



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Pregrado

**“Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en biopelículas mixtas: evaluación de la interacción del patógeno con otras especies bacterianas encontradas comúnmente en la industria alimentaria”**

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

**Catalina Belén Jara Araya**

Director del Seminario de Título: Dra. Angélica Reyes Jara

Patrocinante del Seminario de Título: Francisco Chávez

Marzo 2023

Santiago-Chile

## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta) Catalina Belén Jara Araya**

**“Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en biopelículas mixtas: evaluación de la interacción del patógeno con otras especies bacterianas encontradas comúnmente en la industria alimentaria”**

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

*Dra. Angélica Reyes Jara*

**Directora Seminario de Título**

---

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

*Dra. Rosalba Lagos Mónaco*

**Presidenta Comisión**

---

*Dr. Rodrigo Pulgar Tejo*

**Corrector**

---

Santiago de Chile, .....Marzo 2023.....

## BIOGRAFÍA



Me llamo Catalina Jara y nací en Santiago un 15 de agosto de 1997. Desde pequeña fui una estudiante aplicada, pero durante la adolescencia me di cuenta de que quería dedicarme a las ciencias ligadas a la biología. El año 2014, asistí a una Escuela de Verano de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y descubrí lo mucho que me gustaban las actividades prácticas de laboratorio, además de verme siempre influenciada por mi hermana mayor. Entrar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular significó redescubrir muchas de mis habilidades, indagar en múltiples áreas donde me podría desenvolver y además crear lazos con amistades que me enseñaron a estudiar desde el compañerismo y no la competencia. A la vez, durante esos años comencé a practicar una disciplina que hasta la actualidad sigo realizando, y que me permitió sobrellevar los desafíos académicos de una manera más sana tanto física como mentalmente: el yoga. Por último, durante el tercer año de la carrera comencé a interesarme en el área de la microbiología, comenzando a ser pasante del laboratorio donde realicé este trabajo de investigación, junto a la profesora Angélica Reyes. Es en esta área donde me proyecto a futuro.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, a mi papá y a mi hermana.

Y a todas las personas que me han acompañado

en este largo camino.

## AGRADECIMIENTOS

Primero, quisiera agradecer profundamente a mis compañeras y compañeros de laboratorio, por el ambiente ameno, por ayudarme incansablemente, por responder cada una de mis dudas y guiarme para salir de aprietos. Mención honrosa a Camila Solar y Ángel Parra, quienes, con sus conocimientos y conversaciones cargadas de risas, hicieron de este un proceso mucho más llevadero. A María Elena y Paty del laboratorio de servicios, quienes nunca se negaron a responder mis preguntas y guiarme sobre todo en mis primeros pasos. Y por supuesto a mi profesora tutora, Angélica Reyes, por recibirme con los brazos abiertos y nunca dejar de creer en mí.

A mi familia, mi nido de amor y contención. A mi madre y a mi padre, por darlo todo por mí, nada de esto hubiera sido posible sin ellos. A mi hermana y compañera de vida, Daniela, la primera científica de mi familia y que me llena constantemente de inspiración. Y a mis mascotas, Cleo, Gustavo y Fiona; ellos no lo saben, pero fueron una fuente de amor y ternura inagotable que me impulsaba a continuar.

A mis amigas y amigos de la Universidad; Amelia, Pedro, Karina, Valeria, y Efraín, con quienes viví los mejores momentos de esta etapa tan dura. Y espero de todo corazón que sigan siendo parte de mi vida. También a mi compañero Matías, con quien por fortuna me encontré durante mi último año universitario, y que supo cómo seguir mi ritmo, acompañándome de manera amorosa y comprensiva durante todo este proceso.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	11
Objetivo específico	11
2 MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Aislamiento e identificación de especies bacterianas desde la industria alimentaria	12
2.2 Selección y cultivo de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	13
2.3 Ensayos de formación de biopelículas de distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> en dos superficies	15
2.4 Ensayos de formación de biopelículas mono especie, duales y mixtas	16

