



Universidad de Chile
Facultad de ciencias
Escuela de pregrado

“Evaluación de estrés por frío y cobre durante la formación de biopelícula 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

FRANCISCA ENYS CYMBRON MELLA

Director del Seminario de Título:

Dra. Angélica Sofía Reyes Jara

Patrocinante:

Dr. Francisco Chávez

Diciembre 2021

Santiago – Chile

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago el 14 de diciembre de 1996. A los 3 años nos fuimos a vivir con mi mamá a La Serena. Desde pequeña siempre fui muy curiosa e inquieta, como hija única usaba solo mi imaginación para entretenerme muchas horas. A los 4 años entré al Colegio San Joaquín. Estuve hasta la mitad 4° básico en este colegio, ya que el segundo semestre me cambié al Colegio Alemán de La Serena. Durante mi vida escolar me caractericé por tener buenas notas en el colegio y baja asistencia. Esto debido a que era parte de cuanta actividad extra-programática hubiera. Comencé practicando volleyball, desde 4° básico hasta 2° medio estuve en el equipo del colegio. También fui parte de la orquesta del colegio tocando el violín desde 5° básico hasta 1° medio. En octavo descubrí el deporte que práctico hasta hoy en día, el lanzamiento de jabalina. Durante mis últimos años escolares descubrí mi pasión por la ciencia, y desde ese momento supe lo que quería estudiar. En 2015 ingresé a estudiar a la Universidad de Chile y para mí fue un choque sumamente grande; ciudad grande, metro, lacrimógenas, paros y muchas cosas que mi vida en región no me había preparado. Pero la universidad me dio otras cosas también. Me entregó la oportunidad de seguir practicando deporte y de competir a nivel nacional, en conjunto con poder conocer a personas maravillosas que se van a quedar por el resto de mi vida, convirtiéndose en una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida.

DEDICATORIA

A mi mamá y la familia Mella-Piña, porque todo
lo que he logrado y lo que soy
es gracias a ustedes

AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta etapa tan maravillosa y gratificante de mi vida quiero dar un profundo agradecimiento a todos quienes han sido parte de esta experiencia. En especial agradecer a mi mamá por ser un constante apoyo, enseñarme lo que es la dedicación, la constancia y la rigurosidad. A mi abuela Enis quien me acogió en estos años de universidad. A Mathias por ser un apoyo emocional y un pilar fundamental en los últimos años de universidad. A las amigas que me dio la Universidad Constanza, María José y Sofía por hacer mucho más divertida y amena la carga académica. Haber compartido con ustedes hizo que la universidad valiera mucho más la pena y se llenara de anécdotas inolvidables. A toda la selección de Atletismo de la U. de Chile, en especial a Amelia, Poulette, Daniela, Constanza y Tamara por todos los momentos compartidos, los viajes, cumpleaños y buena onda. A la Dra. Angélica Reyes por su paciencia, disposición y dedicación, porque me guio y enseñó muchas cosas en todos estos años en su laboratorio. A Anita y Ángel por su constante apoyo y guía en los experimentos, y a todo el equipo del laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA, por la buena onda, los consejos y ayuda, por hacer más amenos los meses de trabajo en pandemia.

Mi gratitud también a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por haberme aceptado y también permitirme seguir entrenando y compitiendo en el deporte que más disfruto durante todo mi paso por la universidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	10
MATERIALES	11
Reactivos	11
Buffer y soluciones	11
Aislados y genomas	11
Equipos y Softwares	12
Otros	12
MÉTODOS	13
1. Diseño experimental	13
2. Búsqueda bibliográfica de genes relacionado a la formación de biopelícula	13
3. Análisis de genomas de <i>L. monocytogenes</i>	14

3.1 Identificación de genes relacionados a biopelículas en genomas de <i>L. monocytogenes</i>	15
4. Condiciones de cultivo	17
5. Ensayos de formación de biopelículas en <i>L. monocytogenes</i>	17
6. Extracción de RNA desde biopelículas	18
6.1 Selección de genes y diseño de partidores	20
7. Análisis estadísticos	20
RESULTADOS	21
1. Revisión bibliográfica para la identificación de genes de biopelículas en <i>L. monocytogenes</i>	21
2. Evaluación de la conservación de genes relacionados a la formación de biopelículas en genomas de <i>L. monocytogenes</i> .	24
2.1 Identificación de genes de biopelículas en aislados de <i>L. monocytogenes</i>	26
3. Formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	29
3.1 Evaluación de formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	29
4. Establecimiento de protocolo de extracción de RNA desde biopelícula	33
5. Diseño de partidores	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
MATERIAL COMPLEMENTARIO	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genes directamente relacionados a la formación de biopelículas en <i>L. monocytogenes</i> (n=20).	23
Tabla S1: Aislados de <i>L. monocytogenes</i> utilizados en este estudio.	56
Tabla S2: Lista de genes indirectamente relacionados a la formación de biopelículas (n=99) de <i>L. monocytogenes</i> encontrados en la literatura.	57
Tabla S3: Características genéticas de los aislados seleccionados para análisis de formación de biopelículas.	64
Tabla S4: Valores de pureza y concentración de extracciones de RNA realizadas a biopelículas de Imo115-1 y Imo221-1.	67
Tabla S5: Lista de partidores diseñados para futuros análisis de expresión genética en biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> .	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrategia experimental empleadas en el desarrollo de esta tesis.	13
Figura 2: Diagrama de flujo de estudios identificados, excluidos e incluidos en la búsqueda bibliográfica.	22
Figura 3: Clasificación de los genes relacionados a la formación de biopelículas (n=99) por su categoría funcional COG hallados en la búsqueda bibliográfica.	24
Figura 4: Distribución de genomas de aislados chilenos de <i>L. monocytogenes</i> de acuerdo a su origen de aislamiento.	25
Figura 5: Análisis filogenético de los genomas de <i>L. monocytogenes</i> (n=42).	26
Figura 6: Mapa de agrupamiento de genomas según presencia (verde) y ausencia (rojo) de los 20 genes de biopelícula en <i>L. monocytogenes</i> .	27
Figura 7: Mapa de agrupamiento de genomas según presencia (verde) y ausencia (rojo) de los 99 genes relacionados a la formación de biopelícula en <i>L. monocytogenes</i> .	28
Figura 8: Niveles de formación de biopelículas por grupos.	31
Figura 9: Análisis comparativo de la formación de biopelículas entre serogrupos de aislados de <i>L. monocytogenes</i> (n=18) en las cuatro condiciones experimentales.	33
Figura 10: Esquema que representa el ensayo de extracción de RNA desde biopelículas.	34
Figura S1: Análisis filogenético de los genomas de <i>L. monocytogenes</i> distribución por origen de aislamiento (n=422).	66

LISTADO DE ABREVIATURAS

Bf: *Biofilm*

Bp: Biopelícula

Cu: Cobre

Csp: *Cold shock proteins*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidad óptica

ETA: Enfermedad transmitida por alimentos

G: Fuerza g

hrs: Horas

Lm: *Listeria monocytogenes*

MIC: *Minimal inhibitory concentration*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MOPS: 3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

nm: Nanómetros

pb: Pares de bases

PCR: Reacción de cadena de polimerasa

PAI: Péptido autoinductor

PVC: Policloruro de vinilo

QS: *Quorum sensing*

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

SF: Suero fisiológico

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

TSA: Agar Trypticase soya

TSB: Medio de cultivo líquido Trypticase soya

TSBYE: Medio de cultivo líquido Trypticase soya con extracto de levadura

V: Volts

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno transmitido por alimentos, causante de listeriosis. *L. monocytogenes* resiste diversos factores de estrés que se utilizan en la industria de los alimentos para evitar la contaminación y proliferación bacteriana, entre estos el frío. El cobre (Cu) es un metal que posee propiedades antimicrobianas y podría ser útil para control este patógeno. Se ha reportado que cultivos de *L. monocytogenes* suplementados con concentraciones subletales de Cu reducen su velocidad de crecimiento cuando se exponen a 8°C en comparación con su crecimiento a 37°C. *L. monocytogenes* se adhiere a superficies y forma biopelículas (Bp), lo cual le permite persistir en equipamientos utilizados en la industria alimenticia. Los estudios han demostrado que existen genes clave para la formación de Bp. Objetivo: Relacionar la presencia y la respuesta transcripcional de genes asociados a la formación de biopelícula en aislados de *L. monocytogenes* con su capacidad de formar biopelícula en frío y cobre. Métodos: Se llevó a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica para identificar genes relacionados a la formación de Bp en *L. monocytogenes*. Luego, los genes identificados fueron buscados en el genoma de 422 aislados de *L. monocytogenes* proveniente de distintos orígenes de aislamiento (ambiente, clínica, alimentos y aguas) mediante el software Ridom Seqsphere+. Se analizaron los genomas según la presencia/ ausencia de los genes y se escogieron 18 aislados pertenecientes a cuatro grupos (A-D) con diferentes perfiles de genes. Se evaluó la capacidad de formación de Bp de los aislados en 4 condiciones: 37°C, 8°C, 37°C+Cu (0,5 mM) y 8°C +Cu (0,5 mM). La cantidad de Bp fue determinada luego de 48 hrs mediante el método de tinción con cristal violeta. Resultados: Se identificaron 119 genes relacionados a la formación de Bp, los cuales fueron divididos en 2 categorías: genes directamente relacionados a Bp (n=20) y genes indirectamente relacionados a la formación de Bp (n=99), cuya función

específica se relaciona con otros procesos celulares, pero que la evidencia indica que la pérdida de funcionalidad de dicha proteína afecta la formación de Bp. Los genes directamente relacionados a Bp están altamente conservados en los genomas de *L. monocytogenes*; sin embargo, la presencia de los genes indirectamente relacionados a Bp en los genomas de *L. monocytogenes* varió. Todos los aislados mostraron capacidad de formar Bp en las cuatro condiciones evaluadas. La cantidad de Bp no cambió significativamente cuando *L. monocytogenes* fue expuesta a 8°C o Cu respecto a lo observado a 37°C. Sin embargo, la exposición de *L. monocytogenes* a 8°C y Cu simultáneamente mostró un aumento en la formación de Bp en comparación con la formación de Bp a 37°C. La capacidad de formación de biopelículas, a 37°C y frente a los factores de estrés evaluados, fue independiente de la presencia de genes y la capacidad de formación de estas estructuras. Tampoco se observó una relación entre la formación de Bp y el serogrupo. Es necesario evaluar la regulación de la respuesta transcripcional de estos genes para comprender la diferencia observada en el nivel de producción de Bp en condiciones de estrés.

ABSTRACT

Background: *L. monocytogenes* is a foodborne pathogen that causes listeriosis. *Lm* resist many stresses used in food processing environments to avoid bacterial growth as low temperature. Copper (Cu) is a metal with antimicrobial properties, and it may be useful to control this pathogen. Previously has been reported that *L. monocytogenes* cultures supplemented with sublethal Cu concentrations were less viable when growing at 8°C than when cultured at 37°C. *L. monocytogenes* can adhere and form biofilms (Bf) in different materials. This determines the pathogen ability to persist in equipment and environments in the food industry. Studies have shown that there are key genes for the Bf-formation. Aims: To relate the presence of Bf-associated genes in the genome of *L. monocytogenes* isolates with their ability to form Bf in cold and copper. Methods: An exhaustive bibliographic search was performed to identify *L. monocytogenes* Bf-related genes. Then, a local database of 422 *L. monocytogenes* genomes from different sources (water, foods, food processing environments and clinical) was analyzed to identify the presence of Bf-related genes using Ridom SeqSphere+ software. *L. monocytogenes* genomes were clustered according to the presence or absence of genes and 18 isolates belonging to four groups (A-D) with different gene profiles were chosen for further assays. The Bf-forming capacity of the isolates was evaluated under the following conditions: 37°C, 8°C, 37°C+Cu (0,5 mM) and 8°C +Cu (0,5 mM). The Bf was quantified after 48 hrs using a crystal violet stain. Results: 119 genes related to the formation of Bf were identified, which were divided into 2 categories, genes directly related to Bf (n = 20) and genes indirectly related to Bf formation (n = 99) whose specific function is related to other cellular processes, but the evidence indicates that the loss of functionality the correlating protein affects the formation of Bf. Genes directly related to Bf were highly conserved in

L. monocyogenes genomes. All isolates showed the ability to form Bf under all four evaluated conditions. The Bf levels did not change significantly when *L. monocyogenes* was exposed to 8°C and Cu separately compared to the control (37 ° C). The presence of Cu at 8°C significantly increased the Bf formation reaching higher levels than 37°C. The biofilm formation capacity, at 37°C and against the evaluated stress factors, was independent of the presence of genes and the formation capacity of these structures. Neither was a observed a relationship between Bf-formation and the serogroup. It is necessary to evaluate the regulation of transcriptional response of these genes to understand the difference observed in the level of Bf production under stress conditions.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) causan una morbilidad y mortalidad importante a nivel mundial, además de ser consideradas un problema complejo para la salud pública (Jordan & McAuliffe, 2018). Anualmente los reportes indican que una de cada diez personas alrededor del mundo se enferma luego de consumir alimentos contaminados, y se producen aproximadamente 420.000 muertes al año por esta causa (Organización Mundial de la Salud, 2021)

Los agentes causantes de ETAs pueden ser de naturaleza física, química y/o biológica, donde estos últimos son los más difíciles de controlar. Los agentes biológicos incluyen bacterias, virus y parásitos (Jacobs y col., 2020).

Uno de estos microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos es *Listeria monocytogenes* (Jordan & McAuliffe, 2018). *L. monocytogenes* es una bacteria cocobacilar, Gram-positiva y ubicua, que puede contaminar alimentos, los cuales constituyen la principal vía de infección para los humanos. El cuadro clínico generado por esta bacteria recibe el nombre de listeriosis y su incidencia alcanza a 4,8 personas cada 1 millón de habitantes (CDC, 2021). En humanos la listeriosis se puede presentar como una gastroenteritis febril hasta una enfermedad invasiva severa, que afecta particularmente a poblaciones de riesgo como neonatos, mujeres embarazadas, inmunodeprimidos y personas ancianas. Las tasas de mortalidad de la listeriosis son más altas que de otros agentes biológicos causantes de ETAs y pueden llegar a valores de hasta 30 % (Buchanan y col., 2017; Lecuit y col., 2020).

Existen cuatro linajes de *L. monocytogenes* (I, II, III y IV), 15 diferentes serotipos los cuales se agrupan en cuatro serogrupos (IIa, IIb, IIc y IVb) (Liu y col., 2006; Orsi y col., 2011; Leclercq, 2011). En particular, el serotipo 4b del serogrupo IVb, está relacionado con la mayoría de los brotes de listeriosis (Paduro y col., 2019), mientras que los

serotipos 1/2a y 1/2c provenientes del serogrupo IIa y IIb respectivamente, son frecuentemente aislados de alimentos (Lomonaco y col., 2015).

En Chile, en los últimos años, se han reportado brotes ocasionados por este patógeno. Entre 2008 y 2009 fueron informados dos brotes importantes de listeriosis, donde los alimentos asociados fueron queso de cabra y embutidos y, como consecuencia, fallecieron 16 personas. La presencia de *L. monocytogenes* ha sido reportada en diferentes tipos de alimentos, principalmente en alimentos listos para el consumo (Montero y col., 2015). Estos hallazgos han causado la retirada masiva de productos desde el mercado, lo que ha generado grandes pérdidas económicas para la industria de los alimentos (CDC, 2021).

L. monocytogenes tiene la capacidad de persistir en ambientes de procesamiento de alimentos a pesar de las diferentes estrategias que usa la industria para el control de la proliferación bacteriana, tales como el frío, bajo pH y el uso frecuente de agentes de limpieza y desinfección (Fagerlund y col., 2020). *L. monocytogenes* puede adaptarse y proliferar bajo diferentes condiciones tales como altas concentraciones de sal (10%, p/v), bajas temperaturas (hasta en -0.5 °C) y un amplio rango de pH (4.7 - 9.2) (Ferreira y col., 2014). Además, puede adherirse y formar biopelículas en superficies inertes, logrando colonizar y persistir en plantas de procesamiento de alimentos (Paduro y col., 2019).

Como ya fue mencionado, una de las barreras usadas por la industria de los alimentos para controlar la aparición y proliferación de bacterias patógenas, es la baja temperatura. Sin embargo, *L. monocytogenes* es capaz de superar esta barrera y proliferar en frío debido a diversos mecanismos moleculares para la psicrotolerancia, (Hingston y col., 2019; Muchaamba y col., 2020). Algunos de los mecanismos que se activan en respuesta al frío son la modificación de la composición de los lípidos presentes en la

membrana mediante la conversión de ácidos grasos saturados en ácidos grasos insaturados por la acción de enzimas desaturasas (Chattopadhyay, 2006; Mastronicolis y col., 2006; Yoon y col., 2015); el aumento de la síntesis de proteínas de respuesta al frío (Csp), las cuales corresponden a proteínas de unión a RNA encargadas de la estabilización del mensajero (Horn y col., 2007; Song y col., 2019) y la síntesis de transportadores que facilitan la entrada de osmolitos (solutos de bajo peso molecular) que son nutrientes crioprotectores, como la glicina, carnitina, betaina, sacarosa y manitol (Angelidis, 2003; Chattopadhyay, 2006).

Previos estudios han reportado que cepas de *L. monocytogenes* presentan diferentes tasas de crecimiento al ser expuestas a bajas temperaturas (Durack y col., 2013). Además, un estudio transcripcional en cepas de rápida o lenta velocidad de crecimiento en frío mostró que otros genes se asocian a la respuesta a frío, tales como genes que codifican para proteínas que participan en motilidad, los cuales disminuyen su expresión genética en aislados de rápida velocidad de crecimiento en frío, dicho comportamiento no se observó en cepas de lenta velocidad de crecimiento (Cordero y col., 2016). Estos resultados sugieren que *L. monocytogenes* reprime su maquinaria de movilidad con el fin de enfocar su energía en los mecanismos de adaptación a bajas temperaturas, y así poder favorecer su proliferación.

