incubation on both surfaces. Conversely, slow proliferating strains showed different

biofilm-forming peak days, which varied between the sixth and the eighteenth day of incubation. Finally, we analyzed the gene expression levels of those genes linked to biofilm production, including quorum sensing genes (*agrD* and *agrB*), flagellar genes (*flgD* and *motB*), one chemotaxis gene (*cheR*) and regulatory genes (*mogR* and *gmaR*). These genes were evaluated during the first 24 and after 96 hours of cold exposure. The studied set of genes showed similar gene expression levels among the fast and the slow proliferating strains during the first 24 hours of cold exposure; however, gene expression levels differed after 96 hours of incubation resulting in a repression of the entire set of genes in the fast proliferating group and a slight overexpression in the slow growth group. The gene expression levels described were related to the function of the protein inhibitor GmaR, which inhibits the transcriptional regulator MogR. Since *gmaR* showed higher expression levels in the slow proliferating strains than in the fast proliferating group, a higher MogR inhibition would result in higher expression levels of flagellar genes.

In conclusion, we observed that *L. monocytogenes* showed an inverse relationship between proliferation rate and motility at 8°C. Also, all the strains were capable of producing biofilm on glass and stainless steel independently of their proliferation rate in cold. Finally, repression of the gene *gmaR* on fast-proliferating strains of *L. monocytogenes* helped to repress flagellar genes at 8°C.

1 Introducción

1.1 *Listeria monocytogenes* en la industria de alimentos

L. monocytogenes es una bacteria en forma de bacillo corto, Gram positiva y que se caracteriza por ser ubicua, es decir que puede estar presente en diversos ambientes, incluyendo suelos, ríos, lagos, vegetales, heces de animales mayores, entre otros. La propiedad de ser ubicua se relaciona con la capacidad de *L. monocytogenes* de contaminar diferentes tipos de alimentos. Entre las especies de *Listeria* sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido descritas como causantes de cuadros clínicos en humanos y en otros mamíferos respectivamente (Gasánov y col., 2005).

L. monocytogenes genera un cuadro clínico conocido como listeriosis producto del consumo de alimentos contaminados. La listeriosis afecta principalmente a embarazadas, niños menores de 2 años, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Cartwright y col., 2013). A pesar de presentar bajos índices de infección (0,29 casos por 100.000 habitantes), esta enfermedad presenta altos índices de hospitalización (entre 89 y 94% de los casos) y de mortalidad (entre 20 y 30% de los afectados; CDC, 2010-2014; Scallan y col., 2011). Debido a ello, es que *L. monocytogenes* aún se encuentra presente en el foco de organizaciones de salud a lo largo del mundo y en el ojo de muchos científicos quienes trabajan en entender las capacidades que esta bacteria es capaz de desarrollar para sobrepasar las barreras fisicoquímicas usadas para su control.

Brotos de listeriosis han ocurrido tanto en Chile como a nivel mundial. El brote más grande descrito en Estados Unidos fue asociado a una variedad de melón. Este brote resultó en la infección de 147 personas, 143 hospitalizaciones y 33 fallecidos (CDC, 2012). Actualmente, brotes de listeriosis siguen siendo reportados cada año por la CDC, siendo el último registrado a la fecha (Noviembre, 2016) un brote asociado a vegetales congelados, causando, a la fecha, 9 casos de los cuales 9 han resultado en hospitalización y 3 en muerte (CDC, 2016).

La situación nacional es similar a lo visto en el extranjero. En el año 2008 ocurrió el brote más grande reportado en Chile, donde 165 casos de listeriosis fueron asociados a un clon único de *L. monocytogenes*, causando 14 muertes (Montero y col., 2015). Este brote fue vinculado a una fábrica de quesos blandos tipo Brie y Camembert. Debido a ello es que se presenta una imperiosa necesidad de optimizar las condiciones en donde son procesados los alimentos en la industria nacional.

En la industria de alimentos, para controlar la proliferación de microorganismos patógenos o alterantes, se utilizan barreras fisicoquímicas, tales como altas y bajas temperaturas, pH ácido o básico, altas concentraciones de cloruro de sodio, etc. (Lee y col., 2014; Lianou y Sofos, 2007; Tasara y Stephan, 2006); pero una de las más ampliamente utilizadas, es la mantención de bajas temperaturas en áreas de almacenamiento y de procesamiento de los alimentos, que varía en el rango de -18 a 8°C (Reglamento Sanitario de los Alimentos, DTO. N° 977/96).



L. monocytogenes es capaz de superar las barreras comúnmente utilizadas en la industria debido a su capacidad de proliferar a baja temperatura (entre $-0,4^{\circ}\text{C}$ y 45°C), tolerar un amplio rango de pH (entre 4,5 y 9,0) y altas concentraciones de sal (hasta 3 M NaCl) (Lee y col., 2014). Adicionalmente, esta bacteria es capaz de colonizar superficies de diversas composiciones tales como plásticos, acero inoxidable o vidrio (Bonsaglia y col., 2014), lo que le permite mantenerse en sitios de difícil acceso como los elementos internos de la maquinaria de trabajo (Pan y col., 2006). Una vez lograda la colonización por esta bacteria, su erradicación representa un arduo desafío, debido a que esta bacteria tiene la capacidad de formar biopelículas, lo que aumenta la tolerancia a la acción de compuestos sanitizantes (Mah y O'Toole, 2001). Es por esta razón que las estrategias de control actuales se enfocan en prevenir la formación de biopelículas, pero a diferencia de otros microorganismos, *L. monocytogenes* posee diversos mecanismos para sobrellevar estos desafíos, colonizar las superficies y proliferar en condiciones de frío.

1.2 Mecanismos moleculares de *L. monocytogenes* en respuesta a frío

En bacterias, la respuesta a un estrés induce primariamente un período de aclimatación y posteriormente una condición de adaptación (Barria y col., 2013; Horn y col., 2007). Específicamente en frío, el período de aclimatación se caracteriza por presentar una alta expresión de proteínas inducidas por frío (Cold Induced Proteins o CIPs) y una disminución en el resto del metabolismo celular, incluyendo la proliferación bacteriana. Una vez finalizado este período, la síntesis de CIPs disminuye, se reestablece el metabolismo celular y comienza nuevamente la proliferación celular, pero a una menor velocidad (Figura 1).

El frío induce cambios fisiológicos producto de la modificación fisicoquímica del medio. Estos cambios se resumen en aumento de la rigidez de la membrana plasmática, reducción de la actividad enzimática, plegamiento proteico ineficiente o ralentizado, y modificación en los ribosomas (Chan y Wiedmann, 2009). Muchas bacterias han desarrollado complejos sistemas para tolerar estos cambios producto del estrés ambiental (Burgess y col., 2016). En el caso particular de *L. monocytogenes*, han sido descritos diversos mecanismos para responder a las alteraciones ambientales y permitir el paso a la adaptación (van Schaik y Abee, 2005). Estos mecanismos se resumen a continuación:

- Síntesis de CIPs: las proteínas de respuesta a frío, son definidas como chaperonas que previenen la formación de estructuras secundarias en las moléculas de mRNA. Este sistema han sido descritos primariamente en los modelos *E. coli* y *B. subtilis*, y más recientemente reportados en *L. monocytogenes* (Chan y Wiedmann, 2009; Ermolenko y Makhatadze, 2002).
- Modificación de la membrana fosfolipídica: como respuesta a la disminución en la fluidez de la membrana, *L. monocytogenes* prioriza la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y ramificada del tipo anteiso (anteiso-C₁₅ y anteiso-C₁₇). Esto disminuye el punto de fusión de los ácidos grasos de membrana, aumentando así la fluidez (Annous y col., 1997).

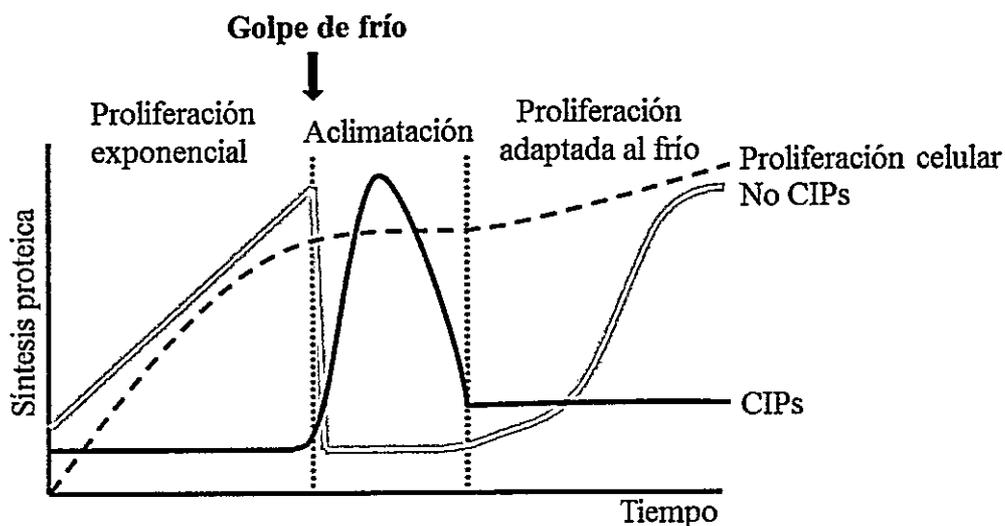


Figura 1. Proceso de adaptación al estrés por frío (modificado de Barria y col., 2013). En el momento que un cultivo bacteriano es expuesto a frío, el crecimiento bacteriano (línea punteada) se ve drásticamente disminuido a lo largo de todo el proceso de aclimatación. Paralelamente, disminuye casi en su totalidad la síntesis proteica (línea gris), exceptuando a las proteínas inducidas por frío (CIPs; línea negra), las que permiten sobrellevar el estrés inicial de frío y dar paso al estado de adaptación. Durante la adaptación la síntesis de CIPs se ve reducida, mientras que la síntesis del resto de las proteínas se reestablece y comienza nuevamente la proliferación celular.

- Captación de osmolitos y oligopéptidos: en *L. monocytogenes*, se ha observado un aumento en la síntesis de transportadores de los osmolitos glicina betaína (Gbu), de carnitina (OpuC) y de oligopéptidos de bajo tamaño. Los osmolitos o solutos compatibles, son compuestos orgánicos solubles de bajo peso molecular que no afectan de forma adversa al metabolismo de la célula; y los oligopéptidos otorgan aminoácidos para la síntesis de proteínas en condiciones de estrés. El aumento de osmolitos y oligopéptidos mantiene la turgencia de la célula, lo que aumenta el volumen de agua disponible, estabilizando la estructura de las proteínas plegadas y previniendo la formación de cristales de hielo. Se ha visto que la presencia de estos solutos compatibles favorece la proliferación de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas (Angelidis y Smith, 2003; Chan y Wiedmann, 2009).
- Control del estrés oxidativo: durante el proceso de congelación y descongelación ha sido descrita la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que se ve acoplado a un aumento en la síntesis de las enzimas catalasa (Kat) y superóxido dismutasa (SOD; Azizoglu y Kathariou, 2010). Sin embargo, a bajas temperaturas no ha sido descrito el mecanismo mediante el cual se producen las ROS; no obstante, se ha visto que *L. monocytogenes* y otros microorganismos sintetizan estas enzimas en respuesta a las bajas temperaturas (Garénaux y col., 2009; Park y col., 1998).