2.4.1 Cuantificación total de biopelículas mixtas y duales mediante el método de cristal violeta	17
2.4.2 Cuantificación celular de biopelículas mixtas y duales por recuentos en placas	18
2.5 Ensayos transcripcionales	20
2.5.1 Selección de genes y partidores	20
2.5.2 Extracción de RNA desde biopelículas	22
2.5.3 Reacción de qPCR	23
2.6 Estadística	23
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>25</b>
3.1 Identificación y selección de especies bacterianas desde la industria salmonera	25
3.2 Ensayos de formación de biopelículas de distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> en dos superficies	27
3.3 Ensayos de formación de biopelículas monoespecie, duales y mixtas	28
3.4 Ensayos transcripcionales	38
3.4.1 Genes de formación de biopelículas y respuesta a estrés	38
3.4.2 Extracción de RNA	39
3.4.3 Búsqueda de gen normalizador	39
3.4.4 Obtención de la abundancia relativa de los genes seleccionados	40
<b>4 DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>
<b>7 MATERIAL COMPLEMENTARIO</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>L. monocytogenes</i> seleccionadas para los ensayos de formación de biopelículas.	14
<b>Tabla 2.</b> Genes de <i>L. monocytogenes</i> candidatos para ser utilizados en los ensayos transcripcionales.	21
<b>Tabla 3.</b> Identificación de especies mediante el análisis de secuencia del gen <i>rRNA 16S</i> .	26
<b>Tabla 4.</b> Valores de concentración y pureza del RNA extraído por conformación de biopelícula.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la estrategia experimental llevada a cabo en esta investigación.	12
<b>Figura 2.</b> Diseño experimental para realizar el recuento celular de las especies formadoras de biopelículas mixtas y duales.	19
<b>Figura 3.</b> Formación de biopelícula en superficies de poliestireno y acero inoxidable de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	27
<b>Figura 4.</b> Cantidad total de biopelícula formada según cepas de <i>L. monocytogenes</i> (Lm) bajas formadoras en distintas conformaciones experimentales.	29
<b>Figura 5.</b> Cantidad total de biopelícula formada según cepas de <i>L. monocytogenes</i> (Lm) altas formadoras en distintas conformaciones experimentales.	30
<b>Figura 6.</b> Recuentos UFC/ml de la cepa baja formadora de <i>L. monocytogenes</i> List2-2 según la conformación experimental de biopelículas.	31
<b>Figura 7.</b> Recuentos UFC/ml de la cepa alta formadora de <i>L. monocytogenes</i> A18/75-3 según la conformación experimental de biopelículas.	32
<b>Figura 8.</b> Recuentos UFC/ml de la cepa alta formadora de <i>L. monocytogenes</i> A18/79-3 según la conformación experimental de biopelículas.	33
<b>Figura 9.</b> Cuantificaciones totales mediante tinción con CV y recuentos celulares por cepa de <i>L. monocytogenes</i> formando biopelículas mono especie y mixtas.	34
<b>Figura 10.</b> Cantidad de células de <i>Hafnia</i> sp. en biopelículas mono especie y duales con las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	35

<b>Figura 11.</b> Cantidad de células de <i>Citrobacter</i> sp. en biopelículas monoespecie y duales con las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	36
<b>Figura 12.</b> Cantidad de células de <i>S. aureus</i> en biopelículas monoespecie y duales con las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	37
<b>Figura 13.</b> Abundancias relativas especies bacterianas en biopelículas duales y mixtas junto a cepas de <i>L. monocytogenes</i> .	38
<b>Figura 14.</b> Abundancia relativa de los genes de <i>L. monocytogenes</i> cepa List2-2 en biopelículas duales junto a <i>Hafnia</i> sp.	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDC = Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

RNA = Ácido Ribonucleico

mRNA = RNA mensajero

cDNA = DNA complementario

rRNA 16S = RNA ribosomal 16S

NCBI = National Center for Biotechnology Information

$DO_{xnm}$  = Densidad óptica a cierta longitud de onda

UFC = unidades formadoras de colonia

PCR = Reacción en Cadena de Polimerasa

qPCR = PCR cuantitativo

RT = Retrotranscripción

RNAseq = RNA sequencing

PBS = Buffer Fosfato Salino

M-MLV RT = Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) es una bacteria patógena transmitida por los alimentos y causante de listeriosis. Esta bacteria se multiplica bajo un amplio rango de condiciones ambientales, muchas de ellas utilizadas en la industria alimentaria para evitar la proliferación de patógenos. Entre los mecanismos de supervivencia más estudiados, se encuentra la formación de biopelículas, las cuales representan una fuente importante de contaminación de alimentos. Mientras la mayoría de las investigaciones se han enfocado en estudiar biopelículas monoespecie, existe evidencia de que en los ambientes naturales e industriales la conformación de estas biopelículas es predominantemente multiespecie (biopelículas mixtas). Esto cobra especial relevancia ya que se ha visto que al producirse interacciones inter-especies, el comportamiento de las especies que conforman las biopelículas mixtas difiere del comportamiento de las biopelículas de una sola especie, por ejemplo, en cuanto a una mejor tolerancia al estrés.