Las biopelículas son definidas como comunidades tridimensionales de bacterias sésiles rodeadas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) auto producidas, como polisacáridos, proteínas, lípidos y DNA extracelular (Hemdan y col., 2019). En las biopelículas, las bacterias se comunican entre sí a través de la secreción de moléculas de señalización. Este mecanismo se conoce como *quorum sensing* (QS) y desempeña un papel clave en la formación de biopelículas. El QS ayuda a la comunidad bacteriana a equilibrar su entorno cuando la densidad de bacterias se vuelve demasiado

alta (Lu y col., 2019). El mecanismo de QS está regulado por el sistema Agr en *L. monocytogenes*. Este sistema está codificado en un operón formado por genes *agrABCD*. Cuando existe un cambio en la población bacteriana se produce, en respuesta a este cambio, una señal de transcripción del gen *agrD* que codifica un precursor de un péptido autoinductor. El gen *agrB* codifica para un procesador/exportador del péptido autoinductor cíclico (PAI). El gen *agrC* codifica un sensor-quinasa y el gen *agrA* un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes AgrC / AgrA, los cual se encarga de detectar al PAI y fosforilar AgrA para activar la producción de más PAI (Garmyn y col., 2009).

Las biopelículas se consideran un problema para la industria alimentaria, ya que los microorganismos que forman estas estructuras resisten de mejor manera los tratamientos de limpieza y desinfección y son difíciles de erradicar (Møretør, & Langsrud, 2004). Las biopelículas son heterogéneas tanto estructural, biológica y químicamente, resultando en la presencia de gradientes de nutrientes, oxígeno y otras moléculas. Por lo tanto, la capacidad de las células dentro de las biopelículas de resistir y persistir en diversos ambientes está relacionada no solo con las sustancias poliméricas extracelulares que componen la matriz, sino también con los cambios fisiológicos en las células (Miladi y col, 2013; Colagiorgi y col., 2017).

En el estado de biopelículas, *L. monocytogenes* es capaz de tolerar mayores concentraciones de agentes sanitizantes, lo que se asocia a su persistencia en ambientes de procesamiento de alimentos (Yoon y col., 2015; Fagerlund y col. 2017; Oxaran y col., 2018; Skowron y col., 2018).

La relación entre las biopelículas y la persistencia del patógeno en la industria de los alimentos hace relevante conocer los mecanismos moleculares detrás de esta forma de vida. Diversos estudios (Lemon y col., 2010; Garmyn y col., 2012; Salazar y col., 2013; Wassinger y col., 2013) han evaluado la importancia de la presencia de algunos genes (*prfA*, *agr*, *cpr/fnr*) en los procesos de adhesión y formación de biopelículas.

En un estudio de Luo y col. (2013) se comparó la expresión global de *L. monocytogenes* en estado planctónico versus biopelículas a 37°C. Los resultados indicaron que el 22% de los genes cambiaron su expresión en su transición desde planctónico al estado de biopelícula (Luo y col., 2013). Se observó que los genes relacionados con la motilidad y la quimiotaxis disminuyeron su expresión en biopelículas al compararlos con la expresión en bacterias planctónicas. Por el contrario, el estudio describió que se incrementó la expresión de los genes de respuesta al estrés *hrcA* y *dnaA*, lo que sugiere que estos genes son necesarios para la formación de biopelículas en *L. monocytogenes* (Luo y col., 2013). Otras funciones celulares reguladas durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* son la biosíntesis de la pared celular, el metabolismo y las proteínas asociadas con la superficie celular (Piercey y col., 2016; Lee y col., 2019; Santos y col., 2019). Beloin y Ghigo (2005), postularon que el entorno de la biopelícula en sí mismo podría activar varios mecanismos de respuesta al estrés a través de diferentes vías reguladoras, y otros estudios demostraron que la formación de biopelículas activa elementos de estrés como la superóxido dismutasa SOD, genes antioxidantes (*kat*), reguladores de estrés (*perR* y *sigB*) y el gen de reparación del ADN *recA* (Suo y col., 2012). Además, durante el desarrollo de la biopelícula, ciertas proteínas tienen una regulación positiva, como la piruvato deshidrogenasa, las proteínas ribosomales 30S (YvyD y RpsB), proteínas sensora (CysK), la 6-fosfofructoquinasa, superóxido dismutasa, proteínas reparadora del ADN (RecO) y proteínas de inicio de la división

celular (DivIVA), las cuales son importantes en la respuesta a estrés, metabolismo de los carbohidratos, reparación del ADN, multiplicación celular y regulación de *quorum sensing* (da Silva y col., 2013; Oloketuyi, 2017).

La construcción de una biblioteca de mutagénesis con el transposón Himar1 *mariner*, permitió identificar 38 genes necesarios para la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* entre ellos genes de motilidad flagelar (*fliG*, *flaA*, *flgK*, *fliI*, *motA*). Añadido a lo anterior, dos loci genéticos nuevos fueron identificados como importantes para la formación de biopelículas, *dltABCD* y *phoPR*. La mutación en los locus *dltA* y *dltB*, indican que *L. monocytogenes* requiere D-alanilación de ácidos lipoteicoicos extracelulares para mantener la carga en la superficie y permitir que se adhiera a superficies abióticas. (Alonso y col., 2014). El operón *phoPR* codifica para un sistema de dos componentes sensor de fosfato. Se ha demostrado que bacterias Gram-positivas y Gram-negativas utilizan sistemas de dos componentes sensores de fosfato para regular la formación de biopelículas (Monds y col., 2001; Kocan y col., 2006; Sun y col., 2009), esto sugiere que *L. monocytogenes* posee también un sistema de dos componentes sensores de fosfato para regular la formación de biopelículas (Alonso y col., 2014).

La información apunta a que los genes que influyen en la formación de biopelículas se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos que están directamente relacionados en procesos de formación de biopelículas, es decir, proteínas que polimerizan matriz extracelular y se involucran en *quorum sensing*. Por otro lado, el segundo grupo de genes tiene una relación indirecta en la formación de biopelículas, es decir, su función específica se relaciona con otros mecanismos o procesos celulares: sin embargo, existen estudios que han reportado que la pérdida de funcionalidad de dicha proteína afecta la formación de biopelículas.

Diversos estudios señalan que la capacidad de formar biopelículas cambia entre cada cepa (Lee y col., 2019; Bai y col., 2021). Algunos autores reportaron una relación entre la capacidad de formar biopelículas y el serotipo de la cepa; se observó una mayor formación de biopelículas en las cepas del serogrupo IIa en comparación con las cepas del serogrupo IVb (Borucki y col., 2003). Sin embargo, otros estudios no han identificado una relación entre el serogrupo y la cantidad de biopelícula formada (Harvey y col., 2007; Di Bonaventura y col., 2008; Pan y col., 2010)

La capacidad de formación de biopelículas también varía según la temperatura en que estas se desarrollan (Colagiorgi y col., 2017; Lee & Wang, 2020). Son pocos los estudios que han evaluado la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en frío, entre ellos Di Bonaventura y colaboradores (2008), analizó la formación de biopelículas de 44 aislados de *L. monocytogenes* en diferentes superficies a cuatro temperaturas (4, 12, 22 y 37°C) por 24 hrs. Se observó una organización compleja de las biopelículas de *L. monocytogenes* a 22 y 37°C en términos de número de células y SPE producidas, mientras que a 4 y 12°C se observó una biopelícula más simple que estaba formada por un grupo escaso de células y presentaba menor capacidad de formación de SPE.

Un estudio que evaluó la cantidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en frío (4°C), demostró que las células sometidas a un shock de frío (estrés) presentaron una mayor capacidad de formación de biopelículas que las cepas previamente adaptadas a frío (Lee y col., 2017).

Además, se ha evaluado el rol de los genes *csp* (que codifican las proteínas Csp) en la formación de biopelículas. *L. monocytogenes* mutantes para el gen *cspA* ($\Delta cspA$) disminuyeron significativamente su formación de biopelícula a 15°C en relación con la cepa silvestre (Kragh y col., 2020).

Dado que *L. monocytogenes* puede superar las barreras que la industria de los alimentos usadas para su control es necesario evaluar otras estrategias para evitar la persistencia de este patógeno transmitido por los alimentos. Al respecto, en 2008 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos reconoció las propiedades del cobre como un agente antimicrobiano (Prather, 2008). En bacterias, el cobre es un micronutriente requerido como cofactor de enzimas (Giachino & Waldron, 2020). Es un metal esencial para el metabolismo celular, no obstante, sus niveles deben estar controlados por sistemas biológicos debido a que altos niveles son tóxicos para la célula (Reyes-Jara y col., 2010; Giachino & Waldron, 2020).

Algunos reportes muestran que el cobre, además de regular la expresión de elementos relacionados a la homeostasis del cobre, también puede modificar la expresión de genes de virulencia, activar genes involucrados en la respuesta general de estrés, inhibir la biosíntesis de nucleótidos y reducir la formación de biopelículas. (Lu y col., 2013; Quesille-Villalobos y col., 2019).

Estudios de la exposición de *L. monocytogenes* a frío y cobre en su forma de vida planctónica han demostrado que el frío potencia la acción antimicrobiana del cobre, haciendo el uso de ambos agentes mucho más efectivos al momento de reducir la proliferación bacteriana que cada uno por sí solos (Quesille-Villalobos y col., 2019). Además, se investigó la respuesta transcripcional global de *L. monocytogenes* en estado planctónico expuesta a 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 8° y 37° C y se observó que *L. monocytogenes* disminuye la expresión de genes de metabolismo en respuesta al cobre, esta reducción es mayor a 8°C que a 37°C. Las vías metabólicas más afectadas fueron las de síntesis de carbohidratos, lípidos y nucleótidos (Quesille-Villalobos y col., 2019). Como se explicó anteriormente, el cobre tiene un efecto en la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* planctónica a bajas temperatura. Sin embargo, no hay evidencia

sobre el efecto del cobre en la capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas. Asimismo, no se conoce el efecto de ambos estresores en la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* formando biopelículas. En el presente trabajo se identificaron genes relacionados a la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* descritos en la literatura y se evaluó la conservación de estos genes en 422 genomas de *L. monocytogenes* de aislados chilenos. Además, se cuantificó la formación de biopelículas de distintos aislados de *L. monocytogenes* seleccionadas en base a la presencia de genes relacionados a biopelículas bajo dos condiciones de estrés frío y cobre. Se estableció si la presencia de estos genes se relaciona con la capacidad de formación de biopelículas de cada aislado en condiciones de estrés. Por último, se puso a punto un protocolo para la obtención de RNA desde biopelículas con el fin de evaluar la expresión de genes seleccionados en este estado de biopelículas y su respuesta al estrés.

Hipótesis

- La capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* bajo condiciones de estrés está determinada por la presencia y mayor expresión de genes relacionados a la formación de biopelículas.

Objetivo General

Relacionar la presencia y la respuesta transcripcional de genes asociados a la formación de biopelícula en aislados de *L. monocytogenes* con su capacidad de formar biopelícula en frío y cobre.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar la presencia de genes relacionados a biopelículas en aislados de *L. monocytogenes* provenientes de diferentes orígenes.
- 2) Determinar la capacidad de formación de biopelículas de aislados de *L. monocytogenes* en frío y cobre.
- 3) Relacionar la presencia de genes y la capacidad de formación de biopelículas de aislados de *L. monocytogenes* en frío y cobre
- 4) Evaluar la expresión de genes asociados a formación de biopelículas en *L. monocytogenes* con diferentes capacidades de formación de biopelícula en frío y cobre.

MATERIALES

1. Reactivos

Agua libre de metales; Agua libre de nucleasas (46-000-CV, Corning cellgro) ; Agarosa (Fermelo SA); Cristal violeta (Cas-No:548-62-9); EDTA(Merck); Dietil pirocarbonato (SC-202574,Santa Cruz biotechnology inc.); Etanol (107017,Merck); Extracto de levadura (Benckton, Dickinson and Company); Formaldehído (BM-0770, Winkler); Isopropanol (109634, Merck); Lisozima muramidasa (L9200, Fermelo Biotec); Mops 10x (BM-1220, Winkler); NaCl (106404, Merck); NucleoZol (740404.200, Macherey-Nagel); Palcam agar (254539, Becton, Dickinson and Company); Tris base (Merck); TSA (BA-256665,Becton, Dickinson and Company); TSB (BA-257107,Becton, Dickinson and Company); Safe view Plus (Fermelo Biotec);

2. *Buffer* y Soluciones

Buffer de carga gel de integridad (21161, Intron Biotechnology); *Buffer* TE 1x (10mM Tris, 1mM EDTA); Buffer Tris 1x (10mM Tris-HCl, pH 7,5); Cristal violeta (0,5% p/v); Suero fisiológico (0,9% p/v NaCl); TSAYE (Trypticase soy agar 0,6% p/v yeast extract); TSBYE (Trypticase soy broth 0,6% p/v yeast extract); TSBYE CuSO₄ (0,5 mM de CuSO₄x 5H₂O).

3. Aislados y genomas de *L. monocytogenes*

Los aislados de *L. monocytogenes* (n=18) utilizados en este estudio son parte de la colección de bacterias disponible en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA. Los genomas de dichos aislados fueron secuenciados y anotados. Los aislados utilizados en este estudio y sus características genotípicas están resumidos en la Tabla S1.

4. Equipos y Softwares

Dentro de los equipos utilizados se encuentran: Autoclave (Biomedic); Centrífuga (Heraeus megafuge 8R, Thermo scientific); Espectrofotómetro (Mundolab, WPA biowave DNA); *Incubating shaker* (LabTech); Incubadora de laboratorio (Inucell), Lector de placas (Tecan); Thermoblock (Sahara 320 Dry Bath, ROCKER). Además se utilizaron los siguientes softwares: Ridom Seqsphere+ microbial software (<https://www.ridom.de/seqsphere/features/index.shtml>); *CSI Phylogeny* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny-1.2/>); *Database of Clusters of Orthologous Genes* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>); *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>); *Interactive Heat Map Builder* (<https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/>); *Magellan TM* (<https://lifesciences.tecan.com/software-magellan>); *NCBI gene database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>); *FigTree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>); *Primer-BLAST de NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); *Reverse complement* (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html); *RStudio* (<https://www.rstudio.com/>)

5. Otros

Cubeta de cuarzo; Bisturí; Jeringa hipodérmica estéril 20 mL (Medicaltek); Pipetas de 10 mL; Placas de 24 pocillos (TCP011024, Guangzhou Jet Bio-Filtration Co.); Placas petri 10 x1,5 cm (Nest Biotechnology, Ltda.); Tubos de 15mL (CFT011150, Guangzhou Jet Bio-Filtration Co.I).

MÉTODOS

1. Diseño experimental

En la Figura 1 se presenta de manera gráfica el diseño experimental realizado para llevar a cabo esta investigación.

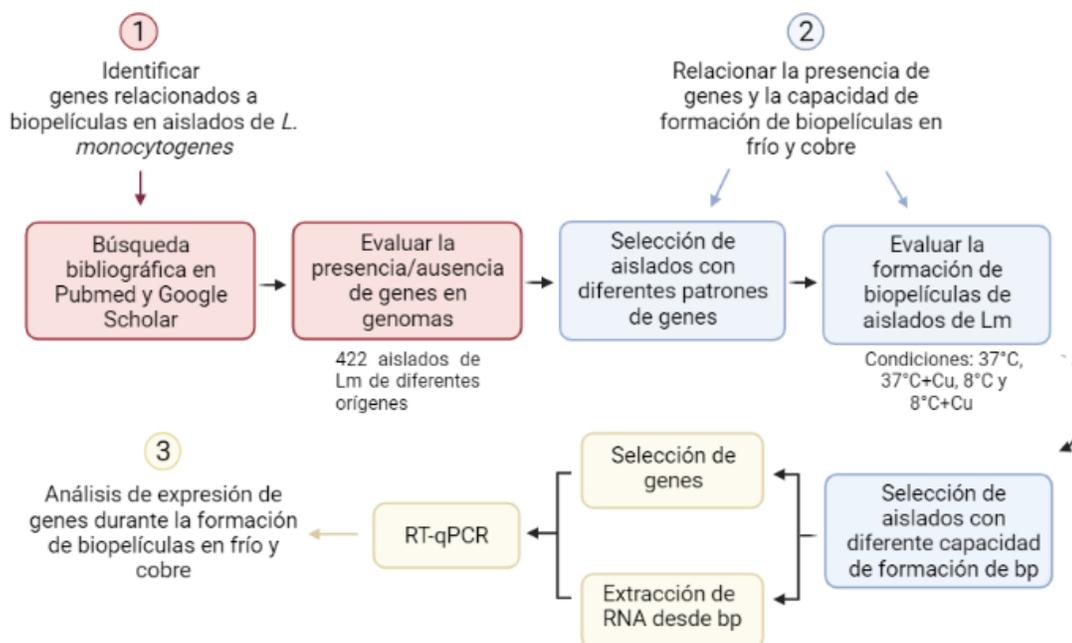


Figura 1. Estrategia experimental empleada en el desarrollo de esta tesis. Esquema creado con BioRender.com. (Lm: *L. monocytogenes*, bp: biopelículas).