En conjunto con los cambios fisiológicos descritos, también ocurre una disminución general del metabolismo bacteriano producto del frío, lo que deriva en una merma del consumo energético celular, resultando en un incremento de las posibilidades

de éstas a sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (Chan y Wiedmann, 2009; Tasara y Stephan, 2006).

Uno de los mecanismos principales que favorece la supervivencia de *L. monocytogenes* es la formación de biopelículas, el cual le otorga una matriz de protección ante condiciones desfavorables (Bonsaglia y col., 2014). En este sentido, conocer la dinámica de formación de biopelículas a bajas temperaturas permite entender como *L. monocytogenes* se adapta y sobrepasa las barreras que se usan en la industria de alimentos para el control de microorganismos (Renier y col., 2011).

1.3 *L. monocytogenes* y su capacidad de formar biopelículas

El proceso de formación de biopelículas ha sido descrito como un proceso que involucra al menos tres etapas: la primera corresponde al asentamiento de la bacteria a una superficie lo que permite generar una micro-colonia; luego se da paso a un proceso de maduración, donde se induce la síntesis y secreción de polisacáridos generando una matriz de protección; y finalmente una etapa donde la biopelícula madura comienza a dispersar las células hijas al medio (Figura 2; Hall-Stoodley y Stoodley, 2002; O'Toole y col., 2000).

Una de las mayores ventajas de formar biopelículas es la resistencia adquirida a condiciones desfavorables, dado que la matriz de exopolisacáridos protege contra desecación, compuestos antibióticos y agentes tóxicos, pero al mismo tiempo actúa como un reservorio de nutrientes de fácil acceso (Doijad y col., 2015; Hall-Stoodley y col., 2004).

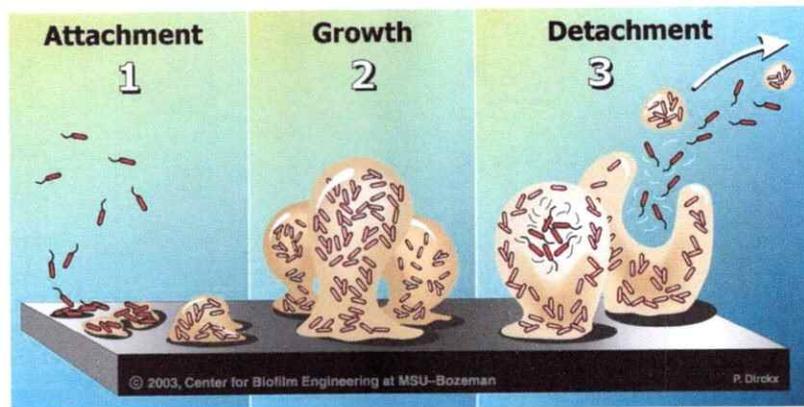


Figura 2. Formación de biopelícula en tres etapas (Imagen reproducida con permiso de Montana State University Center for Biofilm Engineering). Las células platónicas se aproximan a la superficie, tras lo cual forma una microcolonia producto de la liberación de polisacáridos (1). Luego las células de la microcolonia proliferan (2), logrando un punto de maduración en el cual se liberan bacterias al medio (3).

L. monocytogenes es capaz de formar biopelículas, y son estas estructuras las que le permiten mantenerse y tolerar condiciones adversas como las aplicadas en la industria de alimentos para el control de los microorganismos (Bonsaglia y col., 2014). De acuerdo a lo descrito en literatura, el proceso de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* requiere primariamente del flagelo, estructura que permite el asentamiento de la bacteria en una superficie (Lemon y col., 2007). Su función principal sería guiar a la bacteria a la superficie, pero luego las glicosiltransferasas comienzan la liberación de exopolisacáridos del tipo N-Acetilmanosamina para formar el microambiente, brindando protección a la nueva colonia (Köseoğlu y col., 2015).

De acuerdo a lo anterior, la expresión flagelar podría ser un mecanismo de control de la producción de biopelículas. La regulación en la expresión de las proteínas flagelares se debe principalmente al represor transcripcional MogR (Cossart y Lebreton, 2014). Este factor de transcripción actúa como un represor de los operones codificantes para flagelo, y se encuentra expresado en la célula en todas las condiciones de temperatura. Sin embargo, a temperatura ambiente, este represor se encuentra unido al inhibidor GmaR, el cual impide su actividad represora, favoreciendo así la síntesis de proteínas flagelares. Cuando la bacteria es expuesta a temperaturas mayores a 34°C, el dímero MogR-GmaR sufre un cambio conformacional, liberando a MogR, permitiendo la inhibición rápida de todos los sistemas de movilidad (Kamp y Higgins, 2011).

En un estudio publicado por Chang y col., 2012, mutantes de *L. monocytogenes* fueron analizadas respecto a su capacidad de formar biopelículas. Los resultados revelaron que entre aquellos genes que afectaron la producción de biopelículas, se

encontraban genes del aparato flagelar (tanto del filamento como del motor del flagelo), genes de quimiotaxis, genes de “quorum sensing”, genes de glicosiltransferasas y genes con función desconocida. Estudios independientes logran respaldar esta información, dado que aquellos reportan una disminución en la capacidad de *L. monocytogenes* de formar biopelículas cuando se ve modificada negativamente la expresión de genes flagelares (Lemon y col., 2007), de genes asociados a virulencia (Luo y col., 2013) y de genes asociados a “quorum sensing” (Riedel y col., 2009).

El sistema de “quorum sensing” es el sistema mediante el cual las bacterias son capaces de determinar la densidad bacteriana en la vecindad. En el caso de *L. monocytogenes*, esta posee un sistema híbrido, es decir, posee tanto el sistema canónico de bacterias Gram positivas mediante oligopéptidos (sistema Agr), como el sistema mediante autoinductor tipo 2 (LuxS) encontrado tanto en Gram positivas como Gram negativas (Renier y col., 2011). En ambos casos la transducción de señales se realiza mediante sistemas de dos componentes (Henke y Bassler, 2004). Estudios han reportado diferencias en la producción de biopelículas de *L. monocytogenes* mediante modificación en la expresión de genes vinculados tanto al sistema Agr (Chang y col., 2012) como al sistema LuxS (Sela y col., 2006).

Estudios han reportado que la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* es máxima a temperaturas cercanas a los 20°C, disminuyendo a temperaturas ya sean más bajas o más altas (Barbosa y col., 2013; Bonsaglia y col., 2014), mientras que otros han reportado una capacidad máxima en la formación de biopelículas a temperaturas cercanas a los 37°C (Di Bonaventura y col., 2008; Moltz y Martin, 2005). Esta reducción

descrita ha sido evaluada mediante técnicas de microscopía y espectrofotometría en condiciones de altas temperaturas (35°C y 37°C), refrigeración (4°C y 12°C), refrigeración y estrés osmótico, y refrigeración y estrés ácido.

L. monocytogenes, además de ser capaz de proliferar y formar biopelículas en un amplio rango de temperaturas, es capaz de formar biopelículas en múltiples superficies, incluyendo acero, vidrio y plásticos (Bonsaglia y col., 2014). Diversos estudios han evaluado la capacidad de formar biopelículas en estas matrices y muchos autores concluyen que *L. monocytogenes* es más consistente en la producción de biopelículas en superficies de acero y vidrio, por sobre plástico (Chavant y col., 2002; Di Bonaventura y col., 2008). En la industria de alimentos se encuentran superficies de contacto fabricadas con todos los elementos descritos, lo que establece a *L. monocytogenes* como un problema para asegurar la inocuidad alimentaria, considerando su capacidad de formar biopelículas en las diferentes superficies y las propiedades de protección que le brinda la biopelícula a las células (Pan y col., 2006).

La estructura de la biopelícula que *L. monocytogenes* es capaz de producir, ha sido observada por diversos autores en distintas condiciones. Un patrón común observado a bajas temperaturas ha sido la formación de una biopelícula con forma de monocapa, homogénea con momentos de alta densidad bacteriana que varía dependiendo de las cepas y las condiciones ambientales utilizadas (Chavant y col., 2002; Di Bonaventura y col., 2008; Mosquera-Fernández y col., 2014). El uso de distintos medios de cultivo, ha resultado en formación de biopelículas con distintas características. Algunos autores han descrito que condiciones ambientales de bajos

nutriente podrían favorecer la formación de biopelículas en *L. monocytogenes* (Kadam y col., 2013). La mayoría de estos ensayos utilizan microscopía de luz y microscopía de epifluorescencia para la observación de la biopelículas.

Las condiciones ambientales afectan la formación de biopelículas como ha sido mencionado, sin embargo, el rol en la formación de estas estructuras que juegan las características propias de las cepas no ha sido descrito. Han sido descritas diferencias en las capacidades de formar biopelículas en relación al serotipo de las cepas, la matriz de donde fueron recuperadas y a la cantidad y tipo de ácidos grasos que éstas poseen (Doijad y col., 2015; Kadam y col., 2013). No obstante, esta información aún representa un punto de discusión dado que distintos autores han encontrado resultados, muchas veces, discordantes (Renier y col., 2011).

1.4 Propuesta de investigación

Una colección de 110 cepas de *L. monocytogenes* se encuentra disponible en el laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA de la Universidad de Chile, la cual ha sido generada durante un período de 5 años. Estos aislados fueron clasificados de acuerdo a su tiempo generacional a 8°C en 3 categorías: crecimiento rápido, medio y lento. Dos representantes de los grupos de proliferación rápida y lenta respectivamente fueron seleccionados para evaluar la respuesta transcripcional global mediante microarreglos. Se comparó la expresión de estos aislados de *L. monocytogenes* expuestos a frío (8°C) respecto a 30°C usado como control. El análisis de los datos reveló que estas cepas extremas presentaron una expresión diferencial de genes flagelares en respuesta a frío, las cepas de proliferación rápida presentaron una menor

expresión de los genes relacionados a la formación de flagelo que las cepas lentas (Cordero y col., 2016). Esta diferencia podría ser indicativa de una respuesta diferencial a la hora de generar biopelículas dada la importancia de estructuras flagelares a la hora de invadir una nueva superficie (Lemon y col., 2007).

En este trabajo se plantea la siguiente hipótesis: “Aislados de *Listeria monocytogenes* con distintas velocidades de proliferación en frío presentan capacidades diferenciales de movilidad y formación de biopelículas que se relacionan con los niveles de expresión de los genes relacionados a estas funciones en respuesta a la baja temperatura”. Para resolver esta hipótesis se utilizaron 8 cepas de *L. monocytogenes* provenientes de distintas matrices alimentarias, a las cuales se les realizaron ensayos de movilidad, cuantificación y observación de biopelícula formada y cuantificación de la expresión de genes asociados a movilidad y formación de biopelículas tanto en condiciones de aclimatación como de adaptación.

1.5 Hipótesis

“Aislados de *Listeria monocytogenes* con distintas velocidades de proliferación en frío presentan capacidades diferenciales de movilidad y formación de biopelícula que se relacionan con los niveles de expresión de los genes vinculados a estas funciones en respuesta a la baja temperatura”.

1.6 Objetivo General

Determinar la movilidad, la capacidad de formación de biopelículas y los niveles de expresión de los genes asociados a estos procesos, en aislados de *L. monocytogenes* con diferentes capacidades de proliferación en frío.