El siguiente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar el comportamiento de distintas cepas de *L. monocytogenes* al interactuar con otros microorganismos en biopelículas mixtas, utilizando especies bacterianas comúnmente encontradas en superficies de la industria alimentaria. Se evaluó la formación de biopelículas de 14 cepas de *L. monocytogenes*, en superficies de acero inoxidable y poliestireno mediante el método de tinción con cristal violeta (CV). A partir del análisis de estos resultados, se seleccionaron 3 cepas con alta y 3 cepas con baja capacidad formadora de biopelículas monoespecie. Paralelamente, se procesaron muestras de superficie de una planta salmonera para aislar e identificar especies bacterianas que podrían formar biopelículas junto a *L. monocytogenes*. Con un total de dos especies bacterianas y *Staphylococcus aureus* (disponible en la colección del laboratorio),

más las cepas Lmo 656-1, Lmo 186-1, List2-2, A18/75-3, A18/81-5 y A18/79-3 de *L. monocytogenes*, se llevaron a cabo experimentos de biopelículas mixtas, las cuales se cuantificaron mediante tinción con CV y el número de células en las biopelículas mediante recuento diferencial en placas. Por último, se evaluó la respuesta transcripcional de genes relacionados a la formación de biopelículas y respuesta a estrés específicos de *L. monocytogenes* cuando este patógeno se encontraba formando biopelículas con *Hafnia* sp., respecto a cuando formaba biopelículas sola.

Los resultados indicaron que tres de las 14 cepas analizadas formaron una mayor cantidad de biopelícula en acero inoxidable comparado a poliestireno, mientras que las demás cepas tuvieron un comportamiento similar en ambas superficies. A su vez, desde las muestras de la planta salmonera se aislaron e identificaron a nivel de género las bacterias *Hafnia* sp. y *Citrobacter* sp. Al evaluar el efecto de estas especies en la cantidad de biopelícula que forman junto a *L. monocytogenes*, se observó que fue menor la cantidad de biopelícula total (cuantificación mediante CV) respecto a cuando *L. monocytogenes* formó biopelículas sola. Por el contrario, los recuentos celulares en placa indicaron un mayor número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *L. monocytogenes* ( $P$  value  $<0,05$ ) que formó biopelículas acompañada en comparación a su conformación monoespecie. Esta diferencia respecto a la cuantificación de biopelículas por CV y el recuento de células pudo deberse al efecto de las otras especies en la secreción de matriz extracelular que conforma la biopelícula. Finalmente, se observó una mayor abundancia relativa del transcrito del gen *pflA* relacionado al metabolismo de carbohidratos cuando *L. monocytogenes* formó biopelículas junto a *Hafnia* sp., respecto a cuando *L. monocytogenes* formó biopelículas monoespecie. Los genes *agrD*, *lmo0644* y *sigB* no presentaron cambios en su respuesta transcripcional.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) is a foodborne pathogenic bacterium that causes listeriosis. This bacterium multiplies under a wide range of environmental conditions, many of them used in the food industry to prevent the proliferation of pathogens. Among the most studied survival mechanisms, we found the formation of biofilms, which represent an important source of food contamination. While the majority of researches has focused on studying monospecies biofilms, there is evidence that in natural and industrial environments the conformation of these biofilms is predominantly multispecies (mixed biofilms). This takes special relevance since it has been seen that when inter-species interactions occur, the behaviour of the species that make up mixed biofilms differs from the behaviour of biofilms of a single species, for example, in terms of better tolerance to stress.