2. Búsqueda bibliográfica de genes relacionados a la formación de biopelícula

Se realizó una búsqueda bibliográfica de investigaciones que presentaran resultados de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* y el estudio de los genes relacionados y ensayos de expresión génica. Para ellos se utilizaron las bases de datos *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>) y *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se usaron las siguientes palabras claves y términos: “*Listeria monocytogenes* and biofilm”, “Biofilm genes of *L. monocytogenes*” y “biofilm mechanism *L. monocytogenes*”. Se

consultaron los estudios publicados entre el 1 de enero de 2000 y el 30 de marzo de 2021. Los genes identificados se clasificaron en dos categorías: aquellos genes que tienen un rol directo en la formación de biopelículas, debido a que su función proteica se relaciona con formación de matriz polimérica extracelular, adhesión a estructuras o *quorum sensing* y aquellos genes que se relacionan de manera indirecta en la formación de biopelículas, es decir, genes cuya función proteica está involucrada en otros procesos celulares, pero que, sin embargo, la pérdida de función de estos genes genera un fenotipo de menor formación de biopelículas.

Posteriormente los genes identificados se analizaron según su categoría COG (Cluster of orthologous groups) de acuerdo a la base de datos de “*Clusters of Orthologous Genes*” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>). Las secuencias nucleotídicas de cada gen fueron descargadas desde la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y registradas en formato fasta.

3. Análisis de genomas de *L. monocytogenes*

Para la realización de esta tesis se tuvo acceso a una base de datos de 422 genomas de *L. monocytogenes* provenientes de diversas localidades chilenas y de diferentes matrices alimentarias, los cuales estaban previamente secuenciados y anotados. Para caracterizar los genomas de *L. monocytogenes* se realizó análisis filogenético de los aislados en base a la localización de SNP en el core genome. En primer lugar, se utilizó el programa CSI phylogeny 1.2. (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny-1.2/>) disponible en el servidor Center of Genomic Epidemiology para identificar polimorfismos de un solo nucleótido en los genomas de *L. monocytogenes*. Para ello se cargaron los archivos de secuenciación de 422 genomas de *L. monocytogenes* en el servidor y se

dejaron los parámetros de análisis por defecto (Select min. depth at SNP positions: 10x, Select min. relative depth at SNP positions: 10%, Select minimum distance between SNPs (prune): 10bp., Select min. SNP quality: 30, Select min. read mapping quality: 25, Select min. Z-score: 1.96). A continuación, a partir de los SNPs en el programa Mega11 (Tamura y col., 2021; <https://www.megasoftware.net/>) se construyó un dendograma con el método de Neighbour-joining Tree (Saitou & Nei, 1987). Para este análisis se utilizaron los siguientes parámetros: Test of phylogeny: Bootstrap Method (Felsenstein, 1985); No. of bootstrap replications 500; Substitution Type: Nucleotide; Model/Method: Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980).

3.1 Identificación de genes relacionados a biopelículas en genomas de *L. monocytogenes*.

Para identificar la presencia de genes relacionados a la formación de biopelículas en los 422 genomas de *L. monocytogenes* se utilizó la herramienta cgMLST (llamada “MLST+” en el SeqSphere+ software [Ridom GmbH, Münster, Germany] (<https://www.ridom.de/seqsphere/features/index.shtml>)). Se usó la función MLST+ target definer (version 1.1) para definir las secuencias de referencia con las cuales se compararon los genomas. Previamente, se buscaron los genes identificados en la cepa *L. monocytogenes* EGD-e mediante la herramienta BLAST de NCBI. Esta cepa presentó más de un 98% de los genes por los que se eligió la cepa EDG-e (GCA_000196035.1, fecha 31 mayo de 2021) como genoma de referencia. Los genes que no estaban presentes en el genoma de referencia fueron agregados en formato fasta por separado en la opción “query genome”, conformando así el genoma target. Los demás parámetros fueron dejados por defecto: “minimum length filter” que descarta todos los genes más cortos que 25 pb, un “start codon filter” que descarta todos los genes que no contienen

codón de inicio al principio del gen; un “stop codon filter” que descarta todos los genes que no contienen codón de término, más de un codón de término o si el codón de término no está al final del gen; un “homologous gene filter” que descarta todos los genes con fragmentos que ocurren en múltiples copias dentro de un genoma (con identidad 90% y más de > 100 pb de superposición; y un “gene overlap filter” que descarta el gen más corto del esquema cgMLST si los dos genes afectados se superponen > 4 pb. Una vez creado el esquema cgMLST se cargaron los 422 genomas y se compararon sus secuencias con el genoma target. Finalmente, se obtuvo una matriz comparativa donde si el gen estaba presente aparecía un número de alelo y si no estaba presente mostraba: (? (not found)). Se modificó esta matriz dejando los valores “1” para los genes presentes en los genomas y “0” para los ausentes.

Se formaron dos matrices con los datos obtenidos del análisis de Ridom, la primera matriz contenía los datos de genes directamente relacionados a biopelículas y la segunda contenía los datos de los genes indirectamente relacionados a la formación de biopelículas en *L. monocytogenes*. Con las matrices obtenidas se confeccionaron dos mapas de agrupamiento de genomas según la presencia o ausencia de los genes involucrados en la formación de biopelículas en los genomas de *L. monocytogenes*. El análisis se realizó en el sitio web Interactive Heat Map Builder (Ryan y col., 2020; <https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/>). Para ello se cargó el archivo excel que contenía la matriz modificada obtenida con el *software* Ridom. Se seleccionaron los siguientes parámetros para la construcción del mapa: “Missing/Invalid data” por defecto (N/A); “Clustering” para el agrupamiento de columnas y filas (“Hierarchical Clustering” Distance metric: euclidean; agglomeration: complete linkage). Gráficamente la presencia del gen (1) se representó con el color verde y ausencia (0) con rojo. Además, se agregó

el parámetro “Covariant Bar” que proporcionó una barra de covariante en las filas agrupando jerárquicamente los genomas.

4. Condiciones de cultivo.

Los aislados de *L. monocytogenes* seleccionados (n=18) se recuperaron del almacenamiento a -80°C en placas de agar de Tripticasa soya suplementado con extracto de levadura (TSAYE) y fueron confirmados en agar Palcam, medio selectivo para *L. monocytogenes*. Una colonia de cada aislado fue seleccionada y cultivada con agitación (160 rpm) a 37°C en caldo de cultivo Tripticasa soya con extracto de levadura (TSBYE) durante toda la noche. Para los ensayos realizados a baja temperatura (8°C) las bacterias fueron previamente adaptadas a frío en un proceso de dos pasos; el primer día una colonia de cada aislado fue cultivada con agitación (160 rpm) a 37°C en medio de cultivo TSBYE durante toda la noche. El siguiente día, a partir de este cultivo se inoculó un caldo fresco TSBYE previamente enfriado (8°C) y se ajustó a una DO_{600nm} de 0,05. El cultivo se incubó a 8°C/160 rpm por 72h. Estos aislados adaptados a frío fueron usados para iniciar los ensayos de biopelículas. Los ensayos con cobre se realizaron suplementando el medio de cultivo TSBYE con CuSO₄ x 5H₂O a una concentración final de 0,5 mM, la cual se define como sub-inhibitoria para *L. monocytogenes* ya que es equivalente a 1/8 de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) (Quesille-Villalobos y col., 2019).

5. Ensayos de formación de biopelículas en *L. monocytogenes*

La capacidad de los aislados de *L. monocytogenes* de formar biopelículas fue evaluada en cuatro condiciones; 37°C, 37°C + cobre, 8°C y 8°C + cobre. Para este estudio se

utilizó la metodología de ensayo de microplacas de acuerdo con el trabajo de Zhu y colaboradores (Zhu y col., 2010) con algunas modificaciones. En breve, cada cepa fue cultivada en 5mL de TSBYE a 37°C durante toda la noche para los ensayos de 37°C. Para los ensayos a 8°C se utilizó un inóculo proveniente de un cultivo previamente adaptado como se mencionó anteriormente. Adicionalmente, para los ensayos con cobre el medio de cultivo TSBYE fue suplementado con 0,5 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Los diferentes medios fueron ajustados hasta obtener una densidad óptica de 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) inicial de 0,1. Los ensayos fueron realizados en placas de PVC de 24 pocillos, se inoculó 1 mL de cultivo ajustado en cada pocillo y se incubaron por 48 hrs a las respectivas temperaturas. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el contenido de las placas. Luego estas fueron lavadas 2 veces con suero fisiológico (SF) estéril y las placas se dejaron secar semi tapadas en el incubador a 37°C por 20 minutos. Una vez secas, se añadieron 200 μL de Cristal Violeta (0,5%) y se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las placas fueron invertidas para remover el cristal violeta y lavadas tres veces con SF. Las biopelículas fueron resuspendidas añadiendo 500 μL de etanol al 95% v/v. Finalmente, la cantidad de biopelícula formada se cuantificó midiendo la DO a 595 nm en un lector de microplacas (Tecan Trading AG, Switzerland). Cada aislado fue evaluado por triplicado en cada una de las 4 condiciones, además se realizaron 3 réplicas biológicas por condición.

6. Extracción RNA desde biopelículas

Para extraer el RNA desde las biopelículas se tomó como base el protocolo utilizado en la investigación de Qin Luo y colaboradores (2013) con algunas modificaciones. Debido a la poca biomasa obtenida en los cultivos de 24 pocillos para lograr una extracción

eficiente se realizaron ensayos de formación de biopelícula en placas petri de 10 cm de diámetro y 1,5 cm de profundidad (Nest Biotechnology, Ltda). Siguiendo el mismo procedimiento de formación de biopelículas mencionado anteriormente se adaptaron los volúmenes de trabajo. Para ello, se inocularon 20 mL de cultivo ajustado (DO_{600nm} a 0,1) en las placas petri, las que fueron incubadas por 48 hrs a las diferentes temperaturas ($8^{\circ}C$ y $37^{\circ}C$). se descartó el medio. Después del tiempo de incubación, se lavaron las placas con *buffer* Tris (pH 7,4) para remover células débilmente adheridas. Las células unidas a la superficie se rasparon cuidadosamente con una navaja estéril y fueron depositadas en un tubo con 10 mL de *buffer* Tris. Luego, se centrifugaron a 12000 rpm por 2 minutos. A partir del pellet de bacterias se extrajo el RNA. Para ello se adicionaron 200 μ L de lisozima (20 mg/mL *buffer* 1X TE) y se incubó a $37^{\circ}C$ en termobloque por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 500 μ l de nucleoZOL y se agitó con vortex por 15 segundos. Las muestras fueron incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego ser centrifugadas 15 minutos a 12000 g. Se recolectaron 500 μ L de sobrenadante y este se mezcló con 500 μ L de isopropanol al 100 % en un nuevo tubo eppendorf. Se incubaron los tubos 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 minutos 12000 g. Luego se adicionaron 500 μ L de etanol al 75 % y se centrifugó por 3 minutos a 8000 g, se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento una vez más. Finalmente, el RNA se resuspendió con 50 μ L de agua libre de nucleasas. Mediante espectrofotometría se determinó la concentración de RNA [ng/ μ L]. La pureza del RNA se evaluó determinando las razones de absorbancia A260/A280 y A260/A230. La integridad del RNA se evaluó mediante visualización directa en gel de electroforesis (agarosa al 1% p/v teñido con Safe view, corrido en *buffer* MOPS 1x a 75V por 1 hr).

6.1 Selección de genes y diseño de partidores

Se seleccionaron 15 genes para evaluar la respuesta transcripcional de biopelículas *L. monocytogenes* frente a diversas condiciones de crecimiento. Los criterios utilizados para la selección de genes fueron: que estuvieran en el listado de genes indirectamente relacionados a la formación de biopelículas; que estuvieran presentes en los genomas de los aislados (n=18) de *L. monocytogenes*; y que en estudios previos se han observado cambios de expresión de estos genes durante la formación de biopelículas de más de 1,5 veces log₂ (Chang y col., 2011; Alonso y col., 2014; Pieta y col, 2014; Assisi y col., 2020). Se diseñaron partidores utilizando la herramienta Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se introdujo la secuencia nucleotídica en formato fasta de cada gen, seleccionando los parámetros de tamaño del amplicón de entre 100 y 500 pb, temperatura de melting de entre 58 y 64 con máximo 4 grados de diferencia. Se seleccionaron los genes *rpoA* (Luo y col., 2013), *rpoB* y *ldh* (Piveteau y col., 2011) como genes *housekeeping*.

7. Análisis estadístico

El análisis de significancia de los ensayos de formación de biopelículas se realizó con Rstudio software (Rstudio Team, 2016) mediante ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples, donde se comparó la formación de biopelículas entre cada condición (37° vs 37Cu, 37° vs 8°C, 8°C vs 8°Cu, 37°C vs 8°C y 37° Cu vs 8°Cu). Todas las diferencias fueron reportadas a nivel de significancia 0,05.

RESULTADOS

1. Revisión bibliográfica para la identificación de genes de biopelículas en *L. monocytogenes*

El primer objetivo de este trabajo fue identificar los genes que se han descrito como involucrados en la formación de biopelículas en *L. monocytogenes*. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica de genes relacionados a la formación de biopelícula de *L. monocytogenes*. Las investigaciones consultadas fueron publicadas en los 10 últimos años. La búsqueda “*Listeria monocytogenes* and biofilm” en las bases de datos PubMed y Google Scholar dio como resultado 767 publicaciones con 411 (53,5%) publicadas en los últimos 5 años (2016- 2021). La búsqueda “Biofilm genes of *L. monocytogenes*” arrojó 137 publicaciones, 79 (57,6%) escritas en los últimos 5 años. Finalmente, la revisión de literatura permitió identificar 119 genes relacionados a la formación de biopelículas en *L. monocytogenes* (Figura 2).

Estos genes fueron clasificados en dos categorías: i) genes directamente relacionados a la formación de biopelículas cuya función proteica se relaciona con formación de matriz polimérica extracelular, adhesión a estructuras o *quorum sensing*, y ii) genes indirectamente relacionados a biopelículas, es decir, genes que tiene una función proteica que está involucrada en otros procesos celulares, pero que, sin embargo, la pérdida de función de estos genes genera un fenotipo de menor formación de biopelículas. En la primera categoría se identificaron 20 genes cuyas funciones y categorías COG se encuentran resumidas en la tabla 1. Se observó que 50% de estos genes se clasifican en la categoría de transducción de señales (T) y 10% a la categoría COG M, correspondiente a biogénesis de pared celular, membrana y envoltura. Otras

categorías menos abundantes fueron F, transporte y metabolismo de nucleótidos y K, Transcripción.

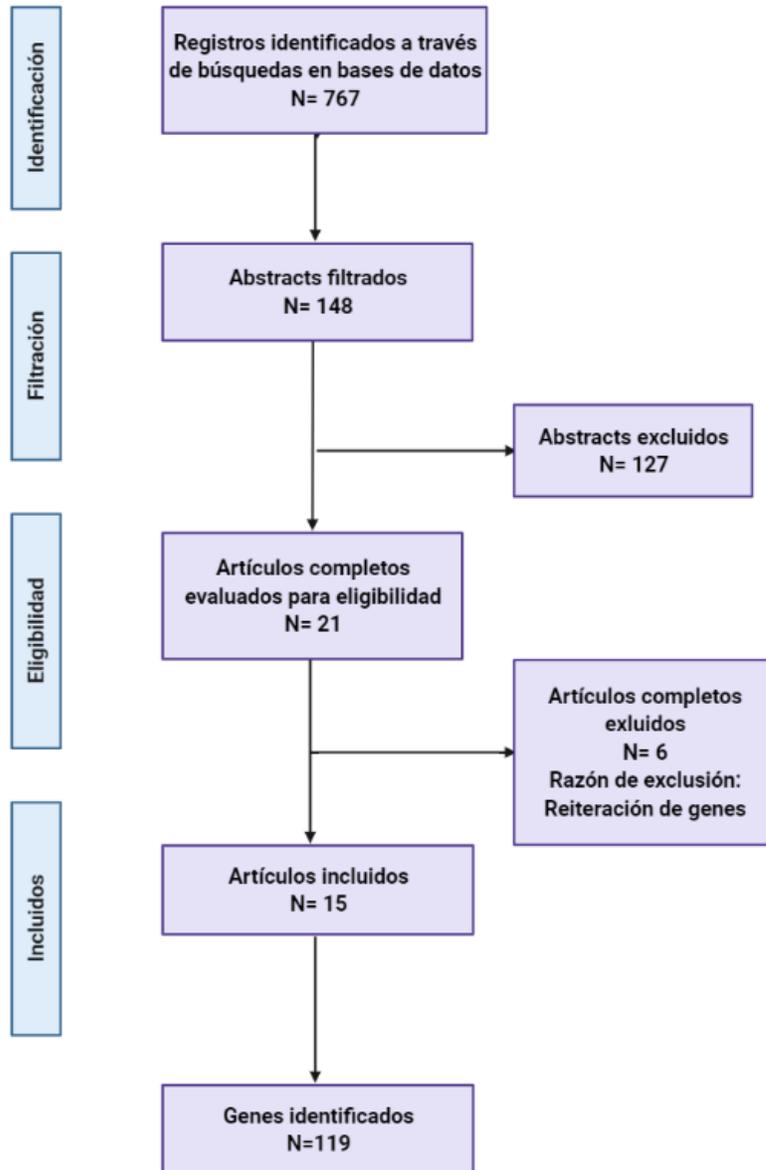


Figura 2. Diagrama de flujo de estudios identificados, excluidos e incluidos en la búsqueda bibliográfica. Creado con Biorender.com

Tabla 1. Genes directamente relacionados a la formación de biopelículas en *L. monocytogenes* (n=20)

Gen	Locus TAG	Categoría COG	Función	Referencia
<i>agrA</i>	<i>lmo0051</i>	K T	Regulador de respuesta	(Garmyn, 2009)
<i>agrB</i>	<i>lmo0048</i>	O T	Procesamiento de AgrD	(Garmyn, 2009)
<i>agrC</i>	<i>lmo0050</i>	T	Sensor kinasa	(Garmyn, 2009)
<i>agrD</i>	<i>lmo0049</i>	R*	Precursor de péptido autoinductor	(Garmyn, 2009)
<i>metK</i>	<i>lmo1664</i>	H	Metionina adenosil -transferasa	(Yadav, 2012)
<i>murA</i>	<i>lmo2526</i>	M	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	(Popowska, 2004)
<i>pssA</i>	<i>lmo0527</i>	R	Proteína de transmembrana	(Koseoglú, 2015)
<i>pssB</i>	<i>lmo0528</i>	R	Proteína hipotética secretada	(Koseoglú, 2015)
<i>pssC</i>	<i>lmo0529</i>	M	Glicosiltransferasa	(Koseoglú, 2015)
<i>pssD</i>	<i>lmo0530</i>	Sin COGs	Proteína similar a BscB (Celulosa sintasa)	(Koseoglú, 2015)
<i>pssE</i>	<i>lmo0531</i>	T	Recepto de tipo I para segundos mensajeros	(Koseoglú, 2015)
<i>pssZ</i>	<i>lmo1913</i>	Sin COGs	Glicosilhidrolasa específica de SPE	(Koseoglú, 2015)
<i>dgcA</i>	<i>lmo1911</i>	T	Diguanilato ciclasa que contienen dominios GGDEF	(Chen, 2014)
<i>dgcB</i>	<i>lmo1912</i>	T	Diguanilato ciclasa que contienen dominios GGDEF	(Chen, 2014)
<i>pdeB</i>	<i>lmo0131</i>	T	C-di-gmp fosfodiesterasa	(Chen, 2014)
<i>pdeC</i>	<i>lmo1914</i>	T	C-di-gmp fosfodiesterasa	(Chen, 2014)
<i>pdeD</i>	<i>lmo0111</i>	T	Y c-di-gmp fosfodiesterasa	(Chen, 2014)
<i>dgcC</i>	<i>lmo2174</i>	T	Diguanilato ciclasa que contienen dominios GGDEF	(Chen, 2014)
<i>luxS</i>	<i>lmo1288</i>	T	S-ribosilhomocisteina liasa	(Bonsaglia, 2014)
<i>pfs</i>	<i>lmo1494</i>	F	5'-metilthioadenosina nucleosidasa / S-adenosilhomocisteina nucleosidasa	(Garmyn, 2009)

En la segunda categoría se identificaron 99 genes clasificados como indirectamente relacionados a la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. Los genes identificados se presentan en la tabla S2.