1.6.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar movilidad a 8°C de cepas de *L. monocytogenes* con distinta velocidad de proliferación en frío.
2. Evaluar capacidad de formar biopelículas a 8°C de cepas de *L. monocytogenes* con distinta velocidad de proliferación en frío.
3. Evaluar la respuesta transcripcional de genes asociados a la formación de biopelículas y movilidad en aislados de *L. monocytogenes* con distinta velocidad de proliferación en frío ante exposición a 8°C.

2 Materiales y Métodos

2.1 Cepas de *L. monocytogenes*

De un total de 110 aislados de *L. monocytogenes*, pertenecientes a una colección del Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA de la Universidad de Chile, se seleccionaron 8 aislados que en un análisis previo a 8°C mostraron diferentes velocidades de proliferación, 4 de ellos con tiempo de generación (T_g) < a 8 horas (rápidas) y 4 con $T_g > 12,3$ horas (lentas; Tabla 1).

Las cepas fueron recuperadas desde el cepario en TSA YE [Agar Tripticasa Soya (BBL™) suplementado con Extracto de Levadura (Bacto™)] e incubadas a 37°C durante toda la noche. La confirmación de la pureza de las cepas se llevó a cabo en CHROMagar™ *Listeria* (Oxoid).

2.2 Cultivo bacteriano en frío

Según el experimento a realizar, los aislados son cultivados a 8°C durante períodos definidos de acuerdo a la etapa de respuesta al frío: **fase de aclimatación**, tiempo de cultivo donde las bacterias no proliferan y permanecen viables o **fase de adaptación**, tiempo de cultivo en la cual las bacterias se multiplican frente a la nueva condición. En ambos casos, los aislados son cultivados en medio TSBYE [Caldo Tripticasa Soya (Bacto™) suplementado con Extracto de Levadura (Bacto™)] a pH 6.0, 30°C y 150 rpm durante la noche. Posteriormente, el cultivo es ajustado a DO_{600} 0,3 en medio TSBYE pH 6.0 y se incuba durante 1, 2, 4 o 24 horas a 8°C (fase de aclimatación).

Tabla 1. Descripción de los aislados de *L. monocytogenes* seleccionados

Aislado	Origen	Tg (horas)	Clasificación
LIST 2-2 †	Marisco	7,6	Rápida
APA 13-2 †	Pollo	7,9	Rápida
APA 6-7	Pollo	7,9	Rápida
AL 61-2B	Queso	8,0	Rápida
AL 113	Carne	12,3	Lenta
AL 563-2	Helado	12,6	Lenta
AL 157-12 †	Queso	13,4	Lenta
BS 3-2 †	Carne	13,5	Lenta

† Indica las cepas seleccionadas para los ensayos de expresión génica por ser las cepas más extremas de cada grupo.



Por otro lado, para que las cepas alcancen la fase de adaptación a 8°C, a partir del cultivo ON, se ajusta un medio fresco (TSBYE) a DO₆₀₀ 0,05 y se incuba durante 96 horas a 8°C a 150 rpm. A partir de este cultivo adaptado, se ajustará nuevamente un medio fresco TSBYE a DO₆₀₀ 0,05 y se incubará a 8°C y 150 rpm hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0,3 lo que equivale a un cultivo adaptado en fase de proliferación exponencial.

2.3 PFGE para *L. monocytogenes*

Se determinó el nivel de clonalidad de los aislados de *L. monocytogenes* mediante un ensayo de electroforesis en campo pulsado o PFGE por sus siglas en inglés. Para este procedimiento se siguió el protocolo descrito por PulseNet (CDC, 2013) utilizando la enzima de restricción *AscI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Se utilizó DNA genómico de *Salmonella* Enterica serotipo Braenderup H9812 digerido con *XbaI* para normalizar la imagen, el cual fue cargado en dos carriles por cada gel. Los perfiles de electroforesis fueron analizados mediante el software GelComparII (Applied Maths NV, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice y análisis UPGMA con parámetros de optimización y tolerancia del 1% (Foerster y col., 2012).

2.4 Movilidad de *L. monocytogenes*

Se realizó una prueba de movilidad como ha sido descrito por Mosquera-Fernández y col., 2014 con algunas modificaciones. Se utilizó medio TSBYE semisólido con 3 concentraciones distintas de agar: 0,20%, 0,25% y 0,30% en placas de Petri. Para este ensayo, las cepas utilizadas fueron inoculadas en agar selectivo Chromo Listeria Agar. Una colonia aislada fue recuperada con un asa bacteriológica recta y se utilizó para inocular, en cuadruplicado, placas de TSBYE con distintas concentraciones de agar.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 8°C durante 10 días y se determinó el diámetro (mm) de las colonias cada dos días.

2.5 Ensayo de adherencia de *L. monocytogenes* a superficies de acero

El procedimiento fue realizado siguiendo la metodología descrita por Herrera y col., 2007, con algunas modificaciones. Las cepas seleccionadas fueron primariamente adaptadas a frío. En una placa de cultivo celular de 24 pocillos, se introdujo en cada pocillo un disco de acero inoxidable (10 mm de diámetro, 1 mm de espesor, tipo 304 con acabado 2B, MECSUS Ltda.), los cuales fueron previamente lavados, sumergidos en etanol, tras lo cual fueron esterilizados por autoclave. A cada pocillo se agregaron 500 μ l del inóculo en fase de proliferación exponencial temprana ($DO_{600} = 0,3$). Las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 8°C sin agitación. Para el ensayo se realizaron dos réplicas biológicas y dos réplicas técnicas por cepa. Pasado el tiempo de incubación, se extrajo el sobrenadante, se lavó 3 veces el disco de acero con PBS estéril. Con una tórula estéril se recuperaron las bacterias adheridas a la superficie del disco, se introdujo la tórula en 5 ml de PBS y fue sometida a vortex durante 30 segundos. Se hizo un recuento de las células mediante siembra en agar TSAYE considerando diferentes diluciones en PBS de la suspensión bacteriana.

2.6 Biopelícula de *L. monocytogenes* en superficies de acero

Se utilizó el protocolo descrito por Mosquera-Fernández y col., 2014 con algunas modificaciones. Para los ensayos de adherencia, se inocularon los discos de acero con las diferentes cepas adaptadas a frío y los cultivos se dejaron por 24 días a 8°C. La formación de biopelículas se evaluó cada 6 días. Para ello, cada disco fue lavado con

PBS 3 veces, luego secado, tras lo cual las células fueron fijadas agregando 200 μ l metanol frío. Se retiró el metanol y se dejaron secar por 15 minutos. Se les agregó una solución de cristal violeta al 1% durante 15 minutos para teñir las células. Los discos fueron luego lavados con agua destilada hasta eliminar todo el exceso de cristal violeta. Se dejaron secar los discos y se les agregaron 500 μ l etanol al 95% y fueron incubados durante 30 minutos. 200 μ l del etanol con el pigmento violeta fueron utilizados para la medición mediante espectrofotometría a 595 nm (Biochrom® Asys UVM340), permitiendo cuantificar la producción de biopelículas.

2.7 Biopelícula de *L. monocytogenes* en superficies de vidrio

Este ensayo fue diseñado para evaluar la capacidad de formar biopelículas de los diferentes aislados de *L. monocytogenes* en superficie de vidrio y además analizar su estructura. Se utilizó el protocolo descrito por Sela y col., 2006 con algunas modificaciones. Las cepas seleccionadas fueron primariamente adaptadas a frío. En una placa de cultivo celular de 24 pocillos, se introdujo en cada pocillo un disco de vidrio de 1,2 cm de diámetro y luego se agregó en cuadruplicado 500 μ l del inóculo en fase de proliferación exponencial ajustado 10^8 UFC/ml, se incubó durante 24 días a 8°C y la estructura de la biopelícula formada se analizó cada 6 días mediante microscopía confocal. Tras la incubación, los discos de vidrio fueron lavados 3 veces con PBS y luego se les agregó una solución de naranja de acridina al 0,2% por 5 minutos para teñir las células de *L. monocytogenes*, tras lo cual los discos fueron 5 veces lavados con PBS. La cantidad y estructura de las biopelículas formadas fue analizada utilizando un sistema de microscopía confocal (Eclipse Ti, Nikon y software NIS-Elements Viewer, Nikon).

2.8 Extracción de RNA de *L. monocytogenes*

Las cepas seleccionadas (LIST 2-2, APA 13-2, AL 157-12, BS 3-2) fueron aclimatadas a 8°C durante 1, 2, 4 y 24 horas o adaptadas a frío durante 96 horas como fue descrito previamente. A partir de los cultivos aclimatados o adaptados, se tomaron 4 ml de cada cultivo y se precipitaron las células bacterianas, las cuales fueron lavadas dos veces con PBS estéril. Como control, un cultivo de cada cepa fue realizado a 30°C, 150 rpm, para luego ser ajustados a una DO₆₀₀ de 0,05 utilizando medio TSBYE fresco. Estos cultivos fueron incubados a 30°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3, y luego las células fueron recolectadas de la misma forma que los cultivos adaptados y aclimatados a 8°C. Para la extracción del RNA el "pellet" bacteriano obtenido fue resuspendido en 100 µl "buffer" TE con lisozima (10 mg/ml; MP Biomedicals). La suspensión fue incubada por 20 minutos a 37°C y luego se prosiguió con el protocolo de extracción y purificación del RNA mediante el sistema de extracción de RNA RNeasy mini kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA, para eliminar trazas de DNA las muestras fueron tratadas con DNasa TURBO™ DNase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm y la ausencia de DNA se verificó mediante PCR convencional para el gen *bglA* (lmo0319).

2.9 Ensayos de qPCR

Para realizar la retrotranscripción se utilizó 1 µg de RNA, obtenido de las respectivas cepas de *L. monocytogenes*, utilizando la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Promega), 0,5 µg de Random Primers (Invitrogen) y se ajustó

el volumen a 15 μ l con H₂O libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos, tras lo cual se dejó en hielo por 5 minutos más. Posteriormente se añadieron: 5 μ l de M-MLV RT "Buffer" 5x, 1,25 μ l de cada dNTP 10 mM (Invitrogen), 25 U de RNasin (Promega), 200 U de M-MLV RT, y 2,25 μ l de agua libre de nucleasas. Luego el ciclo único del termociclador fue de 37°C por 60 minutos y 70°C por 15 minutos. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Para el diseño de los partidores se determinaron las zonas conservadas de los genes blancos utilizando la herramienta BLAST en base al genoma de *L. monocytogenes* EGD-e. Luego se diseñaron los partidores mediante el programa Primer3 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser y col., 2012), limitando el diseño a las zonas conservadas entre los genomas secuenciados de *L. monocytogenes*. La lista de partidores se encuentra en la Tabla 2. Estos fueron verificados *in silico* mediante la herramienta BLAST y una vez adquiridos, fueron validados mediante PCR convencional. Para la reacción de qPCR se utilizó el reactivo FastStart Essential DNA Green Master (Roche) y el equipo LightCycler® 96 (Roche). La reacción se llevó a cabo agregando: 5 μ l de la DNA polimerasa SybrGreen, 0,3 μ l del partidor forward (10 mM) y 0,3 μ l de partidor reverse (10 mM), 1 μ l del cDNA y 3,4 μ l de agua libre de nucleasas, siguiendo el programa indicado en la tabla 3. La eficiencia de la reacción se determinó usando el software LinReg PCR.