The following research aimed to evaluate the behaviour of different strains of *L. monocytogenes* when interacting with other microorganism in mixed biofilms, using bacterial species commonly found on surfaces in the food industry. It was evaluated the biofilm formation of 14 strains of *L. monocytogenes*, on stainless steel and polystyrene surfaces by crystal violet (CV) staining method. From the analysis of these results, three high and three low monospecies biofilm-forming strains were selected. In parallel, samples from a surface of a salmon plant were processed to isolate and identify bacterial species that could form biofilms together with *L. monocytogenes*. With a total of 2 isolated bacterial and *Staphylococcus aureus* (available in the lab collection), plus Lmo 656-1, Lmo 186-1, List2-2, A18/75-3, A18/81-5 y A18/79-3 *L. monocytogenes* strains, mixed biofilm experiments were performed, which were quantified by the CV method and the number of cells in the biofilms by differential plate count. Finally, the transcriptional response of *L. monocytogenes*

specific genes related to biofilm formation and stress response were evaluated when this pathogen was forming biofilms with *Hafnia* sp., compared to when it formed biofilms alone.

The results indicated that three of the 14 strains analyzed formed a greater amount of biofilm on stainless steel compared to polystyrene, while for the other strains the behavior was similar on both surfaces. In turn, from the salmon plant samples, the bacteria *Hafnia* sp. and *Citrobacter* sp. were isolated and identified at the genus level. When evaluating the effect of these species on the amount of biofilm that they form together with *L. monocytogenes*, it was observed that was lower the amount of total biofilm (quantification by CV) compared to when *L. monocytogenes* formed biofilms alone. In contrast, plate cell counts indicated a higher number of colony forming units (CFU) of *L. monocytogenes* ( $P$  value  $<0,05$ ) forming accompanied biofilms compared to their monospecies conformation. This difference regarding the quantification of biofilms by CV and the cell count could be due to the effect of the other species on the secretion of the extracellular matrix that makes up the biofilm. Finally, a higher relative abundance of the transcript of the *pflA* gene related to carbohydrate metabolism was observed when *L. monocytogenes* formed biofilms together with *Hafnia* sp., compared to when *L. monocytogenes* formed monospecies biofilms. The *agrD*, *lmo0644* and *sigB* genes did not present changes in their transcriptional response.

# 1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son consideradas una importante carga de enfermedad en el mundo debido a su alta morbilidad y mortalidad mayoritariamente en grupos vulnerables, tales como menores de 5 años, embarazadas, adultos mayores y personas inmunocomprometidas. Cada año, se registran alrededor de 600 millones de casos y 420 mil muertes por consumo de alimentos contaminados. Este creciente problema de salud pública produce un impacto socioeconómico considerable, debido a la presión ejercida sobre los sistemas de atención de salud, la pérdida de productividad y el deterioro del comercio (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Aproximadamente 250 agentes causantes de ETAs han sido descritos, entre ellos bacterias, virus, parásitos, toxinas y metales (Olea y col., 2012). *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) se encuentra entre aquellos microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos causantes de ETAs. Es una bacteria Gram positiva, de forma coco-bacilar, y se caracteriza por ser ubicua; es decir, tiene una amplia distribución en la naturaleza, pudiendo ser encontrada en el agua, suelo, vegetación, heces de algunos animales incluyendo humanos, y ambientes de elaboración de alimentos (Gasánov y col., 2005; Gandhi & Chikindas, 2007).

El consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* produce listeriosis, una enfermedad con baja incidencia (entre 0,1 y 11,3 por cada un millón de habitantes en diferentes países) pero con una alta tasa de letalidad relativa promedio (de 20 % a 30 %) (Organización Mundial de la Salud, 2018). Esta infección suele afectar a personas susceptibles como ancianos, mujeres embarazadas, menores de dos años y pacientes inmunocomprometidos (Gandhi & Chikindas, 2007). Los síntomas pueden derivar en septicemia, meningitis u otras infecciones del sistema nervioso central, mientras que las

infecciones durante el embarazo pueden provocar abortos espontáneos o recién nacidos muertos (CDC, 2014; Ferreira y col., 2014).

En Chile, antes del año 2008 se reportaron solo casos esporádicos de listeriosis, con una incidencia de tres casos por millón de personas. Sin embargo, ese mismo año hubo un brote masivo con 165 casos notificados y 14 muertes, siendo asociado al consumo de queso blanco tipo Brie y Camembert. En el 2009 ocurrió otro brote de listeriosis asociado al consumo de embutidos y otros productos cárnicos, con 73 casos notificados y 17 muertes (Montero y col., 2015).