Las categorías funcionales más representadas de estos genes incluyeron la categoría COG C (13%) asociada a la producción y conversión de energía, que incluían genes como los codificantes para la piruvatodeshidrogenasa *pdhA*, *pdhB* y *pdhD*; la categoría COG M (11,1%), correspondiente a biogénesis de pared celular, membrana o envoltura y COG N (7,07%), movilidad celular (Figura 3). La categoría S, equivalente a genes de

función desconocida también obtuvo una cantidad importante de genes (15%). Las categorías con menor representación dentro de los 99 genes fueron P, transporte y metabolismo de iones inorgánicos y V, mecanismos de defensa.

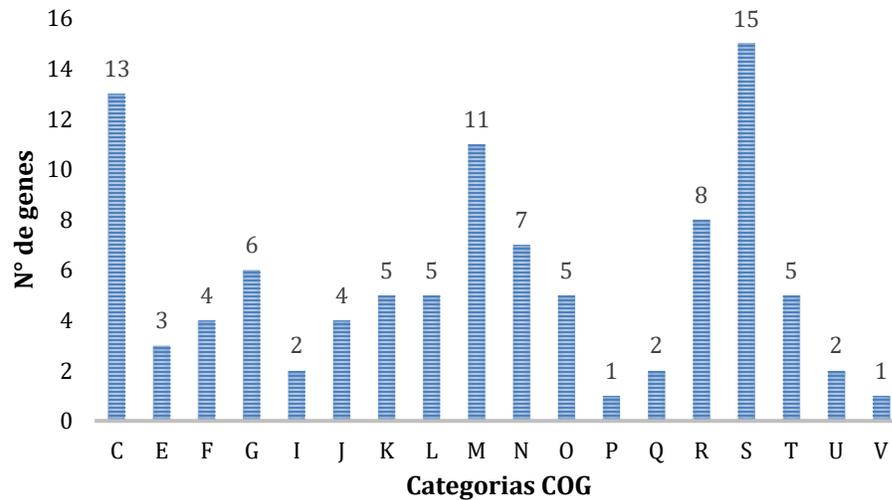


Figura 3. Clasificación de los genes indirectamente relacionados a la formación de biopelículas (n=99) por su categoría funcional COG identificados en la búsqueda bibliográfica. Significado de cada categoría C: Producción y conversión de energía; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; I: Metabolismo de lípidos; J: Traducción; K: Transcripción; L: Replicación y reparación; M: Biogénesis de pared celular, membrana y envoltura; N: Movilidad celular; O: Modificación post-traduccional, rotación de proteínas y funciones de chaperonas; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; R: Solo predicción de la función general, S: Función desconocida, T: Transducción de señales; U: Tráfico intracelular y secreción; V: Mecanismos de defensas; S: Función desconocida.

2. Evaluación de la conservación de genes relacionados a la formación de biopelículas en genomas de *L. monocytogenes*.

Se dispuso de una colección local de *L. monocytogenes* (n=422) de diferentes orígenes de aislamiento. Estos aislados fueron secuenciados y anotados previamente a la

realización de esta tesis. La distribución de acuerdo con el origen de los aislados analizados en este estudio se presentan en la Figura 4.

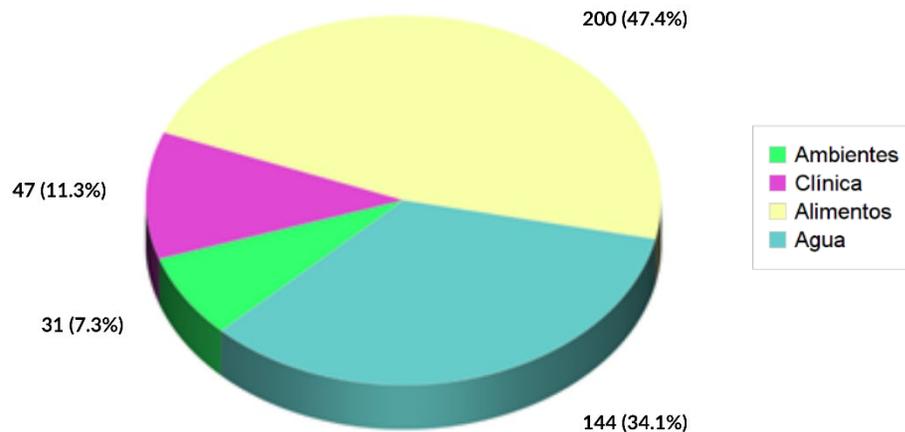


Figura 4. Fuentes de aislamiento de las cepas de *L. monocytogenes* con genomas disponible utilizadas en esta investigación. En amarillo se representan los aislados de *L. monocytogenes* obtenidos de fuentes alimentarias, en azul los aislados obtenidos desde fuente de agua, en verde los aislados provenientes del ambiente y en morado los aislados obtenidos de ambientes clínicos.

En primer lugar, se caracterizaron los genomas de *L. monocytogenes* a través de un análisis de SNPs para así poder inferir la relación filogenética entre ellos. Los genomas difirieron entre un mínimo de 0 y un máximo de 29169 SNPs. Utilizando el análisis de SNPs se generó un árbol filogenético mediante el método de *Neighbour joining*. Se observó que los aislados se agrupan de acuerdo a su serogrupo y no se identificó una relación entre la posición filogenética y el origen de aislamiento (Figura 5 y Figura S1).

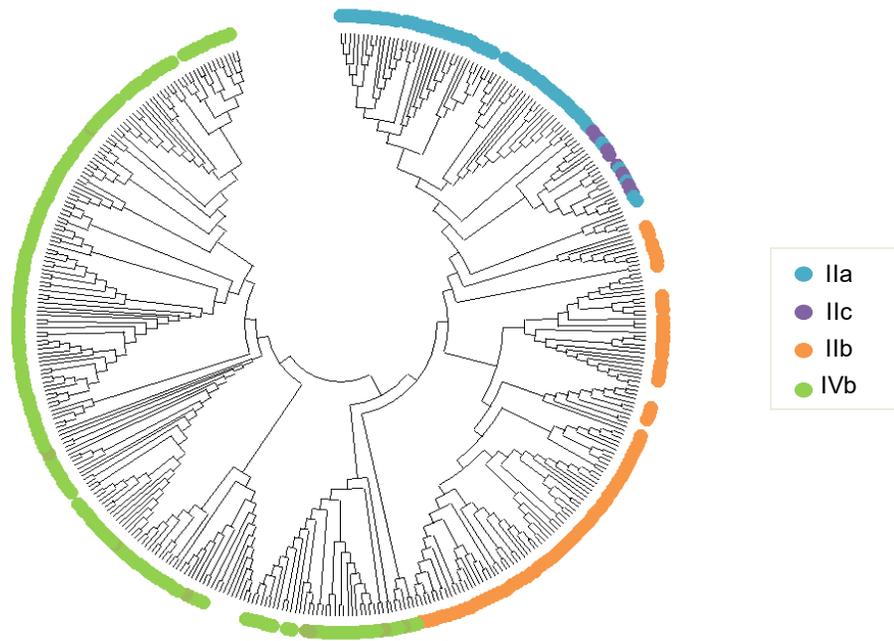


Figura 5. Análisis filogenético de los genomas de *L. monocytogenes* (n=422). árbol construido usando el método de Neighbour joining en SNPs del core genome mediante el software Mega11. Para los genomas con información disponible se asignó un color a cada serogrupo: en verde se representan los serogrupo IVb, en azul IIa, en naranja IIb y en morado IIc.

2.1 Identificación de genes de biopelículas en aislados de *L. monocytogenes*

Con el fin de evaluar la presencia de los genes directa e indirectamente relacionados a la formación de biopelículas, fueron analizados los 422 genomas de *L. monocytogenes* con el programa Ridom SeqSphere+. A partir de esta información se confeccionó un mapa de agrupamiento de los genes utilizando el Interactive Heat Map Builder.

En la figura 6 se presenta el mapa de agrupamiento que analiza la presencia de los genes directamente relacionados a la formación de biopelículas (n=20) en los genomas de *L. monocytogenes*. Se observó que estos genes se encuentran mayoritariamente conservados en los aislados de *L. monocytogenes*. Existe un conjunto de 77 genomas (*Cluster 7*) que poseen todos los genes. Además, 304 genomas (*Cluster 1*) poseen la mayoría de los genes, excepto *dgcC*, gen codificante para diguanilato ciclasas que contienen dominios GGDEF, involucrado en la síntesis de c-di-GMP. Esta molécula estimula la síntesis de SPE, por lo que promueve la formación de biopelículas (Römling & Amikam, 2006). El análisis de la presencia de los genes indirectamente relacionados a la formación de biopelículas se presenta en el mapa de agrupamiento de la figura 7.

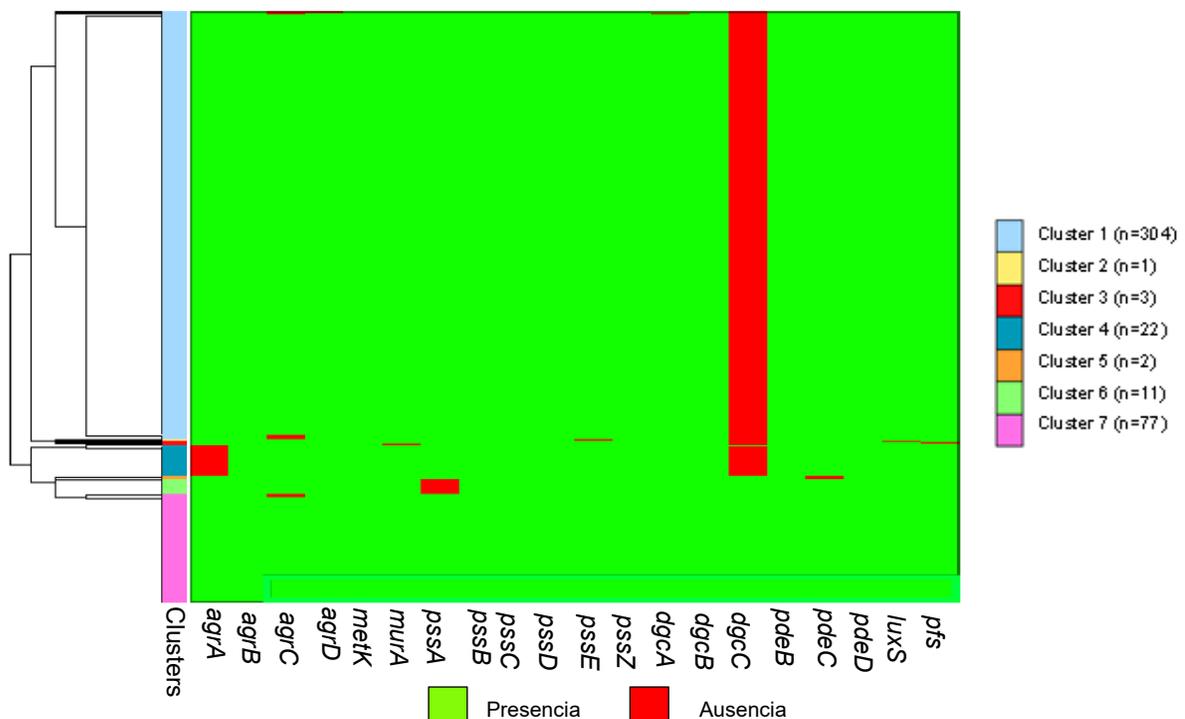


Figura 6. Mapa de agrupamiento de genomas de *L. monocytogenes* según presencia (verde) y ausencia (rojo) de los genes directamente relacionados a la formación de biopelícula (n=20). En las columnas se encuentran listados los genes. En las filas se posicionan los 422 genomas agrupados por orden

jerárquico y distancia métrica euclidiana. La barra de covariantes muestra el agrupamiento jerárquico de los genomas.

Se identificaron 124 combinaciones de genes presentes dentro de los 422 genomas de *L. monocytogenes*, las cuales se representan como cada sub-rama del dendograma. Para posteriores análisis se designaron 4 grandes grupos (A, B, C y D) que contienen genomas con similares patrones de presencia/ausencia de genes. Los genomas del grupo A presentaron mayor conservación de genes que los genomas de los demás grupos asignados.

Los genes indirectamente relacionados a biopelículas presentaron en promedio un 90,9% de conservación en los genomas de *L. monocytogenes*.

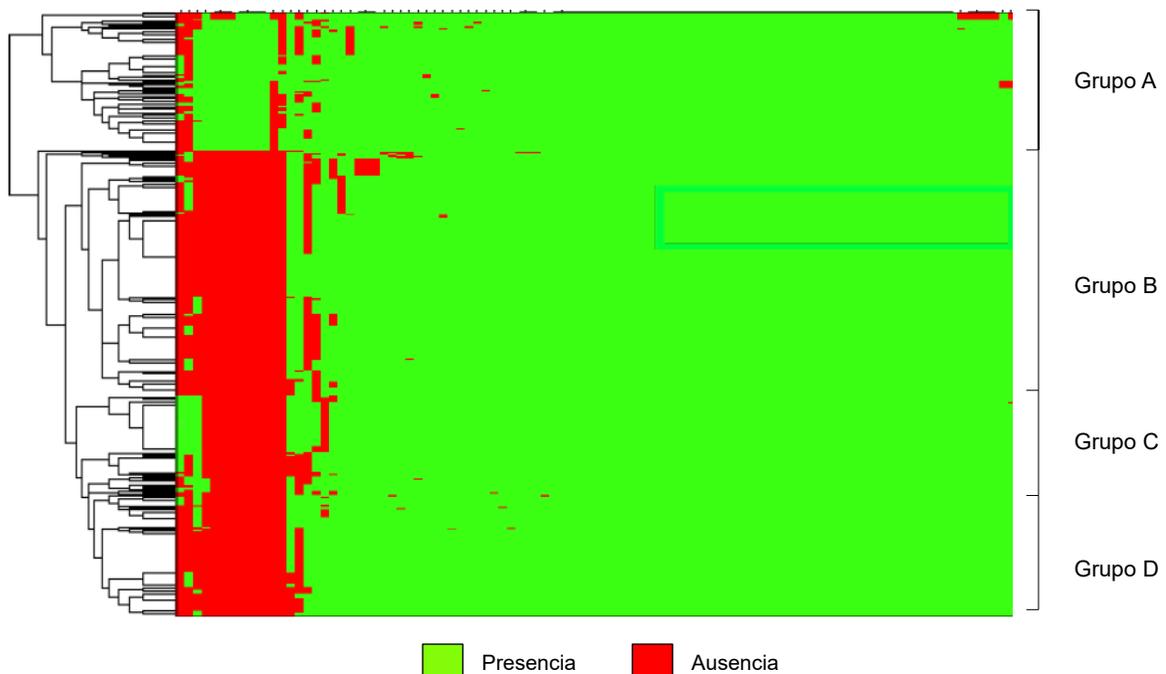


Figura 7. Mapa de agrupamiento de genomas según presencia (verde) y ausencia (rojo) de los 99 genes indirectamente relacionados a la formación de biopelícula en *L. monocytogenes*. En las columnas se encuentran agrupados los genes. En las filas se posicionan los 422 genomas agrupados por orden jerárquico y distancia métrica euclidiana.