Tabla 2. Partidores de *L. monocytogenes* diseñados para el estudio de expresión génica.

Gen	ID	Secuencia de partidores (5'→3')	T _m (°C)	Tamaño
<i>16S rDNA</i>	lmor04	F-GTGCAGAAGAGGAGAGTGGA R-TCAGCGTCAGTTACAGACCA	58	104 pb
<i>agrB</i>	lmo0048	F-CTCCGGCAGACACAGAAA R-CGTCCCTATCATCGCTTT	58	80 pb
<i>agrD</i>	lmo0049	F-CCATGAAAGTTGCGGATT R-CAAATGGACTTTTTGGTTTCG	58	72 pb
<i>mogR</i>	lmo0674	F-AGAAGCTGGCATTGACGA R-TTCGATTCCACCGTGTTTC	58	91 pb
<i>gmaR</i>	lmo0688	F-GGAAAAGGCGAGTTTGCT R-GGTCACTTCGTCTGCATCA	58	150 pb
<i>cheR</i>	lmo0683	F-CTGGGATGCACTGGAAAA R-AATGCCTTGTGCCAACTG	58	146 pb
<i>motB</i>	lmo0686	F-GCAGTCTTGAAGGCGATG R-AAGTAAGGCTGCTGCTGCT	58	87 pb
<i>flgD</i>	lmo0696	F-TGGCGCAACTTTCCTT R-GATTGCAAGGCGGAGTTT	58	91 pb

Tabla 3. Condiciones de la reacción de qPCR para ensayos de expresión génica

Etapa	Nº de Ciclos	Temperatura [°C]	Duración [s]
Pre incubación inicial	1	95	600
Pre incubación		9	10
Alineamiento	40	58	10
Amplificación		72	10
		95	10
Melting	1	65	60
		97	1

La expresión relativa de cada gen se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ descrito por (Livak y Schmittgen, 2001) con las modificaciones descritas por AppliedBiosystems (AppliedBiosystems, 2008), siendo valores mayores a 1 calificados como sobreexpresión y valores menores a -1 como represión. El gen *rDNA 16S* (Imor04) se usó como normalizador (Tasara y Stephan, 2006).

2.10 Estadística

Para los ensayos de movilidad, adherencia, formación de biopelícula en acero y qPCR, se evaluaron las diferencias obtenidas entre grupos mediante la prueba hipótesis de T de Student, corroborando el poder estadístico de los datos y verificando los supuestos, utilizando el software R (R Core Team, 2015).

3 Resultados

Los resultados serán presentados de acuerdo a los objetivos planteados en el proyecto.

Objetivo específico 1

3.1 Determinación de clonalidad de aislados de *L. monocytogenes*

Previo a los ensayos de movilidad y formación de biopelículas se evaluó la relación clonal de las cepas a estudiar mediante PFGE (Tabla 1).

El análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos se presentan en el dendrograma de la figura 3. Los resultados indican una amplia diversidad genética entre los aislados y no se identificaron grupos clonales. La similitud de perfiles electroforéticos identificada varió entre 40% y 90%. Desde este momento en adelante se hará referencia a estos aislados como cepas de *L. monocytogenes*.

3.2 Determinación de la movilidad celular

Con el fin de validar fenotípicamente la observación realizada por Cordero y col., 2016, es decir relacionar el nivel de expresión de proteínas flagelares con la capacidad de movilización bacteriana, es que se evaluó la movilidad mediante un ensayo en agar semisólido. Para este ensayo se utilizaron las mismas cepas presentadas en la Tabla 1, y se evaluó su movilidad a 8°C.

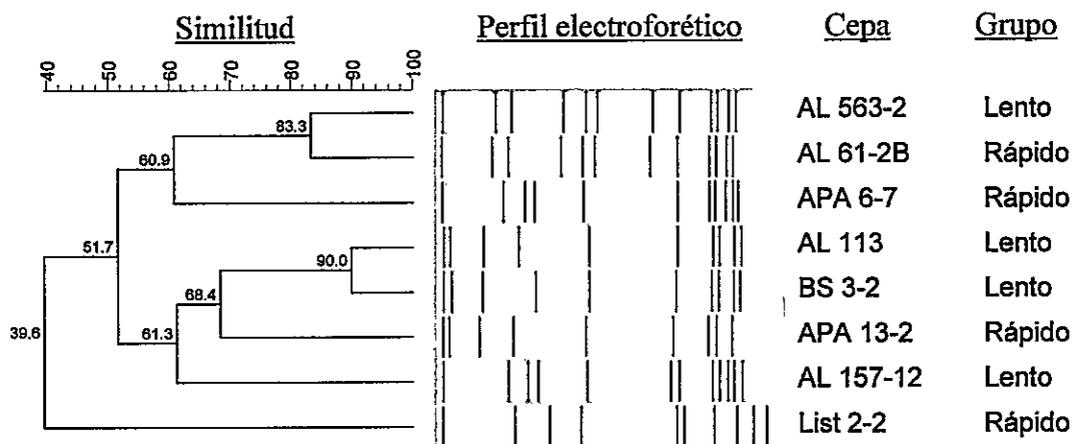


Figura 3. Dendrograma de 8 aislados de *L. monocytogenes* pertenecientes al grupo rápido o lento a 8°C (Tabla 1). Se presenta en el dendrograma la distancia relativa en los nodos, el nombre de asignación por cepa y el grupo al que corresponden en base a su adaptación a 8°C.

Los resultados de los ensayos de movilidad se representan como el diámetro de nado de la bacteria (figura 4). Se observa que las cepas lentas presentan una movilidad significativamente mayor que las cepas rápidas, que se incrementa en el tiempo y que es independiente de la cantidad de agar con la que el medio fue suplementado. Sin embargo, se aprecia que a menor concentración de agar la diferencia de movilidad entre los grupos es mayor.

Objetivo específico 2

3.3 Formación de biopelícula de cepas de *L. monocytogenes*

Se evaluó la capacidad de formar biopelículas en cepas rápidas y lentas de *L. monocytogenes* en superficies de acero y de vidrio a 8°C. Los resultados se presentan a continuación.

3.3.1 Formación de biopelículas en acero

En este tipo de superficie se midió la adherencia inicial (exposición durante 24 horas) y la formación de biopelícula durante 24 días.

3.3.1.1 Capacidad de adherencia de *L. monocytogenes* a superficie de acero

Se comparó la capacidad de adherencia de las cepas del grupo rápido en relación a las cepas del grupo lento (tabla 1). Las cepas de *L. monocytogenes* fueron expuestas a una superficie de acero inoxidable durante 24 horas a 8°C, de tal manera de poder evaluar la capacidad de unión a la superficie de las bacterias, sin dar tiempo a la maduración de la biopelícula. Los resultados obtenidos son presentados en la figura 5.

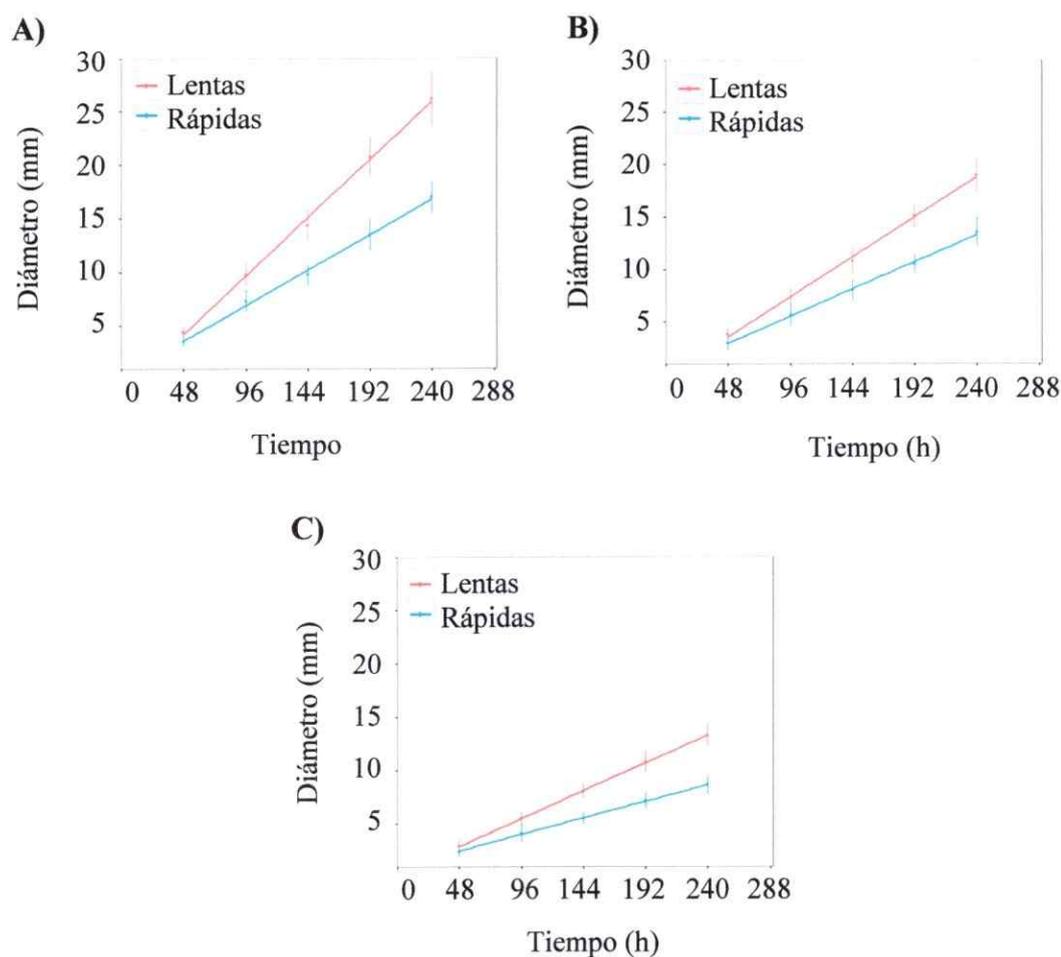


Figura 4. Movilidad a 8°C de cepas de *L. monocytogenes* rápidas y lentas. Se expresa el diámetro promedio de nado del grupo de cepas rápidas (azul) y lentas (roja) en placas con medio TSBYE suplementado con concentración de agar al 0,20% (A), 0,25% (B) y 0,30% (C) a 8°C. Ambos grupos estaban formados por 4 cepas (tabla 1). Cada punto representa el promedio de la movilidad de cuatro cepas con sus cuatro réplicas cada una. Las barras indican la desviación estándar. Las diferencias observadas entre los grupos en todos los puntos son significativas ($P \leq 0,05$) excepto para la medición de las 48 horas en el agar al 0,30%.