La presencia de *L. monocytogenes* ha sido detectada tanto en alimentos crudos como procesados: la leche y los productos lácteos como el queso, diversos productos cárnicos, vegetales como los rábanos y el repollo, mariscos y productos marinos, además de otros productos listos para consumo como ensaladas frescas (Gandhi & Chikindas, 2007, Ferreira y col., 2014).

Existen cuatro linajes evolutivos descritos para la especie *L. monocytogenes* (I, II, III y IV) (Orsi y col., 2011), cuatro serogrupos (IIa, IIb, IIc, IVb) (Leclercq y col., 2011), y dentro de ellos, basado en los antígenos somático (O) y flagelar (H), se han descrito 13 serotipos, de los cuales 1/2a, 1/2b y 1/2c (grupos IIa, IIb y IIc, respectivamente) son aislados más frecuentemente desde productos alimenticios (Paduro y col., 2020). Por su parte, los serotipos 1/2a 1/2b y 4b (este último del grupo IVb) causan el 95 % de los casos de listeriosis. Específicamente, la mayoría de los brotes de listeriosis están asociados con las cepas de serotipo 4b (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Montero y col., 2015).

Patógenos como *L. monocytogenes* son capaces de adaptarse y proliferar bajo una amplia gama de condiciones ambientales, incluyendo los estresores utilizados en la industria alimentaria para eliminar microorganismos invasores. *L. monocytogenes* puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración (-0,5 a 9,3 °C) y es relativamente resistente al estrés ácido, desarrollándose en un amplio rango de pH (4,7 a 9,2), y también a altas concentraciones salinas (hasta 10 % p/v) (Gandhi & Chikindas, 2007; Ferreira y col., 2014). Estas características permiten al patógeno subsistir en los distintos ambientes de las plantas procesadoras de alimentos, lo que podría derivar consecuentemente en la contaminación alimentaria (Ferreira y col., 2014).

Ferreira y col. (2014) definieron el término persistencia como el aislamiento repetido, en diferentes fechas, de cepas bacterianas que posteriormente se identifican como subtipos idénticos (según lo determinado por métodos fenotípicos o genotípicos). Los mismos autores definieron persistencia de *L. monocytogenes* como la presencia del patógeno a lo largo del tiempo en ambientes naturales o creados por humanos, sobreviviendo y proliferando en compartimientos específicos del ambiente.

Entre los mecanismos de supervivencia y persistencia más estudiados de *L. monocytogenes* se encuentra la formación de biopelículas, las cuales representan una fuente importante de contaminación de alimentos. Estas estructuras se definen como complejos ecosistemas microbianos agrupados, compuestos por una o más especies inmersas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), principalmente polisacáridos, proteínas y DNA exógeno. Esta matriz se puede fijar tanto a superficies abióticas (incluyendo equipamientos de las plantas procesadoras de alimentos) como a estructuras biológicas (vegetales, carne, frutas, etc.) (Galié y col., 2018).

La matriz extracelular tiene un rol estructural fundamental responsable de la persistencia de estas biopelículas en la industria alimentaria, debido a que genera gradientes con respecto a los nutrientes y la difusión de oxígeno, contiene enzimas extracelulares para propósitos nutricionales, permite la transferencia de moléculas de comunicación celular, y protege a las células de compuestos tóxicos (Flemming y col., 2016). Por lo tanto, la formación de biopelículas es considerada una adaptación bacteriana universal contra varios tipos de estrés y antimicrobianos (Bridier y col., 2015).

Patógenos humanos como *L. monocytogenes* son capaces de formar estas estructuras en diferentes sustratos artificiales comunes en la industria alimentaria, tales como el acero inoxidable, vidrio, poliestireno, madera, goma, etc. (Silva y col., 2008; Colagiorgi y col., 2017). Al ser la adherencia al sustrato una de las etapas iniciales en la generación de biopelículas (Galié y col., 2018), se ha investigado la influencia del tipo de material sólido en la capacidad de formación de biopelículas por *L. monocytogenes* (Takahashi y col., 2010; Poimenidou y col., 2016). Sin embargo, no se ha llegado a un consenso respecto a las características de los sustratos que podrían favorecer la formación de biopelículas por esta bacteria.