El análisis de los genes indirectamente relacionados a biopelículas reveló que 46 de los 99 genes identificados en la literatura se encontraron presentes en todos los genomas de *L. monocytogenes* (Fig. 7). Entre estos genes se encontraban los genes de motilidad *fliG*, *flaA*, *flgK*, *flgE* y *motA*, además de genes como *citC*, *citB*, *pdhB*, *Imo1634*, *pycA* y *asnB*, pertenecientes a la categoría COG C (Producción y conversión de energía), entre otros. Los genes que se detectaron con menor frecuencia correspondieron a *Imo0149*, cuya función aún es desconocida, *bapL*, proteína de unión a peptidoglicano y *Imo2326*, similar a la proteína gp41 (Bacteriófago A118). El grupo A se caracterizó por presentar entre 90,9% (90/99 genes) y 96,7% de los genes relacionados a la formación de biopelículas. Donde se encontraban presentes los genes *dnaK*, *rpoA*, *pflA*, *comK*, entre otros. La presencia de los genes anteriormente mencionados no se observó en los demás grupos. Para los grupos B, C y D no varió significativamente el número de genes presentes en dichos aislados, fluctuando entre 84,8% (84/99) y 86,8% (86/99) genes. El grupo B se distinguió por la ausencia del gen *actA*, gen que está presente tanto en el grupo C como el D. El grupo C se caracterizó por la presencia del gen *fstH*, el cual, tanto en el grupo B como en el grupo D, se encontraba ausente en los genomas de *L. monocytogenes*.

3. Formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

3.1 Evaluación de formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

Para la formación de biopelículas se seleccionaron 17 aislados pertenecientes a los grupos A (n=4), B (n=4), C (n=5) y D (n=4). Además, se adicionó a los ensayos la cepa EGD-e, ya que esta posee en su genoma todos los genes identificados en la literatura. Estos aislados presentaron diferentes combinaciones de genes relacionados indirectamente a la formación de biopelículas. Además, 8 de estos aislados poseen todos

los genes relacionados directamente a biopelículas y 10 poseen solo la ausencia de *dgcC*. Las características de los aislados evaluados se resumen en la tabla S3.

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de estos aislados en cuatro condiciones: 37°C, 37°C + cobre (0,5 mM CuSO₄ x 5H₂O), frío (8°C) y frío + cobre (0,5 mM CuSO₄ x 5H₂O). Los resultados mostraron que a 37°C y luego de 48 hrs de incubación, condición control, todos los aislados fueron capaces de formar biopelículas. Sin embargo, la cantidad de biopelículas formada varió entre los aislados (Figura 8) y esta variación no se relacionó con el grupo del que fueron seleccionados los aislados (A-D). Luego se evaluó la formación de biopelículas en presencia de cobre. Todos los aislados cultivados a 37°C + Cu formaron biopelículas. Se observó que al igual que a 37°C, la cantidad de biopelículas formadas varió entre los aislados (Figura 8.1). Solo 4 de 18 aislados mostraron una diferencia significativa en la formación de biopelículas ante la presencia de cobre en comparación con el control; dos de estos aumentaron su formación de biopelículas en presencia de cobre, mientras que los dos restantes disminuyeron significativamente su formación de biopelícula en presencia de Cu.

Además, se evaluó el efecto del frío (8°C) en la formación de biopelículas y se comparó la biopelícula formada con respecto a lo observado a 37°C (Figura 8.2). Se observó que todos los aislados poseen la capacidad de formar biopelículas, aunque esta capacidad varió entre los aislados, y no se observó variación de acuerdo con el grupo que pertenecían los aislados. Tres aislados de 18 mostraron un aumento significativo en la formación de biopelículas al ser expuestos a bajas temperaturas comparados con su formación a 37°C (Figura 8.2).

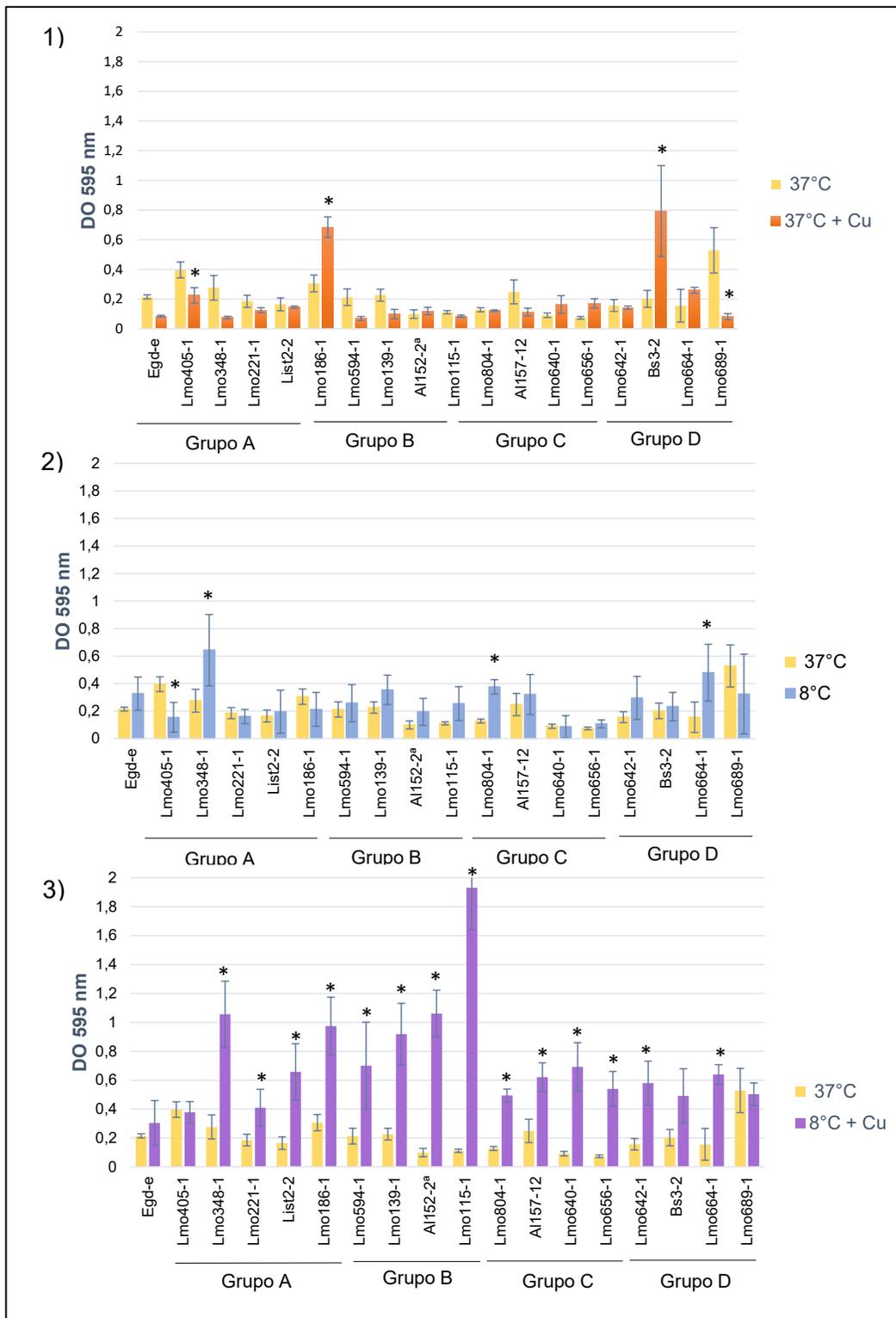


Figura 8. Niveles de formación de biopelículas por grupos. Formación de biopelículas luego de 48hr a 37°C (amarillo), 37°C con TSBYE suplementado con 0,5 mM CuSO₄ x 5H₂O (naranja), 8°C (azul) y 8°C con TSBYE con 0,5 mM mM CuSO₄ x 5H₂O (morado). 1) 37°C vs 37°C+ Cu. 2) 37°C vs 8°C. 3) 37°C vs 8°C +

Cu. Las barras representan los valores promedio de 9 datos CV-OD₅₉₅ y sus desviaciones estándar. Análisis estadístico utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Un asterisco (*) representa una diferencia significativa respecto del control (37°C) (p-valor < 0,05).

Solo un aislado disminuyó significativamente su capacidad de formación de biopelículas en presencia de frío en comparación con su capacidad a 37°C.

Al exponer a los aislados a las dos condiciones de estrés (frío+ Cu), se observó un aumento significativo (p-valor > 0,05) de la formación de biopelículas para 14 de los 18 aislados al compararlo con el control a 37°C (Figura 8.3). La cantidad de biopelículas formada en respuesta a los factores de estrés (frío + Cu) fue independiente del número de genes de biopelículas codificados en los genomas de *L. monocytogenes*.

Adicionalmente se analizó la relación entre la cantidad de biopelículas formadas y el serogrupo al que pertenecían los 18 aislados (Figura 9). Los resultados mostraron un comportamiento similar entre los aislados, bajo las diferentes condiciones de cultivos, independiente al serogrupo que pertenecían.

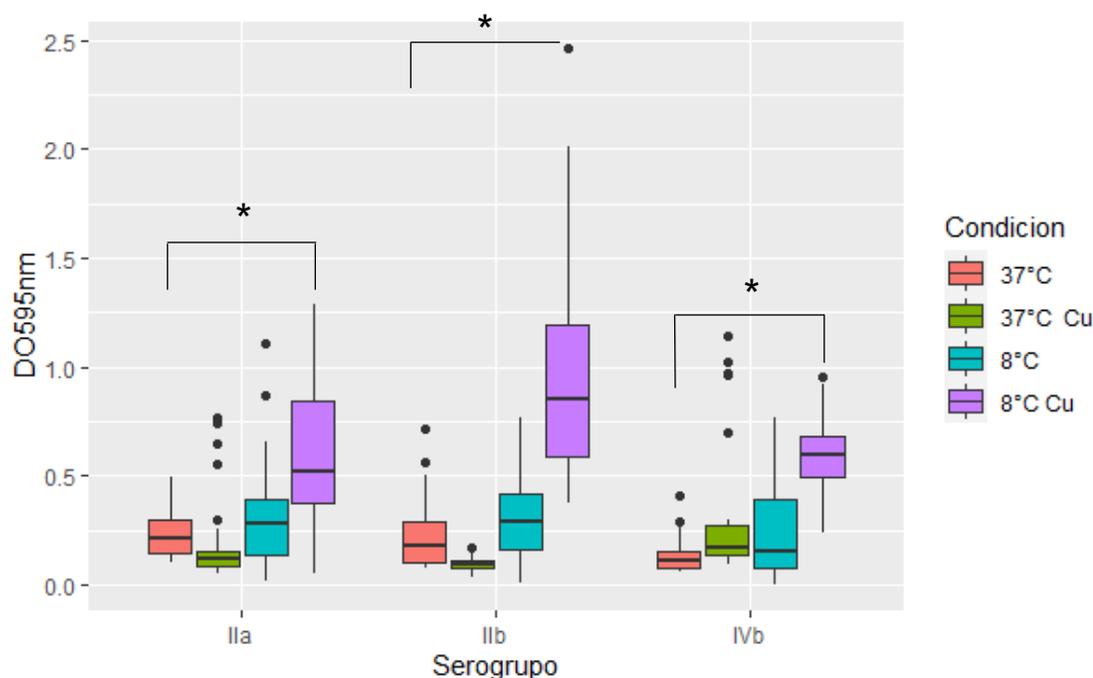


Figura 9. Análisis comparativo de la formación de biopelículas entre serogrupos de aislados de *L. monocytogenes* (n=18) en las cuatro condiciones experimentales. Cada gráfico de caja y bigotes representa los valores de formación de biopelículas para cada condición (Rosado:37°C, Verde:37°C+Cu, Celeste: 8°C y Morado: 8°C +Cu). Los puntos y bigotes se extienden entre los valores mínimos y máximos de formación de biopelículas en cada condición, la línea horizontal representa la mediana del conjunto de datos. Análisis estadístico utilizando ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (37°C) (p-valor < 0,05).

4. Establecimiento de protocolo de extracción de RNA desde biopelícula.

Con el objetivo de evaluar la respuesta transcripcional de los genes relacionados a la formación de biopelículas se trabajó en establecer un protocolo de extracción de RNA de biopelículas de *L. monocytogenes*. En el laboratorio se encontraba disponible un protocolo de extracción de RNA desde células en estado planctónico. Por lo tanto, el primer paso fue implementar un protocolo de extracción de RNA desde biopelículas. Para ello se adaptó el protocolo de Luo y colaboradores (2013). El principal desafío de

este procedimiento fue obtener la cantidad adecuada de biomasa para obtener RNA en la calidad y cantidad necesaria para poder realizar posteriores análisis de expresión génica. En una primera aproximación se formó biopelícula en placas de 24 pocillos a 37°C durante 48 hrs y se usó la biomasa de todos los pocillos para extraer el RNA. Los resultados evidenciaron que no fue posible extraer RNA, posiblemente debido a que la biomasa no fue suficiente, por lo que se evaluó formar biopelículas en placas petri a 37°C por 48hrs. En la Figura 10 se esquematiza el protocolo establecido para extraer RNA desde biopelículas de *L. monocytogenes*. Mediante esta metodología se logró extraer RNA desde biopelículas a 37°C. Los valores de concentración y pureza de las extracciones están resumidos en la Tabla S4.

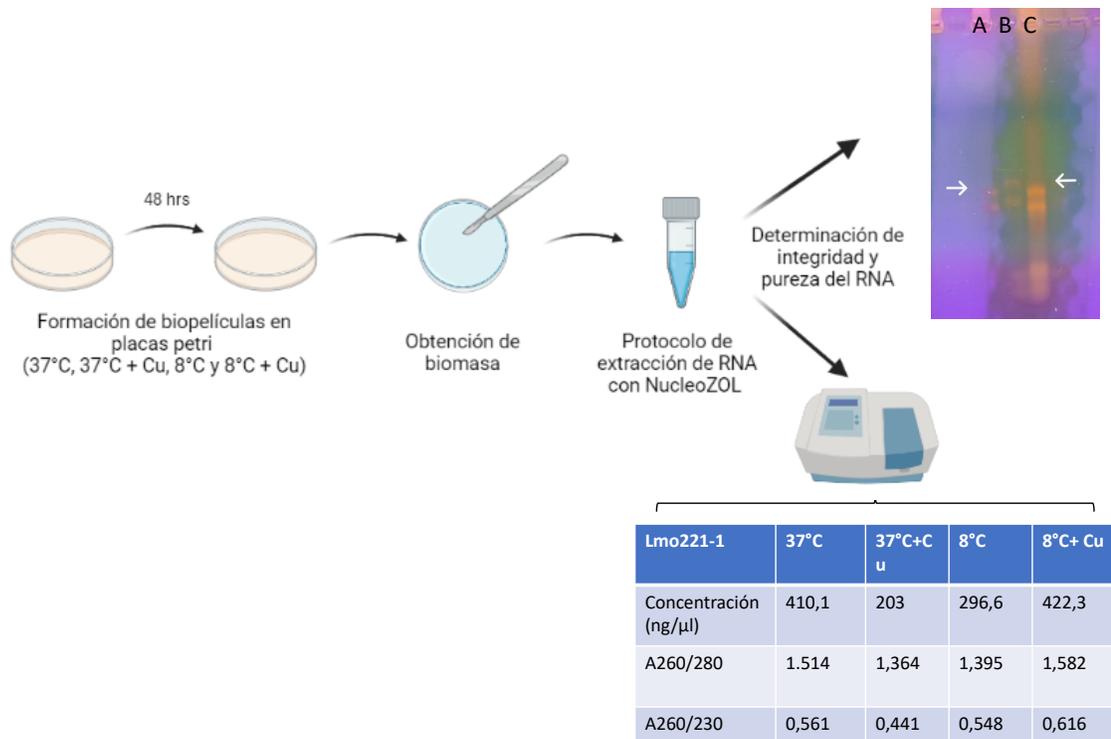


Figura 10. Esquema que representa el ensayo de extracción de RNA desde biopelículas y resultados obtenidos. Imagen creada con BioRender.com. Arriba: Gel de integridad de extracción en frío (8°C) (A y B) y frío y cobre (0,5 mM) (C) del aislado lmo221-1. Las letras representan las condiciones experimentales en las cuales fue extraído el RNA. Abajo: Tabla con valores de concentración y pureza del RNA extraído.

Posteriormente, luego de establecer el protocolo de extracción de RNA se evaluó su efectividad en biopelículas formadas a 8°C y 8°C + Cu. Se seleccionaron dos aislados para extraer RNA desde biopelículas y se realizó el ensayo de formación de biopelículas en las 4 condiciones estudiadas (37°C, 37°C +Cu, 8°C y 8°C + Cu), pasadas las 48 hrs de incubación, se realizó la extracción de RNA. Todas las extracciones mostraron una concentración por sobre 100 ng/μl.

5. Evaluación de la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* en biopelículas

Finalmente, se seleccionaron genes para evaluar la respuesta transcripcional de aislados de *L. monocytogenes* en biopelículas bajo diferentes condiciones de cultivo. Se seleccionaron genes definidos como indirectamente relacionados a biopelículas y que estaban altamente conservados en los genomas de *L. monocytogenes* y que además participarán en diferentes funciones dentro de la célula. Se utilizó la herramienta primer-BLAST para el diseño de las secuencias de partidores y se comprobó la hibridación de estas en la secuencia nucleotídica en formato fasta de cada gen. La lista de partidores se detalla en la tabla S5.

Los estudios de la respuesta transcripcional no alcanzaron a ser realizados en este proyecto de tesis. Las principales razones de no poder cumplir con esta actividad fueron que debido a la pandemia hubo retraso en la llegada de reactivos y las actividades presenciales estaban restringidas por temas de aforo en el laboratorio.

DISCUSIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno capaz de formar biopelículas en diversas superficies abióticas (Paduro y col., 2019). Numerosos estudios han evaluado el comportamiento de las biopelículas de *L. monocytogenes* frente a agentes estresores, demostrando que existen algunos de estos estresores, tales como desinfectantes, biocidas y bajas temperaturas, que disminuyen la capacidad de formar biopelículas (Ferreira y col., 2014; Fagerlung y col., 2020), mientras que otros estresores como un aumento en la salinidad en el medio potencian esta capacidad (Lee y col., 2019). Además, se ha visto que la capacidad de formación de biopelículas puede variar entre las diversas cepas de *L. monocytogenes* (Borucki y col., 2003). Las bacterias en biopelícula tienen patrones distintos de expresión génica en comparación con sus contrapartes planctónicas y, por lo tanto, son fisiológicamente diferentes (Renier y col., 2011). Hasta la fecha, solo se ha reconocido un número limitado de genes en *L. monocytogenes* que desempeñan funciones críticas en el desarrollo de biopelículas y las bases moleculares de esta forma de vida aún no son muy claras.