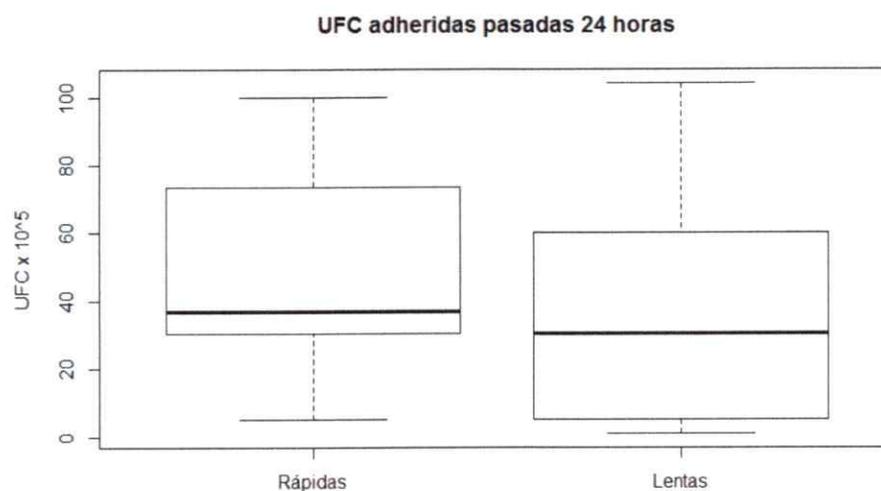


Figura 5. Comparación de la capacidad de adherencia de cepas rápidas y lentas de *L. monocytogenes* a superficie de acero a 8°C. Unidades formadoras de colonias (UFC) adheridas disco de acero. No hay diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$).

Las cepas rápidas y lentas presentaron el mismo grado de adherencia a superficies de acero durante 24 horas de exposición ($P > 0,05$), siendo éste cercano a 4×10^6 UFC/disco de acero.

3.3.1.2 Capacidad de formación de biopelícula de *L. monocytogenes* en discos de acero en el tiempo

Se evaluó la capacidad de formar biopelículas a 8°C para las cepas pertenecientes al grupo rápido y lento (tabla 1). El grupo de cepas rápidas alcanzó un máximo de producción de biopelículas cercano al día 6 para todas las cepas, destacando a LIST 2-2, dado que esta cepa presentó una cantidad de biopelícula mayor que las demás en todos los tiempos (figura 6A). El análisis estadístico revela una disminución significativa de la cantidad de biopelícula de las cepas rápidas a partir del día 12 con respecto a lo observado en el día 6. Por otro lado, en el grupo de cepas lentas (figura 6B) el máximo detectado se observó en el día 6, el que se mantuvo hasta el día 12, la disminución se observó a partir del día 18 ($P < 0,05$).

3.3.2 Producción de biopelícula de *L. monocytogenes* en superficies de vidrio

Con el fin de determinar la capacidad de formar biopelículas en superficies diferentes al acero, se utilizaron discos de vidrio, los cuales además permitieron analizar la estructura de las biopelículas formadas por las cepas de *L. monocytogenes*. Se realizó un análisis cualitativo de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de biopelículas formadas en láminas de vidrio por las 8 cepas de *L. monocytogenes* estudiadas (figuras 7 y 8).

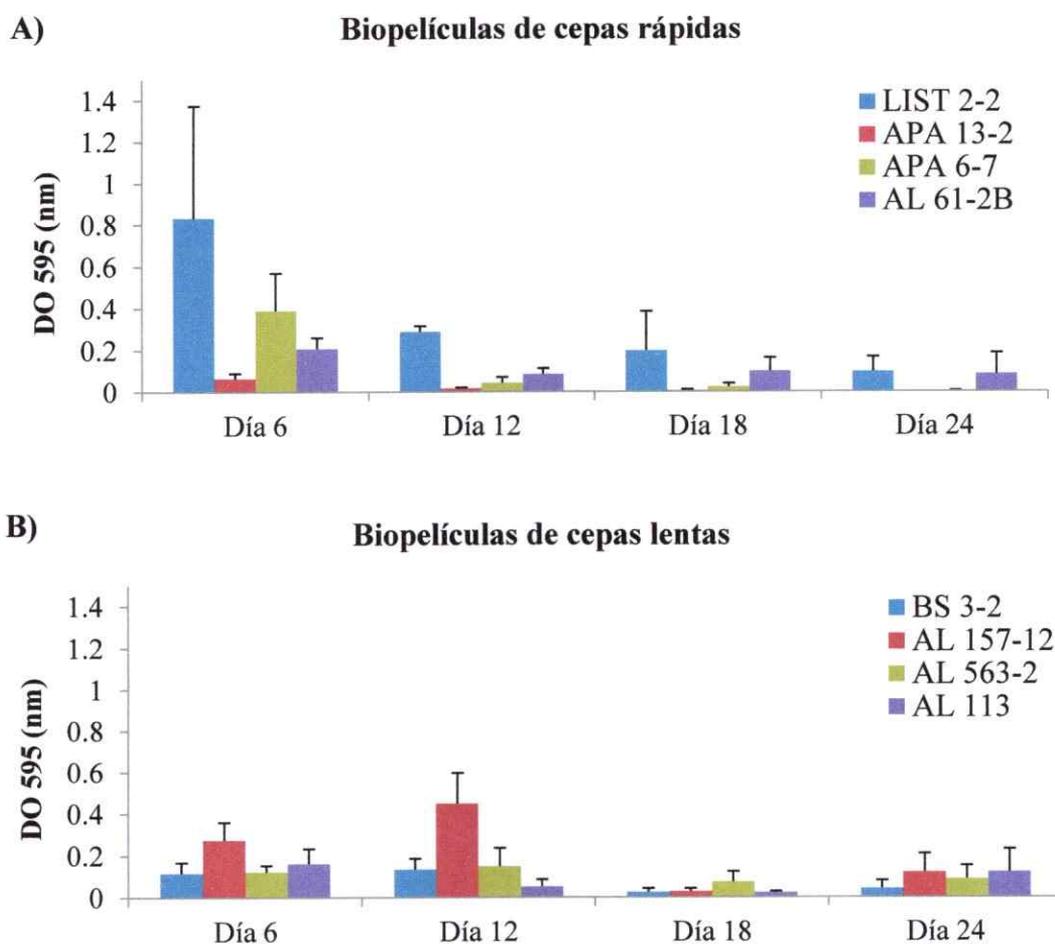


Figura 6. Formación temporal de biopelícula a 8°C de cepas de *L. monocytogenes* en discos de acero. Formación de biopelícula por cepas rápidas (A) y lentas (B) a distintos tiempos de incubación. Se presenta la densidad óptica capturada a 595 nm. Los valores son presentados por cepa y por días de incubación a 8°C. Las barras de error indican la desviación estándar. Cada ensayo se realizó con dos réplicas técnicas y dos réplicas biológicas.

Tanto en las cepas rápidas como en las lentas, la biopelícula formada estuvo compuesta por una monocapa de células distribuidas de forma homogénea. Se destaca que en el grupo rápido la mayor producción de biopelícula se observó en el día 6, mientras que en grupo lento esto ocurrió entre el día 12 y el 24. En las biopelículas formadas por el grupo lento se aprecian zonas con mayor densidad de células en comparación con las biopelículas de las cepas rápidas.

Consistente con lo observado en las láminas de acero, en el caso de las cepas rápidas (figura 7) la cepa LIST 2-2 formó una biopelícula de mayor densidad que las demás cepas del grupo, presentando su máximo al día 12 el cual perdura hasta el día 18. Las demás cepas rápidas presentaron su máximo ya sea al día 6 o al día 12, decayendo en las mediciones posteriores. En el caso del grupo lento (figura 8), la máxima producción de biopelícula en láminas de vidrio, ocurre a tiempos distintos entre las cepas. El análisis de las biopelículas de las cepas lentas mostró que BS 3-2 presenta una máxima producción de biopelícula en los días 12 y 24, mientras que la cepa AL 157-12 presentó una biopelícula desde el día 12 con un máximo en el día 24. La cepa AL 563-2 fue la mayor productora de biopelícula dentro del grupo de cepas lentas con un máximo de producción en el día 18 mientras que la cepa AL 113 fue la menos productora (con un máximo en el día 12).

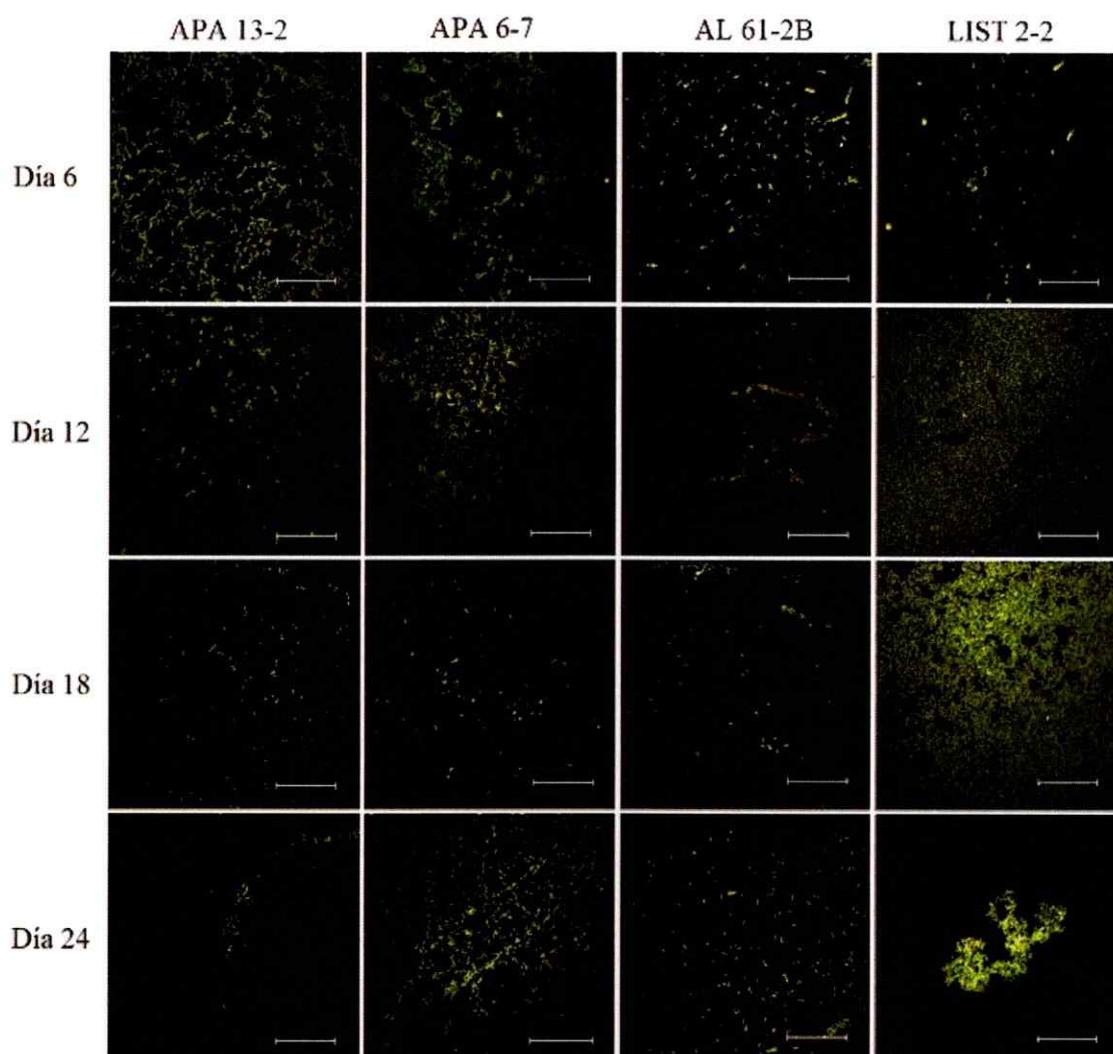


Figura 7. Formación de biopelícula a 8°C en superficie de vidrio por las 4 cepas del grupo rápido. Las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas en medio TSBYE expuestas a 8°C durante 24 días, fueron colectadas cada 6 días, para luego ser teñidas con naranja de acridina y visualizadas por microscopía confocal. Las imágenes presentan un pseudocolor verde para destacar relieve. Las barras indican una distancia de 50 μm .