El desarrollo y maduración de las biopelículas además requiere de complejos mecanismos de comunicación célula-célula. El sistema de comunicación bacteriana por excelencia se conoce como Quorum Sensing (QS), donde moléculas de señalización llamadas autoinductores son secretadas al medio extracelular, regulando la expresión génica en base a la densidad poblacional (Riedel y col., 2009). En *L. monocytogenes*, el principal sistema de QS descrito es un sistema de transducción de señales de dos componentes, regulado por cuatro genes organizados en un operón (*agrBDCA*). *agrD* codifica para el precursor del péptido

autoinductor AgrD, y AgrB es una proteína involucrada en el procesamiento de AgrD en el péptido autoinductor maduro. *agrC* codifica al primer componente del sistema, una histidina kinasa AgrC que fosforila al segundo componente AgrA, correspondiente a un regulador transcripcional (Rieu y col., 2007).

Mientras la mayoría de las investigaciones se han enfocado en estudiar biopelículas monoespecie, existe evidencia de que en los ambientes naturales e industriales la conformación de estas estructuras es predominantemente multiespecie (biopelículas mixtas) e incluyen a patógenos transmitidos por los alimentos como *L. monocytogenes*. Por ello, durante los últimos años y de manera progresiva ha comenzado a cambiar el enfoque hacia el estudio de la complejidad y de las interacciones dentro de las biopelículas de múltiples especies (Kostaki & col., 2012; Burmølle y col., 2014; Lee y col., 2014; Tan y col., 2017; Heir y col., 2018; Papaioannou & col., 2018; Røder y col., 2020).

Los distintos microorganismos interactúan dentro de las biopelículas mixtas, y estas interacciones pueden afectar la composición y la función de la biopelícula (Madsen y col., 2018). En el estudio de Burmølle y col. (2014), los autores sugirieron que es especialmente en biopelículas de múltiples especies donde las interacciones sinérgicas o antagónicas (cooperatividad y competencia, respectivamente) impactan la distribución bacteriana y la biomasa total producida. Además, destacaron que las interacciones en una biopelícula de varias especies afectan su función general, fisiología y entorno, al producir una mayor resistencia, virulencia o degradación de contaminantes (Burmølle y col., 2014). Por su parte, Tan y col. (2017) señalaron en su estudio que las comunidades definidas -pocas especies- e indefinidas -muchas especies- han revelado una serie de propiedades emergentes, que

incluyen una mejor tolerancia al estrés, una mayor producción de biomasa, señalización a nivel comunitario y cooperación metabólica.

En el estudio de Lee y col. (2014) se llevaron a cabo biopelículas mixtas utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens* y *Klebsiella pneumoniae* para estudiar cómo las interacciones entre especies afectan el desarrollo de biopelículas, su estructura y la respuesta a estrés. Como principal resultado, se obtuvo que las biopelículas monoespecie de cada una de estas especies diferían en los niveles de resistencia a la tobramicina (disminución del biovolumen entre 8,8 % a 33,6 %) y al dodecilsulfato de sodio o SDS (disminución del biovolumen entre 9,7 % a 61,9 %), mientras que las biopelículas multiespecie eran resistentes a ambos compuestos (disminución del biovolumen de 7,6 % para la tobramicina y 11,5 % para el SDS). Interesantemente, la composición de especies en las biopelículas multiespecie no se vio afectada cuando se expuso a estos antimicrobianos con respecto a la biopelícula sin el tratamiento, lo que indicó que los compuestos inhibidores no resultaron en una selección de las especies más resistentes, sino más bien en un efecto protector de las especies resistentes hacia toda la comunidad.

Diversos estudios además han evaluado la formación de biopelículas mixtas que incluyen a *L. monocytogenes*. Oxaran y col. (2018) desarrollaron dos tipos de biopelículas mixtas de cinco especies distintas cada una, las cuales incluían uno u otro de los patógenos causantes de ETAs, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Estas biopelículas de cinco especies, así como los patógenos en las biopelículas monoespecie, se expusieron a biocidas para determinar cualquier efecto protector de las especies presentes. Al aplicar ácido peracético, *S. aureus* disminuyó en la biopelícula monoespecie, mientras que en la biopelícula mixta no vio afectada su abundancia. Las células sésiles de *L. monocytogenes* se

vieron disminuidas en la misma medida en las conformaciones monoespecie y mixta. Para determinar si las distintas sensibilidades al ácido peracético se debieron a la comunidad microbiana asociada o al patógeno, se intercambiaron los patógenos entre las comunidades, erradicándose *S. aureus*, mientras que no hubo un efecto significativo del biocida sobre *L. monocytogenes* en la biopelícula mixta que antes protegió a *S. aureus*. Este estudio demostró que la protección no se debe a características específicas del patógeno, sino que probablemente sea causada por miembros o asociaciones específicas en la comunidad.