Mediante una acabada búsqueda bibliográfica se identificaron los genes involucrados, tanto directa e indirectamente en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. La búsqueda bibliográfica resultó en la identificación de 119 genes relacionados a biopelículas, 20 de ellos se categorizaron como directamente relacionados a biopelículas porque su función se relaciona estrechamente con producción de matriz polimérica extracelular y/o *quorum sensing*. Algunos de estos genes descritos en estudios previos son los genes del sistema regulador de genes accesorios (*agr*), los cuales están involucrados en *quorum sensing* (Autret y col., 2003; Rieu y col., 2007; Rieu y col., 2008) y el gen *luxS* que codifica para la molécula funcional similar al autoinductor 2 (AI-2) (Sela

y col., 2006). Estos genes han mostrado un impacto significativo en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* (Pieta y col., 2014).

Adicionalmente, se identificaron otros 99 genes que en este estudio fueron clasificados como indirectamente relacionados a biopelículas, es decir su función específica se relaciona con otros mecanismos o procesos celulares, pero existen estudios que han reportado que la pérdida de funcionalidad de dicha proteína afecta la formación de biopelículas (Chang, 2011; Alonso, 2014). En este estudio, se distinguió un amplio rango de funciones específicas de los genes encontrados en la literatura, donde se destacan tres grandes grupos funcionales: biosíntesis, regulación genética y motilidad celular. Se ha demostrado que dos reguladores transcripcionales previamente descritos son relevantes para el desarrollo de biopelículas. Estos son *prfA*, gen que codifica para un activador transcripcional (Lemon y col., 2010) y *sigB* gen codificante para un regulador transcripcional global de genes de respuesta al estrés (Veen & Abee 2010). Diversos estudios describen que genes regulatorios, como los genes antes mencionados, y a genes de movilidad, como *fliG*, *flaA*, *motB*, tienen un rol en la formación biopelículas de *L. monocytogenes*. Se ha descrito que la motilidad mediada por flagelos es fundamental para la producción de biopelículas, ya que permite que la bacteria se adhiera a las superficies (Lemon y col., 2007). Asimismo, el flagelo juega un papel importante en la formación temprana de biopelículas en varias bacterias Gram-negativas (O'Toole y col., 2000). Si bien se ha propuesto que los flagelos participan en la formación de biopelículas tanto como adhesinas superficiales y como generadores de motilidad, se ha observado que en al menos *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* es la motilidad misma el proceso clave para la formación de biopelículas (O'Toole & Kolter, 1998; Watnick y col., 2001; Lemon y col., 2007).

El uso de herramientas bioinformáticas permitió buscar la presencia de estos genes identificados en la literatura en una base de datos de 422 genomas de *L. monocytogenes*. La herramienta cgMLST del software Ridom SeqSphere+ facilitó el proceso de análisis de los genomas. Mediante el análisis de software automatizado de las secuencias de los genomas esta herramienta realiza la llamada de alelos gen por gen de cientos o miles de genes (genoma central MLST [cgMLST]) para realizar el genotipado (Mellmann y col.,2016).

Los genes directamente relacionados a biopelículas se encontraron altamente conservados en los genomas de *L. monocytogenes*. Un gen en particular se encontró ausente en 308 genomas de *L. monocytogenes*, el gen *dgcC* (Figura 6). Este gen codifica para la proteína diguanilato ciclasa que contienen dominios GGDEF, involucrada en la síntesis de c-di-GMP. La molécula c-di-GMP promueve la formación de biopelículas a través de la estimulación de formación de SPE y factores asociados a superficie celular (Römling & Amikam 2006). Se ha observado en otras investigaciones que la inhibición de la actividad diguanilato ciclasa en *E. coli* y *P. aeruginosa* apunta a una deficiencia en la formación de biopelículas (Antoniani y col., 2009). La ausencia de *dgcC* en los aislados de *L. monocytogenes*, no se relacionó con la capacidad o cantidad de biopelículas formadas (Tabla S3 y Figura 8). Es probable que los otros genes con actividad DGC (*dgcA*, *dgcB*) sean suficientes para establecer la formación de biopelículas. Otra posibilidad es que exista otro gen que cumpla una función similar a *dgcC*. Al respecto, Chen y colaboradores (2014) realizaron un análisis genómico de la vía de señalización de c-di-GMP donde describen un cuarto gen con actividad diguanilato ciclasa, el gen *pssE*. Este gen mostró una alta conservación en los genomas de *L. monocytogenes* (Figura 6), por lo que podría ser el gen que reemplace la actividad de *dgcC*. Se pudo

observar también que los genes *agr* mostraron diferentes niveles de conservación en los genomas de *L. monocytogenes*. Los genes *agr* codifican proteínas involucradas en comunicación célula a célula y *quorum sensing* (Vivant y col., 2014). El gen *agrA* fue el menos conservado de los genes anteriormente mencionados, estando presente en 400 de los 422 genomas. El gen *agrC* se encontró presente en 413 genomas. El gen *agrB* mostró estar altamente conservado en los genomas de *L. monocytogenes*, ya que se encontró presente en 420 de los 422 genomas. El gen *luxS* mostró un nivel similar de conservación que el anterior, encontrándose presente en 419 de los 422 genomas de *L. monocytogenes*.

Los resultados mostraron que los aislados varían en su capacidad de formación de biopelículas tanto a 37°C, como a 37°C + Cu y a 8°C. En esta investigación se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* a una exposición aguda no letal al cobre (0,5 mM). Se eligió esta concentración porque fue la más alta probada que no afectó la cinética bacteriana y es equivalente a 1/8 de la MIC-Cu (Quesille-Villalobos y col., 2019). A la fecha no existen estudios que evalúen el comportamiento de las biopelículas de *L. monocytogenes* ante la presencia de cobre en concentraciones subletales. Estudios respecto al uso de superficies de cobre para el control de biopelículas de otras especies bacterianas describen como las interacciones de los iones de cobre afectan no solo al microorganismo en sí, sino que existe una interacción con la matriz de exopolisacárido. Esta interacción aún no está bien estudiada (Gomes y col., 2020). Lin y colaboradores (2020) demostraron que los iones de cobre en biopelículas de *P. aeruginosa* se localizaban principalmente en la matriz y solo un porcentaje bajo se encontraba intracelularmente o en la membrana/pared celular (Lin y col., 2020). Se ha

reportado también que la presencia de cobre podría reducir la producción de SPE en otras especies bacterianas (Khan y col., 2013; Chari y col., 2017; Gomes y col., 2020). Estudios previos muestran que en presencia de frío los aislados disminuyen su capacidad de formar biopelículas en bajas temperaturas cuando se las compara con el crecimiento a 37°C (Di Bonaventura, G. y col., 2008; Tomicic y col., 2016). En este estudio un aislado de 18 presentó una menor cantidad de biopelícula formada a 8°C vs a 37°C y los otros 17 aislados presentaron niveles similares de biopelículas a 37 y 8°C. Una de las razones que podría explicar este hallazgo es que, a nivel experimental, los aislados fueron adaptados por 72 hrs a frío (8°C) previo al ensayo de formación de biopelícula. En este estudio se observó que la presencia de 8°C + Cu simultáneamente generó un aumento significativo en la formación de biopelícula de la mayoría de los aislados estudiados. Al respecto no hay estudios que describan el comportamiento de las biopelículas de *L. monocytogenes* ante estos dos estresores, por lo que este resultado constituye una novedad y un punto de partida para futuras investigaciones. Estudios que evalúan el efecto entre la temperatura y otra condición de estrés (salinidad en el medio, deficiencia de nutrientes, adición de glucosa) muestran que el efecto de estos dos factores de estrés es disminuir la capacidad de formación de biopelículas en cepas de *L. monocytogenes*, atribuyendo este resultado la temperatura por sobre el segundo factor de estrés (Kadam y col., 2013; Lee y col., 2019; Fan y col., 2020). Una vez formadas y maduras, las biopelículas crean una protección contra condiciones adversas, como variaciones de temperatura y pH, alta salinidad y baja disponibilidad de nutrientes, así como desinfectantes (Skowron y col., 2019). Lopes da Silva y colaboradores observaron que a bajas temperaturas (4°C) y en presencia de concentraciones de subinhibitorias de amonio cuaternario *L. monocytogenes* aumentó su formación de biopelículas respecto a 37°C (Silva y col., 2020). La presencia de cobre

en concentraciones subinhibitorias podría estar aumentando la formación de biopelículas como mecanismo de protección celular. Como se mencionó previamente (Lin y cols., 2020), la matriz extracelular formada por las biopelículas podría actuar reteniendo iones cobre y favoreciendo la persistencia del patógeno.

Al contrastar los resultados de presencia de genes en los aislados de *L. monocytogenes* con la formación de biopelícula de dicho aislado, no se encontró una relación entre mayor número de genes presentes y una mayor formación de biopelículas a 37°C. De acuerdo a la hipótesis se esperaba que los aislados del grupo A, los cuales presentaban mayor número de genes presentes en sus genomas, mostraran mayor capacidad de formación de biopelículas que los demás grupos (B-D) en las cuatro condiciones. Sin embargo, se observó que la formación de biopelículas no varió significativamente entre los grupos de genomas respecto a las cuatro condiciones. Por lo tanto, el número de genes relacionados a biopelículas (tanto directa como indirectamente) presentes en los genomas resultó ser independiente de la capacidad de formación de biopelículas de los aislados. Además, la cepa EGD-e, la cual fue utilizada como genoma de referencia por tener presentes en su genoma todos los genes identificados en la búsqueda bibliográfica, mostró baja formación de biopelículas en todas las condiciones al compararla con otros aislados (Figura S2).

Adicionalmente, se clasificaron los aislados según su serogrupo y su formación de biopelículas. Los resultados mostraron que la capacidad de formación de biopelículas frente a diferentes condiciones de cultivo no varió entre los serogrupos de los aislados. A la fecha, estudios que han investigado la asociación entre linajes, serotipos u orígenes de aislamiento con la diversidad de fenotipo de formación de biopelículas en cepas de *L. monocytogenes* han mostrado resultados contradictorios, ya que algunos autores afirman que existe una diferencia en la formación de biopelículas entre las cepas del

linaje I (serotipo 1/2b y 4b) y el linaje II (1/2a y 1/2b) donde estas últimas forman más biopelículas que las primeras (Borucki y col., 2003; Marsh, Luo & Wang, 2003; Pan y col., 2009; Pan y col., 2010), mientras que otros no han observado dicho comportamiento en sus investigaciones (Lee y col., 2019; Bai y col., 2021). Estas inconsistencias en los resultados se pueden atribuir a diferencias en el diseño experimental como también a las cepas elegidas para los ensayos.

La falta de relación entre la presencia de genes y composición cuantitativa de la biopelícula formada sugiere, entre otros, que estos aislados poseen una regulación transcripcional diferente entre sí. La presencia de un gen no es suficiente para que se genere un fenotipo, sino que se debe evaluar la expresión de dicho gen en cada situación en particular, como por ejemplo en este caso la formación de biopelículas. Estudiar la expresión genética es una herramienta analítica que permite evaluar el impacto a nivel transcripcional que se genera en la célula al ser expuesta a diversos factores ambientales y/o externos, como nuevos sanitizantes, la temperatura, el material de la superficie, entre otros (Rodrigues y col., 2011). Para ensayos que involucran expresión es necesario contar con una cantidad y calidad mínima de RNA, por lo que tener estandarizado un protocolo para este proceso era importante en el desarrollo de esta tesis. El establecimiento y aplicación del protocolo de extracción de RNA desde biopelículas permitió obtener RNA de dos aislados a 37°C, 8 °C y 8°C + Cu. Al determinar la calidad del RNA, normalmente se consideran algunos parámetros como el rendimiento, la pureza y la integridad del RNA (Bustin y col., 2008). A pesar de los factores inherentes relacionados con cada protocolo de extracción de RNA en específico, las muestras pueden presentar propiedades intrínsecas que pueden conducir a la extracción de diferentes cantidades y calidades de RNA (França y col., 2012). Se espera que el RNA puro tenga una razón de 1,8 o superior para las razones A260/A280 y

A260/A230. Una razón A260/A280 más baja que 1,8 indica la presencia de proteínas, mientras que una razón A260/A230 más baja que 1,8 la presencia de polisacáridos desde la matriz (Tavares, y col., 2011). Con respecto a estos indicadores, se observó que los resultados de la razón A260/A230 en las extracciones de RNA fueron menores a 1,8. Esto indica un alto nivel de polisacáridos en la extracción, lo que podría significar que las extracciones presentaron alta cantidad de matriz polimérica extracelular en ellas. Estudios previos han mostrado que la extracción de RNA es un proceso que debe ser llevado a cabo de manera rigurosa, ya que la molécula de RNA se degrada rápido en el ambiente (Landolt y col., 2016). En biopelículas este proceso es aún más desafiante, porque los polisacáridos que constituyen la matriz extracelular dificultan la lisis celular y los ácidos nucleicos, una vez purificados, pueden aún contener sustancias inhibitorias que podrían influir en la exactitud y reproducibilidad de la cuantificación de RNA (Juntilla y col., 2009; Santiago-Vásquez y col., 2006).

Como los resultados muestran que no hay una correlación entre la presencia de los genes y la capacidad de formación de biopelículas y además, la presencia simultanea de frío y cobre durante la formación de biopelículas sugirió que la formación de biopelículas se vio más influenciada por los estresores del medio que por los componentes genéticos de los aislados, se propone que trabajos futuros se enfoquen en estudiar la expresión de estos genes en biopelículas *L. monocytogenes* en presencia de frío y cobre. Para esto, se diseñaron partidores de genes que podrían ser claves en este proceso.

Finalmente, no se observó una relación directa entre la presencia de genes y la capacidad de formar biopelículas, lo que definió que parte de la hipótesis inicial no fuera válida. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en aislados que presentaron

mayor formación de biopelículas, algunos de estos genes identificados posean mayor expresión genética.

CONCLUSIONES

Todos los aislados de *L. monocytogenes* mostraron capacidad de formar biopelículas en las cuatro condiciones evaluadas. Adicionalmente, la presencia de genes relacionados a la formación de biopelículas varió en aislados chilenos de *L. monocytogenes*, sin embargo, la cantidad de biopelícula formada fue independiente del número de genes presentes en los aislados.

Pese a lo anterior:

- Se caracterizó a los aislados locales de *L. monocytogenes* respecto al número de genes relacionados a formación de biopelícula que codifican.
- Se evaluó la formación de biopelículas de aislados de *L. monocytogenes*, donde se encontró que la formación de biopelículas aumentaba cuando había dos estresores (frío y cobre) en el ambiente.
- Se estableció un protocolo de extracción de RNA desde biopelículas y se diseñaron partidores de genes determinante en la formación de biopelículas reportados en la literatura, dejando información y material para futuros análisis transcriptómicos.

Finalmente, es necesario evaluar la respuesta transcripcional de estos genes para entender la diferencia observada en el nivel de producción de biopelículas bajo condiciones de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

Antoniani, D., Bocci, P., Maciąg, A., Raffaelli, N. and Landini, P. 2009. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **85**:1095-1104.

Alonso, A., Perry, K., Regeimbal, J., Regan, P. and Higgins, D. 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PLoS ONE*. **9**:113696

Angelidis, A. and Smith, G. 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 7492-7498.

Assisi, C., Forauer, E., Oliver, H. and Etter, A. 2021. Genomic and transcriptomic analysis of biofilm formation in persistent and transient *Listeria monocytogenes* isolates from the retail deli environment does not yield insight into persistence mechanisms. *Foodborne Pathogens and Disease*. **18**:179-188.

Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., Charbit, A. 2003. Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun*. **71**:4463–4471

Bai, X., Liu, D., Xu, L., Tenguria, S., Drolia, R., Gallina, N., Cox, A., Koo, O. and Bhunia, A. 2021. Biofilm-isolated *Listeria monocytogenes* exhibits reduced systemic dissemination at the early (12–24 h) stage of infection in a mouse model. *npj Biofilms and Microbiomes*, **7**: 35-38.

Beloin C. and Ghigo J.M.2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol*.**13**:16-9.

Bonsaglia, E., Silva, N., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J., Tsunemi, M. and Rall, V., 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*. **35**:386-391.

Borucki, M., Peppin, J., White, D., Loge, F. and Call, D., 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*.**69**:7336-7342.

Buchanan, R., Gorris, L., Hayman, M., Jackson, T. and Whiting, R. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. **75**: 1-13.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J. Mol. Endocrinol*. **34**:597–601

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States. 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010. **59** :973-9

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2021. Personas en riesgo de una infección por *Listeria*. [online] Available at: <<https://www.cdc.gov/spanish/listeria/risk.html>> [Fecha de acceso: 23 September 2021].

Chang, Y., Gu, W., Fischer, N. and McLandsborough, L. 2011. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **93**:2051-2062.

Chari, N.; Felix, L.; Davoodbasha, M.; Ali, A.S., Nooruddin, T. 2017. In vitro and in vivo antibiofilm effect of copper nanoparticles against aquaculture pathogens. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **10**:336–341

Chattopadhyay, M. 2006. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences*. **31**: 157-165.

Chen, Y., Chen, Y., Pouillot, R., Dennis, S., Xian, Z., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Lindsay, J., Hammack, T., Allard, M., Van Doren, J. and Brown, E. 2020. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010-2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS ONE*. **15**: 0231393.