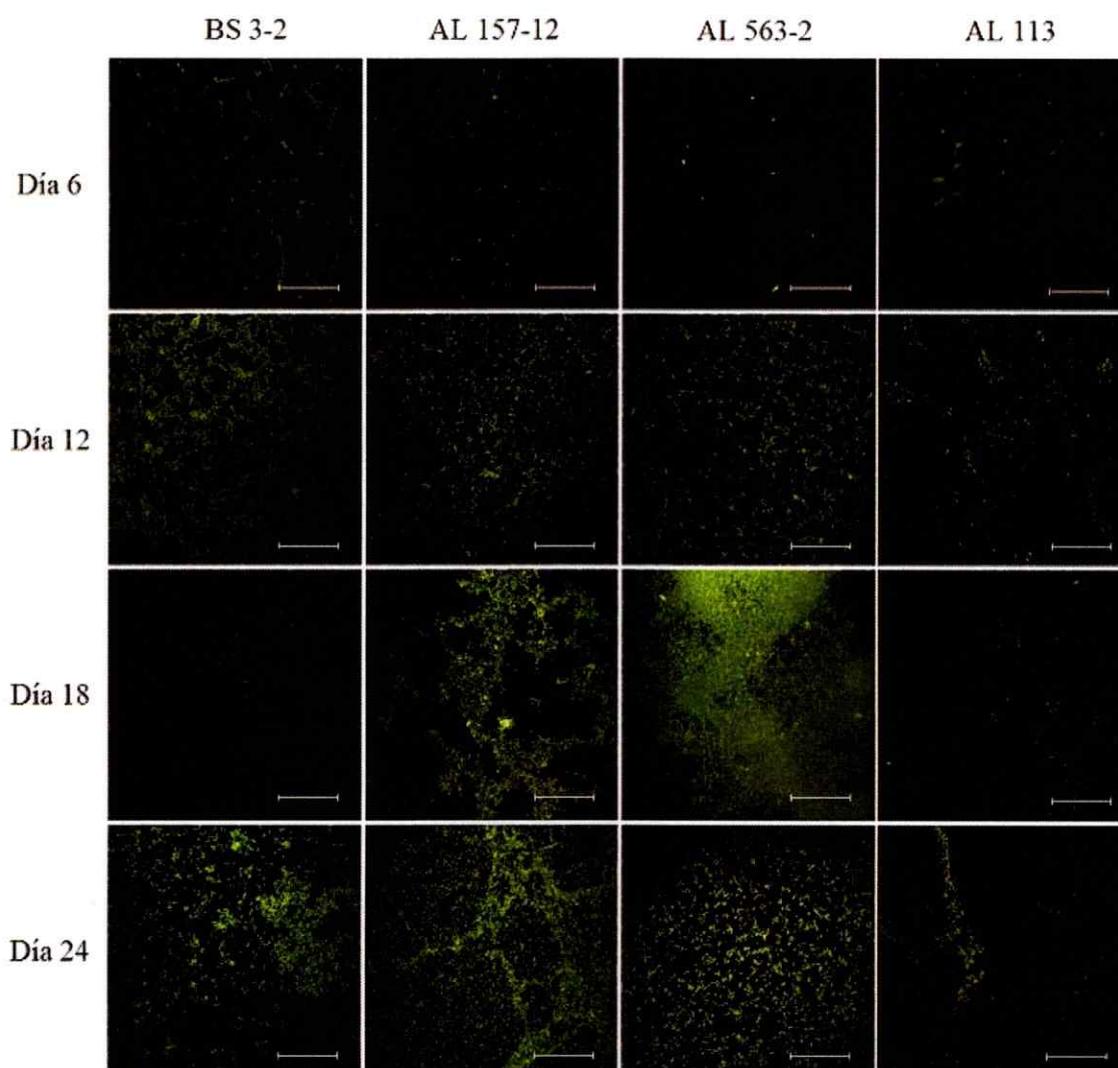


Figura 8. Formación de biopelícula a 8°C en superficie de vidrio por las 4 cepas del grupo lento. Las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas en medio TSBYE expuestas a 8°C durante 24 días, fueron colectadas cada 6 días, para luego ser teñidas con naranja de acridina y visualizadas por microscopía confocal. Las imágenes presentan un pseudocolor verde para destacar relieve. Las barras indican una distancia de 50 μm .

3.4 Determinación de la respuesta transcripcional

Dado que el proceso de formación de biopelícula es dinámico, se realizó un análisis cinético (fase de aclimatación y de adaptación a frío) de la expresión de genes relacionados a la formación de biopelículas en dos cepas rápidas (LIST 2-2 y APA 13-2) y dos cepas lentas (BS 3-2 y AL 157-12; tabla 1). Para este análisis se incluyó un total de 7 genes que codifican para proteínas que participan en “quorum sensing”, formación de flagelo, y quimiotaxis.

Los genes seleccionados de “quorum sensing” fueron *agrD* (lmo0048) que codifica para el precursor del autoinductor y *agrB* (lmo0049) que codifica para el transportador de membrana. Referente a los genes flagelares, estos están codificados en tres operones (tabla 4). Para el estudio se escogieron representantes de cada operón, los que incluyeron al gen del motor del flagelo *motB* (lmo0696), al gen de la base del flagelo *flgD* (lmo0696) y los genes reguladores *mogR* (lmo0674) y *gmaR* (lm0688). El gen *cheR* (lmo0683) fue seleccionado porque se relaciona con el proceso de quimiotaxis.

En la figura 9 se presentan los resultados de expresión para los genes *agrD*, *agrB*, *motB*, *flgD*, *mogR* y *cheR*. Es posible observar un comportamiento similar en la expresión de todos los genes analizados durante las primeras 24 horas (etapa de aclimatación a 8°C) en las cepas rápidas y lentas. Por el contrario, a las 96 horas cuando las cepas se encuentran adaptadas al frío, ocurre una diferenciación en la expresión, que se traduce en una represión de los genes estudiados en las cepas rápidas y una leve sobreexpresión en las cepas lentas.

Tabla 4. Operones que conforman el flagelo de *L. monocytogenes*

Operón N°	Nombre	Genes pertenecientes al operón
Operón 393	Represor transcripcional	<i>lmo0673</i> ; <u><i>lmo0674</i></u>
Operón 394	Fibra flagelar	<i>lmo0675</i> ; <i>lmo0676</i> ; <i>lmo0677</i> ; <i>lmo0678</i> ; <i>lmo0679</i> ; <i>lmo0680</i> ; <i>lmo0681</i> ; <i>lmo0682</i> ; <i>lmo0683</i> ; <i>lmo0684</i> ; <i>lmo0685</i> ; <u><i>lmo0686</i></u> ; <i>lmo0687</i> ; <u><i>lmo0688</i></u> ; <i>lmo0689</i>
Operón 397	Motor	<u><i>lmo0696</i></u> ; <i>lmo0697</i> ; <i>lmo0698</i> ; <i>lmo0699</i> ; <i>lmo0700</i> ; <i>lmo0701</i> ; <i>lmo0702</i>

* Genes subrayados indican los genes seleccionados para análisis mediante qPCR. Para la predicción de operones se usó el programa ProOpDB (Taboada y col., 2012).

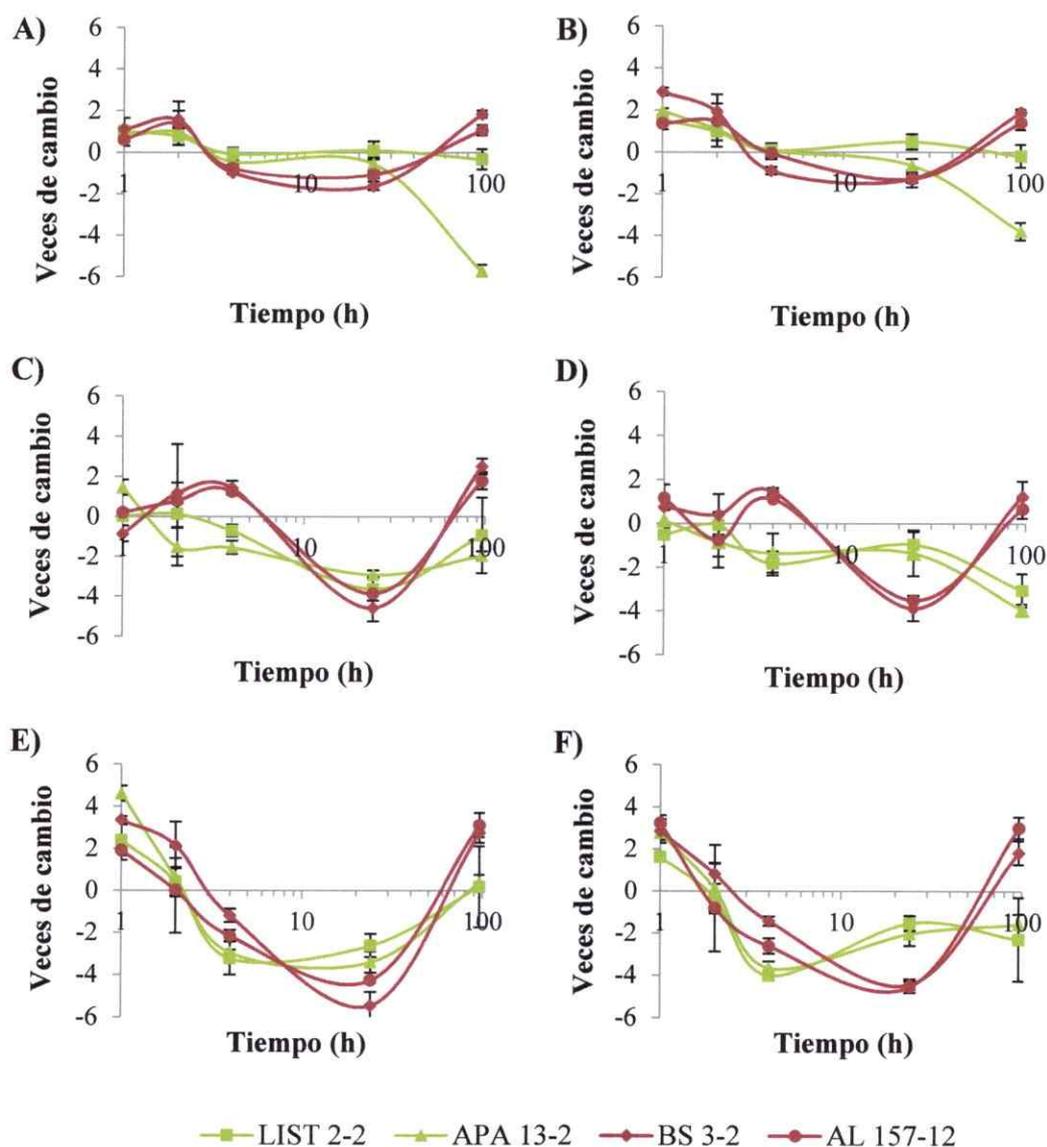


Figura 9. Cinética de expresión de genes asociados a biopelícula en *L. monocytogenes*. Se presenta la cinética de expresión de genes de “quorum sensing” [*agrD* (A) y *agrB* (B)], flagelo [*flgD* (C) y *motB* (D)], regulación transcripcional [*mogR* (E)] y quimiotaxis [*cheR* (F)]. Los tiempos analizados son 1, 2, 4, 24 y 96 horas de exposición a 8°C. Gráfico en escala logarítmica en base 10. Líneas verdes representan cepas del grupo rápido y líneas rojas representan cepas del grupo lento.