Por su parte, Heir y col. (2018) investigaron la capacidad competitiva de distintas cepas de *L. monocytogenes* cultivadas en cultivos mixtos con otras *L. monocytogenes*, cepas de *Listeria innocua* y bacterias Gram negativas encontradas comúnmente en las superficies de contacto con alimentos en plantas de procesamiento de carne y salmón. Interesantemente, en experimentos de biopelículas duales y multiespecie se identificó la inhibición del crecimiento de ciertas cepas de *L. monocytogenes* por cepas de *Listeria innocua*, efectos inhibidores que fueron potenciados por las bacterias Gram negativas. Los autores sugirieron que las interacciones inhibitorias por *Listeria innocua* hacia cepas de *L. monocytogenes* podrían incluir la producción de agentes similares a bacteriocinas o moléculas sensibles al QS.

En el estudio de Papaioannou y col. (2018), se seleccionó un conjunto de seis cepas de *L. monocytogenes* de distintos orígenes para formar biopelículas mixtas en discos de acero inoxidable incubados en un extracto acuático de pescado, junto a cuatro especies de *Pseudomonas* spp. o junto a la microbiota autóctona del pescado. Se encontró que la capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* junto a las cepas de *Pseudomonas* spp. varió dependiendo del tiempo de incubación. Por el contrario, cuando se cultivó a *L. monocytogenes* junto a la microbiota autóctona del pescado para formar

biopelículas mixtas, la capacidad de formación de biopelículas por parte de *L. monocytogenes* se vio significativamente disminuida respecto a su conformación monoespecie. Además, al agregar dos biocidas distintos, no se pudo rastrear ninguna protección hacia *L. monocytogenes* por parte de la microbiota. Sin embargo, este tratamiento no fue suficiente para matar completamente a las bacterias acompañantes, por lo que la incorporación de células de *L. monocytogenes* en esta biopelícula pareció aumentar su resistencia general contra la desinfección en comparación al cultivo mixto sin *L. monocytogenes*.

Por otro lado, una de las formas de entender los mecanismos moleculares que regulan la respuesta de *L. monocytogenes* formando biopelículas es a través del estudio de la respuesta transcripcional por técnicas como qPCR (PCR cuantitativo), la cual es de las más utilizada para realizar estudios de abundancia relativa; es decir, comparar niveles relativos de mRNA de genes de interés entre muestras biológicas bajo diferentes condiciones (Bustin y col., 2005; Carvalhais y col., 2013). Entre las investigaciones más recientes con este enfoque, se encuentra la realizada por Melian y col. (2022), quienes estudiaron el efecto de bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas en el control de la formación de biopelículas a 10 °C por tres cepas de *L. monocytogenes*, y evaluaron la expresión de un conjunto de 30 genes relacionados a la adhesión, virulencia y respuesta a estrés por qPCR. La exposición del patógeno a bacteriocinas redujo la cantidad de biopelícula formada luego de seis días de incubación a 10 °C, a la vez que en las tres cepas aumentó la abundancia de *luxS*, *agrA*, *agrB*, *cspB*. El gen de respuesta a estrés y virulencia, *sigB*, también aumentó su cuantificación respecto a las biopelículas a 10 °C no expuestas a bacteriocinas, junto con algunos genes relacionados a la producción de energía y transporte de azúcares.

Por su parte, da Silva y col. (2021) cultivaron cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde la industria alimentaria para formar biopelículas en discos de acero inoxidable bajo diferentes condiciones de estrés salino y ácido, y así determinar la expresión de distintos genes involucrados en la formación de biopelículas (*flaA*, *agrB*, *agrC*) y respuesta a estrés (*lmo0444*, *lmo0445*, y *lmo0446*), a través de la técnica de qPCR. Los resultados revelaron que los aislados de *L. monocytogenes* presentaron diferencias en el perfil transcripcional de los genes mencionados, dependiendo del linaje/serotipo de las cepas y del estrés al que eran expuestas. Por ejemplo, los genes *agrB* y *agrC* mostraron diferencias en su expresión para dos cepas del mismo origen, linaje II y serotipo 1/2c, e incluso sometidas al mismo tratamiento (amonio cuaternario), donde *agrC* no se expresó en una de ellas.