Chen, L., Köseoğlu, V., Güvener, Z., Myers-Morales, T., Reed, J., & D'Orazio, S. 2014. Cyclic di-GMP-dependent signaling pathways in the pathogenic Firmicute *Listeria monocytogenes*. *Plos Pathogens*, **10**: e1004301

Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S. and Ianieri, A. 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens*. **6**: 41.

Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., Figueroa, G, González, M., Latorre, M., Reyes-Jara, A. 2015. Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 1-9.

da Silva, E. and De Martinis, E. 2012. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**: 957-968.

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**: 1552–1561.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. and Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**:3819-3822.

- Durack, J., Ross, T. and Bowman, J. 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**: 73603.
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S. 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. Appl. Environ. Microbiol. **83**:01046-17.
- Fagerlund, A., Heir, E., Møretrø, T., & Langsrud, S. 2020. *Listeria Monocytogenes* biofilm removal using different commercial cleaning agents. Molecules. **25**: 792.
- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F., Zhao, H., Zhang, C. and Bie, X., 2020. Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. Food Research International. **137**: 109405.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution **39**:783-791.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. J. Food Prot. **77**: 150–170
- França, A., Bento, J. and Cerca, N. 2012. Variability of RNA quality extracted from biofilms of foodborne pathogens using different kits impacts mRNA quantification by qPCR. Current Microbiology. **65**:54-59.
- Garmyn, D., Gal, L., Lemaître, J., Hartmann, A. and Piveteau, P. 2009. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*. Communicative & Integrative Biology. **2**: 371-374.
- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A. and Piveteau, P. 2012. *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent *agr* regulation and suggests overlaps with other regulons. PLoS ONE. **7**:43154.
- Ghasemian, E., Naghoni, A., Rahvar, H., Kialha, M. and Tabaraie, B. 2015. Evaluating the effect of copper nanoparticles in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Jundishapur Journal of Microbiology. **8**: 17430.
- Giachino, A. and Waldron, K. 2020. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. Molecular Microbiology. **114**:377-390.
- Gomes, I., Simões, M. and Simões, L. 2020. Copper surfaces in biofilm control. Nanomaterials. **10**:2491.

Harvey, J., Keenan, K.P., Gilmour, A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* **24**:380-92.

Hemdan, B., El-Liethy, M., ElMahdy, M. and EL-Taweel, G. 2019. Metagenomics analysis of bacterial structure communities within natural biofilm. *Heliyon.* **5**: 02271.

Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W., Kalbitzer, R. 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **64**: 1457-1470.

Hingston, P., Truelstrup Hansen, L., Pombert, J. and Wang, S. 2019. Characterization of *Listeria monocytogenes* enhanced cold-tolerance variants isolated during prolonged cold storage. *International Journal of Food Microbiology.* **306**: 108262.

Jacobs, R., Teunis, P., & van de Kasstele, J. 2020. Tracing the Origin of Food-borne Disease Outbreaks. *Epidemiology.* **31(3)**: 327–333.

Jordan, K. and McAuliffe, O. 2018. *Listeria monocytogenes* in foods. *Biological Emerging Risks in Foods.* **1**:181-213.

Jordan, S., Perni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., Aldsworth, T., Adriaio, A., Faleiro, M., Shama, G. and Andrew, P. 2008. *Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* **74**:5451-5456.

Junttila, S., Lim, K. and Rudd, S. 2009. Optimization and comparison of different methods for RNA isolation for cDNA library construction from the reindeer lichen *Cladonia rangiferina*. *BMC Research Notes.* **2**:204.

Kadam, S., den Besten, H., van der Veen, S., Zwietering, M., Moezelaar, R. and Abee, T. 2013. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology.* **165**: 259-264.

Khan, S.T.; Ahamed, M.; Al-Khedhairy, A.; Musarrat, J. 2013. Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Mater. Lett.* **97**:67-70.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.

Kočan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V. and Bott, M., 2006. Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the Phos-Phor system in the phosphate starvation response. *Journal of Bacteriology.* **188**:724-732.

Kragh, M., Muchaamba, F., Tasara, T. and Truelstrup Hansen, L. 2020. Cold-shock proteins affect desiccation tolerance, biofilm formation and motility in *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. **329**:108662.

Köseoğlu, V., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z., Lehmann, T., Miller, K. and Gomelsky, M. 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di- GMP -dependent regulation. Molecular Microbiology. **96**:728-743.

Landolt, L., Marti, H., Beisland, C., Flatberg, A. and Eikrem, O. 2016. RNA extraction for RNA sequencing of archival renal tissues. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. **76**:426-434.

Lee, B., Cole, S., Badel-Berchoux, S., Guillier, L., Felix, B., Krezdorn, N., Hébraud, M., Bernardi, T., Sultan, I. and Piveteau, P. 2019. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. Frontiers in Microbiology. **10**.

Lee, B., Hébraud, M. and Bernardi, T. 2017. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. Frontiers in Microbiology. **8**.

Lee, Y.J. and Wang, C. 2020. Proteomic analysis reveals the temperature-dependent presence of extracytoplasmic peptidases in the biofilm exoproteome of *Listeria monocytogenes* EGD-e. J. Microbiol. **58**:761-771.

Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S., & Lecuit, M. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. International Journal of Food Microbiology. **147**: 74–77.

Lecuit, M. 2020. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. Cellular Microbiology. **22**.

Lemon, K., Higgins, D. and Kolter, R. 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Journal of Bacteriology. **189**:4418-4424.

Lemon, K., Freitag, N. and Kolter, R., 2010. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Journal of Bacteriology. **192**: 3969-3976.

Lin, H., Wang, C., Zhao, H., Chen, G. and Chen, X. 2020. A subcellular level study of copper speciation reveals the synergistic mechanism of microbial cells and EPS involved in copper binding in bacterial biofilms. Environmental Pollution. **263**:114485.

- Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* **55**: 645–659.
- Lomonaco, S., Nucera, D., and Filipello, V. 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol.* **35**: 172–183.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J. and Li, M. 2019. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine.* **14**:11.
- Lu, J., Struewing, I., Buse, H., Kou, J., Shuman, H., Faucher, S. and Ashbolt, N. 2013. *Legionella pneumophila* transcriptional response following exposure to CuO nanoparticles. *Applied and Environmental Microbiology.* **79**:2713-2720.
- 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*. *Current Microbiology*, **67(3)**: 372–378.
- Marsh, E., Luo, H. and Wang, H. 2003. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiology Letters.* **228**:203-210.
- Mastronicolis, S. K., A. Boura, A. Karaliota, P. Magiatis, N. Arvanitis, C. Litos, A. Tsakirakis, P. Paraskevas, Moustaka, H., Heropoulos, G. 2006. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids. *Food Microbiology.* **23**: 184-194.
- Mellmann, A., Bletz, S., Böking, T., Kipp, F., Becker, K., & Schultes, A., Prior, K. Harmsen, D. 2016. Real-Time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *Journal Of Clinical Microbiology.* **54**: 2874-2881.
- Miladi, H., Ammar, E., Ben Slama, R., Sakly, N., Bakhrouf, A. 2013. Influence of freezing stress on morphological alteration and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*: Relationship with cell surface hydrophobicity and membrane fluidity. *Arch. Microbiol.* **195**: 705–715
- Monds, R.D., Silby, M.W., Mahanty, H.K. 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**: 415–426.
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R.M., 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**: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00384>
- Møretrø, T. and Langsrud, S. 2017. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **16**:1022-1041.

Muchaamba, F., Stephan, R., Tasara, T. 2021. *Listeria monocytogenes* cold shock proteins: Small proteins with a huge impact. *Microorganisms*. **9(5)**:1061

Oloketuyi, S. and Khan, F. 2017. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms-current knowledge and future outlooks. *Journal of Basic Microbiology*. **57**:728-743.

Organización mundial de la Salud. 2021. Foodborne diseases. [online] Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2> [Fecha de acceso 26 Noviembre 2021].

Orsi, R.H., de Bakker, H.C., and Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* **301**: 79–96.

O'Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49–79.

O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295–304.

Oxaran, V., Dittmann, K., Lee, S., Chaul, L., Fernandes de Oliveira, C., Corassin, C., Alves, V., De Martinis, E. and Gram, L. 2018. Behavior of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in mixed-species biofilms exposed to biocides. *Applied and Environmental Microbiology*. **84**.

Paduro, C., Montero, D., Chamorro, N., Carreño, L., Vidal, M. and Vidal, R. 2020. Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017. *Food Microbiology*.**85**:103280.

Pan, Y., Breidt, F. and Gorski, L. 2010. Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 1433-1441.

Pan, Y., Breidt, F. and Kathariou, S. 2009. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 5846-5852.

Piercey, M., Hingston, P. and Truelstrup Hansen, L. 2016. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15°C. *International Journal of Food Microbiology*. **223**:63-74.

Pieta, L., Garcia, F., Riboldi, G., de Oliveira, L., Frazzon, A. and Frazzon, J. 2014. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. *Annals of Microbiology*. **64**:1707-1714.

Piveteau, P., Depret, G., Pivato, B., Garmyn, D. and Hartmann, A. 2011. Changes in gene expression during adaptation of *Listeria monocytogenes* to the soil environment. PLoS ONE. **6**: 24881.

Popowska, M. 2004. Analysis of the peptidoglycan hydrolases of *Listeria monocytogenes*: multiple enzymes with multiple functions. Pol J Microbiol. **53**:29-34.

Prather, V., 2021. CDA Press Releases: March 25, 2008, U.S. EPA Approves Registration of Antimicrobial Copper Alloys. [online] Copper.org. Disponible en: <https://www.copper.org/about/pressreleases/2008/pr2008_Mar_25.html> [Fecha de acceso: 14 de Agosto 2021].

Quesille-Villalobos, A., Parra, A., Maza, F., Navarrete, P., González, M., Latorre, M., Toro, M. and Reyes-Jara, A. 2019. The combined effect of cold and copper stresses on the proliferation and transcriptional response of *Listeria monocytogenes*. Frontiers in Microbiology. **10**: 612.

RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. Boston, MA: RStudio, Inc. Available at: <http://www.rstudio.com/>

Reis-Teixeira, F., Alves, V. and de Martinis, E. 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. Brazilian Journal of Microbiology. **48**: 587-591.

Reyes-Jara, A., Latorre, M., López, G., Bourgoigne, A., Murray, B., Cambiazo, V. and González, M. 2010. Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *Enterococcus faecalis* to copper exposure. BioMetals. **23**:1105-1112.

Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., and Piveteau, P. 2008. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. Appl Environ Microbio. **74**: 4491–4497.

Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., and Guzzo, J. 2007. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. Appl Environ Microbiol **73**: 6125–6133.

Renier, S., Hébraud, M. and Desvaux, M. 2010. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. Environmental Microbiology. **13**:835-850.

Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H. and Azeredo, J. 2011. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica enteritidis* biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. Microbial Drug Resistance. **17**:181-189.

Römling, U. and Amikam, D. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr Opin Microbiol **2**:218–228

Rozen, S. and Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*. **1**:365-386.

Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H., Allerberger, F., Harmsen, D. and Mellmann, A. 2015. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. **53**: 2869-2876.

Ryan, M., Stucky, M., Wakefield, C., Melott, J., Akbani, R., Weinstein, J. and Broom, B., 2020. Interactive clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps. *F1000Research*. **8**: 1750.

Salazar, J., Wu, Z., Yang, W., Freitag, N., Tortorello, M., Wang, H. and Zhang, W. 2013. Roles of a novel *crp/fnr* family transcription factor *Imo0753* in soil survival, biofilm production and surface attachment to fresh produce of *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*. **8**:75736.

Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**:406-425.

Santiago-Vázquez, L.Z. 2006. Comparison of two total RNA extraction protocols using the marine gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* and its symbiont *Symbiodinium* sp. *Electron J. Biotechnology*. **9**:598–603

Santos, T., Viala, D., Chambon, C., Esbelin, J. and Hébraud, M. 2019. *Listeria monocytogenes* biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. *Frontiers in Nutrition*. **6**.

Sela, S., Frank, S., Belausov, E. and Pinto, R. 2006. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:5653-5658.

Silva, D., Tavares, R., & Nero, L. 2020. Interference of sanitizers, NaCl and curing salts on *Listeria monocytogenes* adhesion and subsequent biofilm formation. *Letters In Applied Microbiology*. **71**: 438-443.

Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N., & Paluszak, Z. 2018. Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*. **21**:23–33.

Song, S., Bae, D., Lim, K., Griffiths, M., Oh, S. 2014. Cold stress improves the ability of *Lactobacillus plantarum* L67 to survive freezing. *International Journal of Food Microbiology*. **191**: 135-143.

Sun, Y., Koumoutsis, A. and Darby, C. 2009. The response regulator PhoP negatively regulates *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* biofilms. FEMS Microbiology Letters. **290**: 85-90.

Suo, Y., Huang, Y., Liu, Y., Shi, C., Shi, X. 2012. The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b. PLoS ONE. **7**: 48467.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution. **38**: 3022-3027.

Tavares, L., Alves, P., Ferreira, R., Santos, C.N. 2011. Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. BMC Res Notes. **1**:140

Tomicic, R., Cabarkapa, I., Vukmirovic, D., Levic, J., & Tomicic, Z. 2016. Influence of growth conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. Food And Feed Research, **43**:19-24

Vivant, A., Garmyn, D., Gal, L., & Piveteau, P. 2014. The Agr communication system provides a benefit to the populations of *Listeria monocytogenes* in soil. Frontiers In Cellular And Infection Microbiology. **4**.

Veen, S. and Abee, T. 2010. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 7854-7860

Wassinger, A., Zhang, L., Tracy, E., Munson, R., Kathariou, S., Wang, H. 2013 Role of a GntR-family response regulator LbrA in *Listeria monocytogenes* biofilm formation. PLoS ONE. **8**:70448

Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. **39**:223–235

Yadav, M., Chae, S. and Song, J. 2012. Effect of 5-azacytidine on in vitro biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Pathogenesis. **53**:219-226.

Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Choi, S. 2015. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. Food research International. **72**: 25-36.

Zhu, X., Liu, W., Lametsch, R., Aarestrup, F., Shi, C., She, Q., Shi, X. and Knøchel, S. 2011. phenotypic, proteomic, and genomic characterization of a putative ABC-transporter permease involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Foodborne Pathogens and Disease. **8**: 495-501.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla S1. Aislados de *Listeria monocytogenes* utilizados en este estudio.

Aislado	Fuente	Detalle de la fuente	MLST	Serogrupo*	Serotipo	Linaje
EGD-e	Animal	—	CC9	IIa	1/2a	II
Imo594-1	Agua	Agua de canal	ST36	IIa	1/2a	II
Imo655-1	Agua	Agua superficial	CC37	IIa	1/2a	II
Imo348-1	Agua	Agua de arroyo	CC7	IIa	1/2 a	II
Imo221-1	Agua	Agua de canal	CC37	IIa	1/2a	II
Imo405-1	Agua	Agua de río	CC26	IIa	1/2a	II
BS3-2	Alimentos	—	ST14 5	IV b	4b	I
Imo689-1	Agua	Agua superficial	CC39 2	II b	1/2b	I
Imo664-1	Agua	Agua superficial	CC2	IV b	4b	I
Al157-12	Alimentos	—	CC3	II b	1/2b	I
Imo128-1	Agua	Agua de canal	CC3	II b	1/2b	I
List2-2	Alimentos	—	ST14	IIa	1/2a	II

Imo186-1	Agua	Agua de río	CC14	IIa	1/2a	II
Imo638-1	Agua	Agua superficial	CC1	IV b	4b	I
Imo804-1	Agua	Agua superficial	CC59	II b	1/2b	I
Imo139-2	Agua	Agua de arroyo	ST73 6	II b	1/2b	I
AI152-2A		—	ST5	II b	1/2b	I
Imo115-1	Agua	Agua de arroyo	CC5	II b	1/2b	I
Imo642-1	Agua	Agua superficial	ST27 9	IV b	4b	I
Imo640-1	Agua	Agua superficial	CC6	IV b	4b	I
Imo656-1	Agua	Agua superficial	CC6	IV b	4b	I

*Los serogrupos IIa (serotipo 1/2a y 3a), IIb (1/2b, 3b y 7), IIc (1/2c y 3c), y IVb (4b, 4ab, 4d, y 4e) se determinaron por ensayo de PCR multiplex en investigaciones previas del Laboratorio de Microbiología y probióticos del INTA (Doumith y col., 2004).

Tabla S2. Lista de genes (n=99) de *L. monocytogenes* encontrados en la literatura.