En particular respecto al gen regulador *gmaR*, sus niveles de expresión fueron determinados al comienzo de la aclimatación (2 horas a 8°C) y en adaptación (96 horas a 8°C). El gen *gmaR* forma parte del operón 394 (tabla 4) que codifica los componentes que forman parte de la fibra flagelar. GmaR es un represor estructural de MogR que actúa como represor transcripcional de los genes asociados a flagelo. El resultado muestra una disminución en los niveles de expresión del gen *gmaR* durante la adaptación exclusivamente en las cepas rápidas. En el caso de las cepas lentas no se observa una diferencia entre la aclimatación y la adaptación (figura 10).

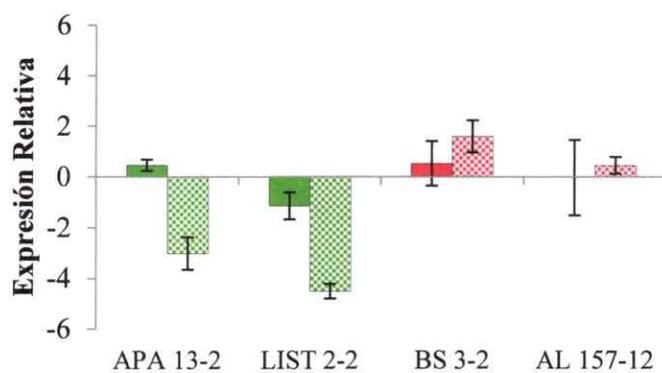


Figura 10. Cinética de expresión del gen *gmaR* de *L. monocytogenes*. En barras sólidas se ve la expresión del gen en aclimatación (2 horas de exposición a 8°C) y en barras achuradas se ve la expresión del gen en adaptación (96 horas de exposición a frío). Las dos cepas de color verde son representantes del grupo rápido, y las dos cepas de color rojo son representantes del grupo lento. Cada barra representa el promedio de dos réplicas técnicas y dos réplicas biológicas. Las barras indican desviación estándar.

4 Discusión

L. monocytogenes es un microorganismo patógeno, ubicuo, que en las personas susceptibles genera una enfermedad llamada listeriosis y que se produce por el consumo de alimentos contaminados (CDC, 2015). Una de las formas en que *L. monocytogenes* puede alcanzar los alimentos es a través de la manipulación de estos en superficies contaminadas. Esta bacteria es capaz de establecerse sobre superficies inertes, tales como acero, y sobre ellas formar biopelículas. Esta característica hace que *L. monocytogenes* constituya un riesgo microbiológico para la industria de los alimentos (Doijad y col., 2015).

En la presente investigación se seleccionaron 8 aislados de *L. monocytogenes* obtenidos de diferentes matrices alimentarias y que fueron caracterizados inicialmente mediante PFGE. En este estudio observamos perfiles de similitud entre 40% a 90%. En particular, los aislados AL 113 y BS 3-2 fueron los únicos que presentaron 90% de similitud genética, lo cual podría estar relacionado con el origen de estas cepas ya que ambas provienen de la matriz “carne” y además ambas han sido clasificadas como cepas de proliferación lenta en frío. Montero y col., 2015 hacen referencia a este mismo comportamiento, en el cual identificaron perfiles genéticos similares entre cepas obtenidas de una misma matriz. Esta propuesta explica también que la cepa LIST 2-2, siendo la única proveniente de la matriz “mariscos”, presente un perfil genético con una similitud de tan sólo 40% con el resto de los aislados.

En el trabajo publicado por Cordero y col., 2016, se determinó, entre otros, que la exposición a 8°C vs. 30°C induce diferencias en la expresión de genes asociados a

movilidad celular entre las cepas de rápida y lenta proliferación a 8°C, donde las cepas rápidas presentaron una represión de genes flagelares, mientras que las cepas lentas presentaron una sobreexpresión. Una de las explicaciones otorgadas a esta diferencia de expresión fue el ahorro energético que significa para la bacteria la disminución en la formación de flagelo, lo que permitiría favorecer una mayor proliferación a baja temperatura. Esta explicación también ha sido otorgada a procesos de virulencia en bacterias, dado que la expresión de estos elementos requiere de un alto costo energético, siendo fundamental su expresión únicamente en momentos oportunos para lograr una invasión y colonización efectiva del agente hospedero (Gripenland y col., 2010; Hurme y Rhen, 1998).

La expresión de estructuras flagelares ha sido vinculada con la formación de biopelícula de *L. monocytogenes*, sin embargo, el rol no ha sido descrito cabalmente. Algunos estudios reportan que el flagelo actúa como un elemento crítico en etapas tempranas de formación de biopelículas (Lemon y col., 2007), mientras que otros autores, mediante el uso de mutantes para genes flagelares de *L. monocytogenes*, han determinado que esta bacteria es capaz de producir biopelículas en ausencia de flagelo, pero en menor proporción (Chang y col., 2012). Por otro lado, otros autores han observado que la formación de biopelícula de *L. monocytogenes* a temperaturas superiores a 30°C se ve reducida (Bonsaglia y col., 2014; Lee y col., 2014), mientras que otros revelan un aumento en la formación de biopelículas a 37°C (Kadam y col., 2013) y una reducción a temperaturas menores que 20°C (Chavant y col., 2002). La expresión de genes flagelares y su relación con la temperatura ha sido ampliamente estudiada y descrita por el grupo de Higgins en múltiples trabajos (Alonso y col., 2014; Gründling y

col., 2004; Kamp y Higgins, 2009, 2011; Lemon y col., 2007; Shen y Higgins, 2006). Entre ellos, los autores explican la dinámica de expresión de genes flagelares en *L. monocytogenes*, en la cual los genes son reprimidos por el regulador MogR a temperaturas superiores a los 34°C (Kamp y Higgins, 2011). La disminución de la síntesis de proteínas flagelares ha sido descrito como un mecanismo de evasión del sistema inmune, debido a que los mamíferos presentan una temperatura corporal cercana a los 37°C, y a que la flagelina es reconocida como antígeno H por el sistema inmune innato mediante receptores tipo Toll (TLR; Hayashi y col., 2001). Por esa razón, es que en este trabajo se ha decidido estudiar cepas *L. monocytogenes* con distinto nivel de expresión de proteínas flagelares a 8°C, y la implicancia que presenta el flagelo en la capacidad de formar biopelículas a bajas temperaturas (8°C) en *L. monocytogenes*.

Referente a los niveles de adherencia a superficies de acero pasadas 24 horas de exposición a 8°C, resultó ser independiente de los niveles de expresión de genes flagelares en las cepas estudiadas lo cual refuta la hipótesis planteada. La similitud en los niveles de adherencia entre las cepas rápidas y lentas puede ser asociada a factores diferentes a la cantidad de flagelo (Chae y col., 2006). Existen estudios que describen la función del flagelo como un elemento que permite superar las fuerzas de repulsión electrostáticas producidas entre la superficie de contacto y la superficie bacteriana (Bonsaglia y col., 2014; Di Bonaventura y col., 2008), pero elementos como los exopolisacáridos y fimbrias también actuarían dentro del proceso de adherencia a la superficie (Chae y col., 2006; Goulter y col., 2009; Rivas y col., 2007; Tresse y col., 2009). Otros autores han realizado experimentos similares, entre ellos Moltz y Martin, 2005, estudiaron la formación de biopelícula de *L. monocytogenes* a 4°C, en el cual,

pasadas 24 horas, obtuvieron una magnitud de adherencia de 10^4 UFC en cada disco de acero, lo que se encuentra cercano a 1 orden de magnitud bajo lo encontrado en este trabajo. No obstante, los resultados presentados por los autores se basan en la biopelícula de una única cepa de *L. monocytogenes*, mientras que en este trabajo se utilizó un mayor número de cepas y cuyo nivel de adherencia varió entre 10^5 y 10^6 UFC por disco de acero. Además, las diferencias observadas pueden ser atribuidas a las distintas temperaturas utilizadas (4°C vs. 8°C). Por otro lado, Chae y col., 2006 realizaron ensayos de adherencia a 37°C , temperatura a la cual es reprimido el flagelo, obteniendo entre 10^2 y 10^4 UFC por disco de vidrio pasadas 3 horas de incubación. Estos resultados son concordantes con la inhibición completa del flagelo que se describe a 37°C y su función en la adherencia.

Las cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas, fueron capaces de formar biopelículas en superficies de acero y de vidrio. En este estudio además se ensayó la capacidad de formar biopelículas en superficies poliestireno (placas de microtitulación) de acuerdo al protocolo descrito por Djordjevic y col., 2002. Los resultados mostraron que a 8°C las cepas estudiadas no formaron biopelículas en poliestireno (datos no mostrados) lo cual también ha sido reportado por otros autores (Bonsaglia y col., 2014).

La capacidad de formar biopelícula a 8°C de *L. monocytogenes* resultó ser independiente de la velocidad de proliferación de las cepas en frío. Respecto a otros estudios, se observó una diferencia en el tiempo en que las distintas cepas de *L. monocytogenes* logran una máxima producción de biopelículas a 8°C . Estudios de Mosquera-Fernández y col., 2014 y Chavant y col., 2002 indican que a 25°C y 20°C respectivamente, la máxima producción de biopelículas sobre acero se alcanza a entre

los 5 y 7 días de incubación. En nuestro estudio a 8°C el tiempo para alcanzar una máxima producción de biopelículas fue diferente entre las cepas rápidas y lentas de *L. monocytogenes*, destacando para las cepas rápidas un menor tiempo para alcanzar este máximo. Esta diferencia podría relacionarse con la velocidad de proliferación a 8°C, lo que haría más semejante la dinámica de formación de biopelículas entre el grupo de cepas rápidas con otras cepas en condiciones óptimas de formación de biopelículas. Sin embargo, la biopelícula formada por el grupo de cepas lentas fue más persistente, es decir, fue posible observar formación de biopelículas por todas las cepas durante tiempos más prolongados. La disminución de la biopelícula posterior al punto máximo de formación ha sido discutida por múltiples autores como un proceso normal de maduración de la biopelícula en el cual la motilidad del flagelo puede inducir una separación de las células desde la superficie (Bonsaglia y col., 2014; Di Bonaventura y col., 2008).

Respecto al análisis estructural de las biopelículas, otros autores han observado que la biopelícula formada por *P. aeruginosa* (PA14) presenta zonas con mayor densidad de células, lo que ha sido descrito como un paso natural en la formación de microcolonias durante la maduración de la biopelícula (O'Toole y Kolter, 1998). De manera equivalente, solo en las cepas de proliferación lenta de *L. monocytogenes*, se observaron biopelículas con zonas de mayor densidad celular mediante el análisis de microscopía confocal. Estas agrupaciones han sido descritas como elementos dinámicos, resultando en una constante organización y desorganización de estas estructuras, las que pueden ser observadas entre los distintos días estudiados.

Al observar individualmente las biopelículas formadas por las distintas cepas de *L. monocytogenes*, se observa que LIST 2-2 (rápida) y AL 157-12 (lenta) presentan un comportamiento diferente del resto de las cepas de su grupo. Al analizar los datos sin estos ejemplares, se observa un nivel de producción de biopelícula más homogéneo dentro de cada subgrupo observando una tendencia donde las cepas del grupo lento ($>T_g$ a 8°C) presentan una mayor formación de biopelículas que las cepas pertenecientes al grupo rápido, siendo esta tendencia no significativa ($P>0,05$).

De acuerdo a los resultados de expresión génica el estudio mostró que durante la etapa de aclimatación a frío (tiempo menor a 24 horas) los niveles de expresión de los genes estudiados fueron similares en las diferentes cepas de *L. monocytogenes* (rápidas y lentas). Por el contrario, cuando las cepas estaban adaptadas a la baja temperatura (96 horas) en las cepas de proliferación rápida se observó una disminución de la expresión de los genes de flagelo, “quorum sensing” y quimiotaxis. Los resultados de la movilidad a 8°C de las cepas estudiadas fueron concordantes con los niveles de expresión de genes flagelares entre cepas rápidas y lentas adaptadas a 8°C . A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, Durack y col., 2013, realizaron un análisis de tolerancia al frío (velocidad de proliferación en frío) de tres cepas de *L. monocytogenes* y entre las más tolerantes y menos tolerantes no se observaron diferencias en su movilidad a 4°C .

Respecto a la regulación de la expresión de los genes estudiados, se observó que la expresión del represor flagelar *mogR* (figura 9E) en las cepas rápidas se ve disminuida a las 96 horas, sin embargo la expresión de los genes flagelares que son blanco de este regulador, no presentan un aumento. Para describir este comportamiento es necesario analizar la expresión del gen *gmaR*, cuyo producto génico, la proteína GmaR, actúa

como un inhibidor de la acción de MogR mediante unión de ambas proteínas formando un complejo inactivo MogR-GmaR (Kamp y Higgins, 2011). Tanto en las cepas lentas como en las rápidas, la expresión del gen *gmaR* no cambia durante la aclimatación (hasta las 24 horas), lo que coincide con la ausencia de cambios de los demás genes analizados durante la misma fase de respuesta al estrés. En cuanto a la adaptación (96 horas), se observa en las cepas rápidas una ausencia de cambio en la expresión del represor transcripcional *mogR*, mientras que el gen de su inhibidor, *gmaR*, presenta una represión de 5 veces de cambio. Esto implica que el mayor nivel de transcrito del gen *mogR* se podría relacionar con una mayor síntesis de la proteína MogR que estaría disponible para reprimir los genes flagelares, como se ve en las cepas rápidas. Por el contrario, en el grupo lento, la expresión del represor transcripcional *mogR* no varía considerablemente, al igual que la expresión de su inhibidor *gmaR*, lo que podría explicar entonces el mayor nivel de expresión de los genes flagelares respecto a lo observado en las cepas rápidas.

5 Conclusiones

- Cepas de *L. monocytogenes* con mayor nivel de expresión de proteínas flagelares presentan un mayor grado de movilidad a 8°C.
- Diferentes cepas de *L. monocytogenes* son capaces de formar biopelículas a 8°C en distintas superficies y esta capacidad es independiente de su velocidad de proliferación a 8°C.
- La represión del gen *gmaR* en cepas de *L. monocytogenes* de proliferación rápida en frío, favorece la represión de proteínas flagelares a 8°C.
- Futuros estudios estarán enfocados en establecer la relación entre la capacidad de formación de biopelículas, la virulencia de las cepas y la velocidad de proliferar en frío.

6 Bibliografia

- Alonso, A.N., Perry, K.J., Regeimbal, J.M., Regan, P.M., Higgins, D.E., 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PLoS One*. **9**(12), e113696.
- Angelidis, A.S., Smith, G.M., 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12), 7492-7498.
- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J., 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(10), 3887-3894.
- AppliedBiosystems, 2008. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
- Azizoglu, R.O., Kathariou, S., 2010. Temperature-dependent requirement for catalase in aerobic growth of *Listeria monocytogenes* F2365. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(21), 6998-7003.
- Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., Teixeira, P., 2013. Biofilm Formation among Clinical and Food Isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Microbiol.* 2013, 524975.
- Barria, C., Malecki, M., Arraiano, C.M., 2013. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*. **159**(Pt 12), 2437-2443.
- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Tsunemi, M.H., Rall, V.L.M., 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*. **35**, 386-391.
- Burgess, C.M., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knöchel, S., Lehner, A., Margas, E., Esser, S.S., Sela Saldinger, S., Tresse, O., 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* **221**, 37-55.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J., Mahon, B.E., 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg. Infect. Dis.* **19**(1), 1-9.
- CDC, 2010-2014. National *Listeria* surveillance annual summary., <http://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>.
- CDC, 2012. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado., <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>.
- CDC, 2013. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*., <http://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>.
- CDC, 2015. Foodborne Germs and Illnesses., <http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs>.
- CDC, 2016. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility., <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>.

- Chae, M.S., Schraft, H., Truelstrup Hansen, L., Mackereth, R., 2006. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.* **23**(3), 250-259.
- Chan, Y.C., Wiedmann, M., 2009. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**(3), 237-253.
- Chang, Y., Gu, W., Fischer, N., McLandsborough, L., 2012. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**(5), 2051-2062.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hebraud, M., 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2), 728-737.
- Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Aravena, A., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., Figueroa, G., González, M., Latorre, M., Reyes-Jara, A., 2016. Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature. *Front Microbiol.* **7**(229).
- Cossart, P., Lebreton, A., 2014. A trip in the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* **588**(15), 2437-2445.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A., 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J. Appl. Microbiol.* **104**(6), 1552-1561.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6), 2950-2958.
- Doijad, S.P., Barbuddhe, S.B., Garg, S., Poharkar, K.V., Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Rawool, D.B., Chakraborty, T., 2015. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS One.* **10**(9), e0137046.
- Dons, L., Eriksson, E., Jin, Y., Rottenberg, M.E., Kristensson, K., Larsen, C.N., Bresciani, J., Olsen, J.E., 2004. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infect. Immun.* **72**(6), 3237-3244.
- Durack, J., Ross, T., Bowman, J.P., 2013. Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms. *PLoS One.* **8**(9), e73603.
- Ermolenko, D.N., Makhatadze, G.I., 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(11), 1902-1913.
- Foerster, C., Vidal, L., Troncoso, M., Figueroa, G., 2012. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev. Argent. Microbiol.* **44**(3), 195-200.

- Garénaux, A., Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Federighi, M., de Jonge, R., 2009. Role of oxidative stress in *C. jejuni* inactivation during freeze-thaw treatment. *Curr. Microbiol.* **58**(2), 134-138.
- Gasarov, U., Hughes, D., Hansbro, P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**(5), 851-875.
- Gianotti, A., Serrazanetti, D., Sado Kamdem, S., Guerzoni, M.E., 2008. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **123**(1-2), 9-17.
- Goulter, R.M., Gentle, I.R., Dykes, G.A., 2009. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**(1), 1-7.
- Gripenland, J., Netterling, S., Loh, E., Tiensuu, T., Toledo-Arana, A., Johansson, J., 2010. RNAs: regulators of bacterial virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(12), 857-866.
- Gründling, A., Burrack, L.S., Bouwer, H.G., Higgins, D.E., 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(33), 12318-12323.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(2), 95-108.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**(3), 228-233.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* **410**(6832), 1099-1103.
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell. Biol.* **14**(11):648-656.
- Herrera, J.J., Cabo, M.L., González, A., Pazos, I., Pastoriza, L., 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiol.* **24**(6), 585-591.
- Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W., Kalbitzer, H.R., 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**(12), 1457-1470.
- Hurme, R., Rhen, M., 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation--what it all boils down to. *Mol. Microbiol.* **30**(1), 1-6.
- Kadam, S.R., den Besten, H.M., van der Veen, S., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T., 2013. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.* **165**(3), 259-264.
- Kamp, H.D., Higgins, D.E., 2009. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the GmaR anti-repressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **74**(2), 421-435.

- Kamp, H.D., Higgins, D.E., 2011. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* **7**(8), e1002153.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* **23**(10), 1289-1291.
- Kortmann, J., Narberhaus, F., 2012. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**(4), 255-265.
- Köseoğlu, V.K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z.T., Lehmann, T.E., Miller, K.W., Gomelsky, M., 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Mol. Microbiol.* **96**(4), 728-743.
- Lee, J.J., Lee, G., Shin, J.H., 2014. $\sigma(B)$ affects biofilm formation under the dual stress conditions imposed by adding salt and low temperature in *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol.* **52**(10), 849-855.
- Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**(12), 4418-4424.
- Lianou, A., Sofos, J.N., 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.* **9**, 2172-2198.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* **25**(4), 402-408.
- Luo, Q., Shang, J., Feng, X., Guo, X., Zhang, L., Zhou, Q., 2013. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*. *Curr. Microbiol.* **67**(3), 372-378.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**(1), 34-39.
- Moltz, A.G., Martin, S.E., 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J. Food Prot.* **68**(1), 92-97.
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapiere, L., Gaggero, A., R.M., V., Vidal, M., 2015. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front. Microbiol.* **6**(384).
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L., Balsa-Canto, E., 2014. Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* **182-183**, 26-36.
- Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P., 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **150**(1), 12-24.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49-79.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**(3), 295-304.
- Pan, Y., Breidt, F.J., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(12), 7711-7717.

- Park, J.I., Grant, C.M., Davies, M.J., Dawes, I.W., 1998. The cytoplasmic Cu,Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *J. Biol. Chem.* **273**(36), 22921-22928.
- Peel, M., Donachie, W., Shaw, A., 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* **134**(8), 2171-2178.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M., 2011. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.* **13**(4), 835-850.
- Riedel, C.U., Monk, I.R., Casey, P.G., Waidmann, M.S., Gahan, C.G., Hill, C., 2009. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **71**(5), 1177-1189.
- Rivas, L., Fegan, N., Dykes, G.A., 2007. Attachment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* **115**(1), 89-94.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**(1), 7-15.
- Sela, S., Frank, S., Belausov, E., Pinto, R., 2006. A Mutation in the luxS gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(8), 5653-5658.
- Serra, D.O., Richter, A.M., Klauck, G., Mika, F., Hengge, R., 2013. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio.* **4**(2), e00103-00113.
- Shen, A., Higgins, D.E., 2006. The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* **2**(4), e30.
- Taboada, B., Ciria, R., Martinez-Guerrero, C.E., Merino, E., 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res.* **40**(Database issue), 627-631.
- Tasara, T., Stephan, R., 2006. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J. Food Prot.* **69**(6), 1473-1484.
- Tresse, O., Lebreton, V., Garmyn, D., Dussurget, O., 2009. The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* **55**(2), 189-196.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**(15), e115.
- van Schaik, W., Abee, T., 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**(2), 218-224.

Weiler, C., Ifland, A., Naumann, A., Kleta, S., Noll, M., 2013. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* **161**(2), 61-68.