Gen	COG	Función específica	Referencia
<i>Imo2638</i>	C	NADH deshidrogenasa	(Assisi, 2020)

<i>ackA (Imo1581)</i>	C	Acetato kinasa	(Assisi, 2020)
<i>Imo1057</i>	C	L-lactato deshidrogenasa	(Assisi, 2020)
<i>pycA (Imo1072)</i>	C	Piruvato carboxilasa	(Assisi, 2020)
<i>eutD (Imo2103)</i>	C	Fosfato acetiltransferasa	(Assisi, 2020)
<i>pdhA (Imo1052)</i>	C	Componente E1 de piruvato deshidrogenasa	(Assisi, 2020)
<i>pdhD (Imo1055)</i>	C	Dihidrolipoil deshidrogenasa	(Assisi, 2020)
<i>pdhB (Imo1053)</i>	C	Componente E1 de la piruvato-deshidrogenasa subunidad beta	(Assisi, 2020)
<i>pflB(Imo1406)</i>	C	Formiato acetiltransferasa	(Assisi, 2020)
<i>pflA (Imo1907)</i>	C	Formiato acetiltransferasa	(Assisi, 2020)
<i>Imo1634</i>	C	AcetaldheidoCoA/alcohol deshidrogenasa bifuncional	(Assisi, 2020)
<i>citC (Imo1566)</i>	C	Isocitrato deshidrogenasa	
<i>citB (Imo1641)</i>	C	Aconitato hidratasa	(Alonso, 2014)
<i>Imo1386</i>	D	DNA translocasa	(Jordan, 2008)
<i>asnB (Imo1663)</i>	E	Asparagina sintasa (glutamina-hidrolizante)	(Alonso, 2014)
<i>hom (Imo2547)</i>	E	Homoserina deshidrogenasa	(Alonso, 2014)
<i>glfB (Imo1734)</i>	E	Glutamato sintasa subunidad grande	

<i>purD (Imo1764)</i>	F	Fosforribosilamina - glicina ligasa	(Alonso, 2014)
<i>purN (Imo1766)</i>	F	Fosforribosil-glicinamida formiltransferasa	(Alonso, 2014)
<i>purH (Imo1765)</i>	F	Fosforribosilaminoimi dazolcarboxamida formiltransferasa / IMP ciclohidrolasa bifuncional	(Alonso, 2014)
<i>purA (Imo0055)</i>	F	Adenilosuccinato sintetasa	(Alonso, 2014)
<i>Imo0372</i>	G	Similar a beta-glucosidasa	(Chang, 2011)
<i>Imo0182</i>	G	Similar a alfa-xilosidasa y alfa-glucosidasa	(Luo, 2013)
<i>nagA (Imo0956)</i>	G	N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa	(Assisi, 2020)
<i>Imo2096</i>	G	Sistema PTS específico de galactitol componente IIC	(Assisi, 2020)
<i>Imo0096</i>	G	Similar al sistema PTS específico de manosa, factor IIAB	(Luo, 2013)
<i>plsX (Imo1809)</i>	I	glicerol-3-fosfato aciltransferasa	(Alonso, 2014)
<i>Imo0788</i>	I	Proteína hipotética	(Luo, 2013)
<i>tufA (Imo2653)</i>	J	Factor Elongación de la traducción	(Assisi, 2020)
<i>prfA (Imo2543)</i>	J	Factor de liberación de la cadena de péptidos 1	(Lemon, 2010)
<i>raiA (Imo2511)</i>	J	Proteína de modulación Sigma-54	(Assisi, 2020)
<i>comK (Imo2270)</i>	J	Proteína de competencia	(Assisi, 2020)

<i>rpoD (Imo1454)</i>	K	RNA polimerasa factor sigma	(Assisi, 2020)
<i>Imo1878</i>	K	Regulador transcripcional del transporte de manganeso	(Chang, 2011)
<i>nusG (Imo0246)</i>	K	Proteína antiterminación	(Chang, 2011)
<i>rpoA (Lmo2606)</i>	K	Subunidad alfa de la ARN polimerasa dirigida por ADN	(Luo, 2013)
<i>Imo2142</i>	K	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>addB (Imo2286)</i>	L	Subunidad B de nucleasa dependiente de ATP	(Assisi, 2020)
<i>uvrA (Imo2488)</i>	L	Excinucleasa A	(Luo, 2013)
<i>uvrB (Imo2489)</i>	L	Excinucleasa B	(Luo, 2013)
<i>uvrC (Imo1234)</i>	L	Excinucleasa C	(Luo, 2013)
<i>recO (Imo1460)</i>	L	Proteína de reparación de DNA	(Luo, 2013)
<i>Imo1081</i>	M	Similar a la glucosa-1-fosfato timidil transferasa	(Luo, 2013)
<i>murG (Imo2035)</i>	M	Similar a las enzimas de síntesis de peptidoglicanos, fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido-transferasa putativa	(Luo, 2013)
<i>Imo1666</i>	M	Proteína relacionada a peptidoglicano	(Chen, 2020)
<i>srtA (Imo2185)</i>	M	Similar a sortasa A	(Bierne et al. 2002)

<i>Imo0688</i>	M	Proteína hipotética	(Luo, 2013)
<i>yneA (Imo1303)</i>	M	Factor de respuesta a SOS	(Luo, 2013)
<i>capA (Imo0516)</i>	M	Proteína de síntesis de poli-gamma-glutamato	(Assisi, 2020)
<i>Imo2504</i>	M	Proteína de unión a la pared celular	(Chen, 2020)
<i>Imo0644</i>	M	Proteína sulfatasa de membrana	(Chang, 2011)
<i>dltB (Imo0973)</i>	M	Proteína de esterificación de D-alanina de ácido lipoteicoico y ácido teicoico de pared	(Alonso, 2014)
<i>bapL (Imo0435)</i>	M	Proteína de unión a peptidoglicano	(Chen, 2020)
<i>flgK (Imo0705)</i>	N	Proteína asociada al gancho flagelar	(Alonso, 2014)
<i>fliP (Imo0676)</i>	N	Proteína de biosíntesis fagelar	(Chang, 2011)
<i>flgE (Imo0697)</i>	N	Proteína de gancho flagelar	(Chang, 2011)
<i>fliG (Imo0714)</i>	N	Proteína del interruptor del motor flagelar	(Chang, 2011)
<i>flaA (Imo0690)</i>	N	Flagelina	(Du, 2017)
<i>motA (Imo0685)</i>	N	Proteína motora flagelar	(Alonso, 2014)
<i>mecA (Imo2190)</i>	N	Proteína adaptadora mecA	(Assisi, 2020)
<i>mba (Lmo1860)</i>	O	Péptido-metionina (S) -S-óxido reductasa	(Assisi, 2020)
<i>ftsH(Imo0220)</i>	O	Proteasa de división celular	(Assisi, 2020)

<i>dnaK (Imo1473)</i>	O	Chaperona molecular	(Luo, 2013)
<i>kat (Imo2785)</i>	P	Catalasa	(Alonso, 2014)
<i>dltA (Imo0974)</i>	Q	D-alanina - poli (fosforibitol) ligasa subunidad 1	(Alonso, 2014)
<i>sepA (Imo2157)</i>	Q	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo2677</i>	R	Alfa/beta Hidrolasa	(Assisi, 2020)
<i>Imo0625</i>	R	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo2437</i>	R	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>yhaM (Imo2220)</i>	R	3'-5' exoribonucleasa	(Assisi, 2020)
<i>Imo2829</i>	R	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>actA(Imo0204)</i>	R	Precursor de proteína inductora de ensamblaje de actina	(Travier,2013)
<i>Imo2254</i>	R	Transportador MFS de la familia AGZA permeasa de xantina / uracilo	(Assisi, 2020)
<i>Imo2738</i>	R	Hemolisina	(Assisi, 2020)
<i>hrcA (Imo1457)</i>	S	Proteína de respuesta de choque térmico de clase I	(Luo, 2013)
<i>inIL (Imo2026)</i>	S	Internalina L	(Chen, 2020)
<i>mpl (Imo0203)</i>	S	Precursor de Zinc metaloproteinasas	(Luo, 2013)
<i>Imo1069</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)

<i>Imo1707</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo2255</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>tmRNA</i>	S	ncRNA	(Assisi, 2020)
<i>Imo0647</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo2339</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo1649</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>Imo2439</i>	S	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)
<i>spoVG</i> (<i>Imo0196</i>)	S	Proteína G de esporulación en estadio V	(Assisi, 2020)
<i>Imo0673</i>	S	Proteína hipotética	(Chen, 2020)
<i>hly (Imo0202)</i>	S	Listeriolisina O	(Assisi, 2020)
<i>InIA (Imo0433)</i>	S	Internalina A	(Bonsaglia, 2014)
<i>Imo2326</i>	S	Similar a la proteína gp41 [Bacteriófago A118]	(Luo, 2013)
<i>resE (Imo1947)</i>	T	Similar a sensor histidina kinasa de dos componentes	(Bonsaglia, 2014)
<i>pocR (Imo1150)</i>	T	Regulador transcripcional	(Assisi, 2020)
<i>phoR (Imo2500)</i>	T	Sensor histidina kinasa de dos componentes	(Alonso, 2014)
<i>rbsU (Lmo0892)</i>	T	Muy similar a la serina fosfatasa RsbU	(Luo, 2013)

<i>Imo1270</i>	U	Peptidasa señal de tipo I	(Alonso, 2014)
<i>Imo0583</i>	U	Amidohidrolasa de N-acil-L-aminoácido	(Assisi, 2020)
<i>Imo0540</i>	V	Proteína hipotética	(Assisi, 2020)

Tabla S3. Características genéticas de los aislados seleccionados para análisis de formación de biopelículas.

Aislado	Serogrupo	Grupo	N° de genes presentes	Genes indirectos ausentes
Lmo405-1	Ila	Grupo A	114	<i>addB Imo2326 Imo0149 bapL Imo2829</i>
Lmo348-1	Ila	Grupo A	116	<i>Imo2326 Imo0149 bapL</i>
Lmo221-1	Ila	Grupo A	115	<i>addB Imo2326 Imo0149 bapL</i>
List2-2	Ila	Grupo A	116	<i>addB Imo2326 Imo0149</i>
Lmo186-1	Ila	Grupo A	116	<i>addB Imo2326 Imo0149</i>
Lmo594-1	IIb	Grupo B	105	<i>addB Imo2326 dnaK rpoA yneA pflaA Imo2677 comK recO rese Imo0149 bapL actA dgcC</i>
Lmo139-1	IIb	Grupo B	105	<i>addB Imo2326 dnaK rpoA yneA pflaA Imo2677 comK recO rese Imo0149 bapL actA dgcC</i>
AI152-2^a	IIb	Grupo B	105	<i>dnaK rpoA yneA pflaA Imo2677 comK recO rese Imo0149 bapL actA fstH Imo2829 dgcC</i>

Lmo115-1	IIb	Grupo B	104	<i>lmo2326 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO rese lmo0149 bapL actA fstH lmo2829 dgcC</i>
Lmo804-1	IIb	Grupo C	106	<i>addB rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL actA lmo2829 dgcC</i>
AI157-12	IIb	Grupo C	105	<i>addB lmo2326 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL lna dgcC</i>
Lmo640-1	IVb	Grupo C	104	<i>addB lmo2326 lmo1081 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL lmo2829 dgcC</i>
Lmo656-1	IVb	Grupo C	104	<i>addB lmo2326 lmo1081 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL lmo2829 dgcC</i>
Lmo642-1	IVb	Grupo D	104	<i>addB lmo2326 lmo1081 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL fstH dgcC</i>
Bs3-2	IVb	Grupo D	104	<i>addB lmo2326 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL fstH lmo2829 dgcC</i>
Lmo664-1	IVb	Grupo D	104	<i>addB lmo2326 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL fstH lmo2829</i>
Lmo689-1	1/2b	Grupo D	106	<i>addB lmo2326 dnaK rpoA yneA pflaA lmo2677 comK recO resE lmo0149 bapL fstH</i>

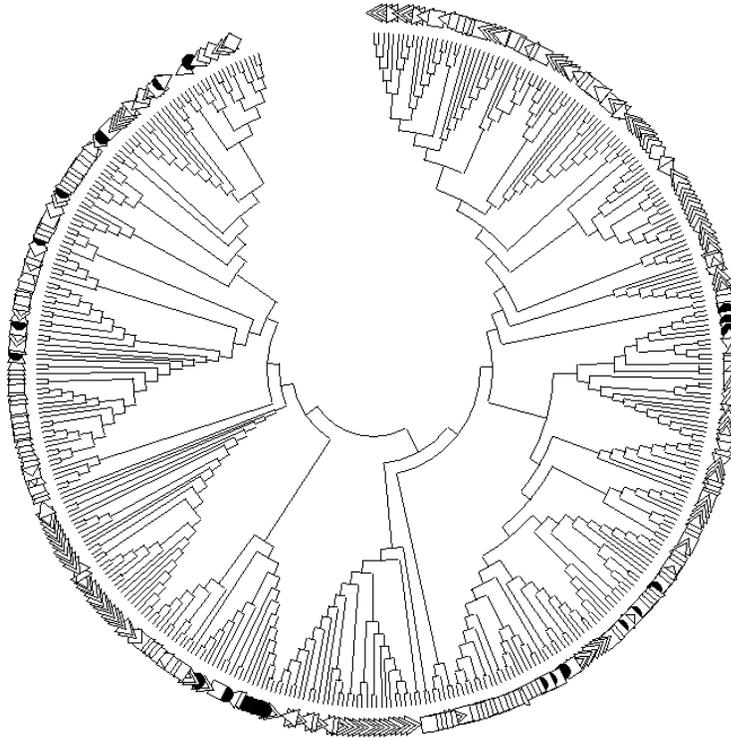


Figura S1. Análisis filogenético de los genomas de *L. monocytogenes* (n=422). En la figura se destaca el origen de los aislados . Se asignó una figura geométrica a cada origen de aislamiento de los genomas: Clínica (rombo), Ambiente (Circulo negro), Alimentos (cuadrado) y Aguas (triángulo). El árbol fue construido usando el método de *Neighbour joining* en SNPs del *core genome*.

Tabla S4. Valores de pureza y concentración de extracciones de RNA obtenidos desde cepas de *L. monocytogenes* (Imo115-1 y Imo221-1) en estado de biopelículas. Las extracciones fueron realizadas por triplicado

	Aislado	Condic ión	Cuantificación de biopelículas	[ηg/μl]	A260/2 80	A260/230	Extracción
A	Imo221-1	8°C	0,3088	138	1,426	0,51	
B	Imo221-1	8°C		554	1,6	0,614	
C	Imo221-1	8°C		513,2	1,588	0,59	
D	Imo221-1	8°C+Cu	0,3165	298,8	1,504	0,567	
E	Imo221-1	8°C+Cu		389,2	1,527	0,531	
F	Imo221-1	8°C+Cu		356,8	1,499	0,512	
G	Imo221-1	37°C	2,0188	525,2	1,571	0,579	
H	Imo221-1	37°C		583,2	1,593	0,613	
I	Imo221-1	37°C		124	1,378	0,491	SI
J	Imo221-1	37°C+ Cu	1,3974	221,6	1,406	0,524	
K	Imo221-1	37°C+ Cu		279,6	1,427	0,513	

L	lmo221-1	37°C+ Cu		111,6	1,261	0,287	
M	lmo115-1	8°C	0,1701	207,2	1,381	0,497	
N	lmo115-1	8°C		410,4	1,507	0,501	
O	lmo115-1	8°C		232,4	1,4	0,509	
P	lmo115-1	8°C+Cu	0,5314	649,2	1,593	0,655	
Q	lmo115-1	8°C+Cu		176,8	1,386	0,48	
R	lmo115-1	8°C+Cu		436	1,678	0,688	
S	lmo115-1	37°C	2,547	572,4	1,569	0,625	SI
T	lmo115-1	37°C		776,4	1,59	0,911	
U	lmo115-1	37°C		504	1,542	0,523	SI
V	lmo115-1	37°C+ Cu	3,105	352,4	1,456	0,529	
W	lmo115-1	37°C+ Cu		446,8	1,489	0,571	
X	lmo115-1	37°C+ Cu		562	1,544	0,595	

Tabla S5. Lista de partidores diseñados para futuros análisis de expresión genética en biopelículas de *L. monocytogenes*.

ID Gen (nombre)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)
<i>flaA</i> (<i>lmo0690</i>)	TAGGTGCTGGTA TGAGTCGC	TTTCGGACAT TTCAGCAGCC	60	119
<i>luxS</i> (<i>lmo1288</i>)	CAATGGGATGTC AAACAGGCTT	CCAACCGCAT TGGACTTCAT	60	143
<i>prfA</i> (<i>lmo2543</i>)	TTGCCAGAAGC GGAAGAAGT	GCAAAATTGC TACAGTCGCT	58	150
<i>nusG</i> (<i>lmo0246</i>)	CATTCGCTGACT TCTCCGGTA	AATCCACTTC GACTGGCGTT	60	105
<i>lmo0644</i>	CGGTGAGGTTG GCGTAGTTA	CGGCTAGTTA GGCGGAATGA	62	150
<i>fliG</i> (<i>lmo0714</i>)	CCGCGAACATTT ACAACGCT	GAATATCTAG CGCGGTTTCG C	60	110
<i>citB</i> (<i>lmo1641</i>)	CAGACGGCGAA TTTGTAGCG	CTGCTTCAAT ACCGCCAACG	62	111
<i>motA</i> (<i>lmo0685</i>)	ATGCCGGACAA AGTGGATGT	CTAAGCGCAT GCCTCGTTTC	62	133
<i>phoR</i> (<i>lmo2500</i>)	CCCCCGTGACA GCTCTTAAA	TAAACGGTG CAATCGGTCTG	60	123

<i>rpoA</i> (<i>Imo2606</i>)*	CGACTCGTGGT CGTGGTTAC	ACTGCTTCTT CTGGGCTGAT AC	60	205
<i>rpoB</i> (<i>Imo0258</i>)*	ATGCTTTCCGCA GACGAAGA	TTTCAGCGGC TGCATTTTCC	60	112
<i>ldh</i> (<i>Imo0210</i>)*	CGACGGAGCAG TTGGTTCTA	TTTGAGCAGT ACCGGCAGTT	60	208
<i>pocR</i> (<i>Imo1150</i>)	AATATCGCCCGC AACTTAGG	CTCGGTAGCC TTTTGGAGTG	62	91
<i>pflaA</i> (<i>Imo1917</i>)	GCCAACATGGG ATTCGGTAT	TATGCACTGG GGAGTTACCA	60	310
<i>Imo1634</i>	AGCAGAAGCATT CGATCGTT	ACCAAGTGTT AGGGAAGGGA	60	202
<i>pdhB</i> (<i>Imo1053</i>)	GCGCAAAAACAA GCAGGTAT	CTATCTGGAG CAGCAACTCG	62	194
<i>Imo0583</i>	TGGATGTCGTG GTAATCCCT	TCGCTCCGTT CCAATTACAG	58	377
<i>Imo2439</i>	TTAAAATCACAA CGGACGGC	TCTGCTGCTT TAGAGGGAAC	60	220

*Genes housekeeping