Finalmente, todo lo anterior cobra especial relevancia en la industria de los alimentos debido a que las interacciones inter-especies producidas en biopelículas de comunidades bacterianas mixtas podrían dotar al conjunto microbiano de nuevas características que se volverían desafiantes a la hora de erradicar la contaminación en el ambiente alimentario, incluyendo al patógeno *L. monocytogenes*.

Con los antecedentes presentados, el siguiente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar el comportamiento de distintas cepas de *L. monocytogenes* al interactuar con otros microorganismos en biopelículas mixtas, utilizando especies bacterianas comúnmente encontradas en superficies de la industria alimentaria. Brevemente, de un total de más de 400 cepas de *L. monocytogenes* almacenadas en nuestro laboratorio, aisladas desde aguas de ríos, alimentos y superficies de la industria alimentaria, 14 fueron elegidas para probar su capacidad de formación de biopelículas a 37°C en superficies de poliestireno o acero inoxidable. De estos resultados, seis cepas entre bajas y altas formadoras de biopelículas

fueron seleccionadas para formar biopelículas mixtas y duales junto a dos géneros de bacterias Gram negativas aisladas desde muestras de superficie de una planta salmonera. Además, también se evaluó el efecto de la presencia de *S. aureus* en las biopelículas. Finalmente, se llevó a cabo un estudio de la respuesta transcripcional de genes relacionados a la formación de biopelículas y respuesta a estrés de *L. monocytogenes* en estado de biopelículas duales junto a uno de los géneros bacterianos aislados anteriormente.

**Objetivo General:**

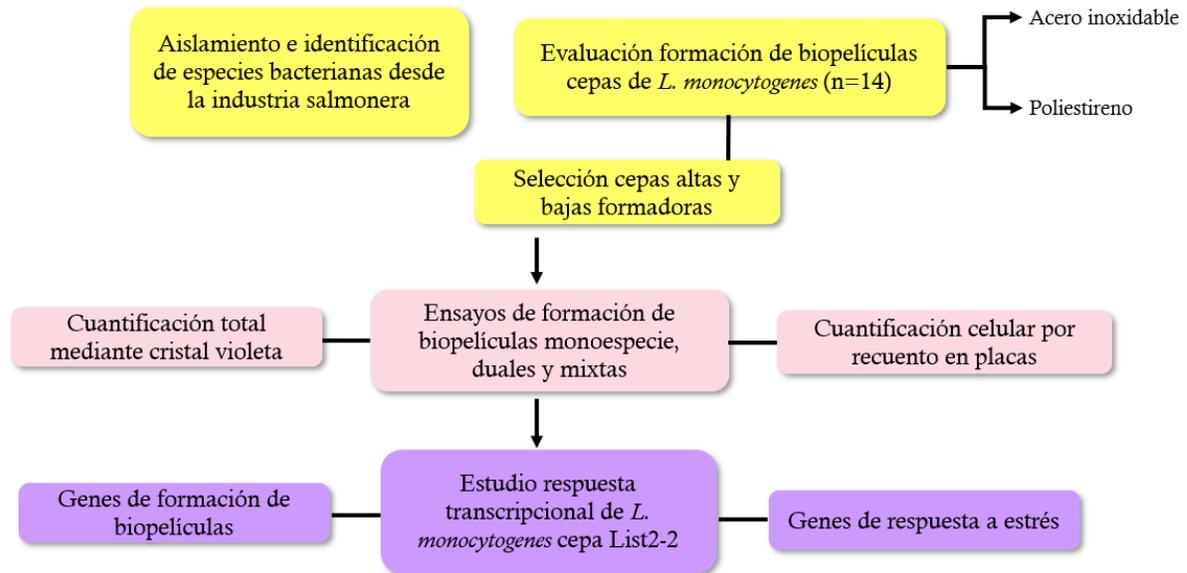
Evaluar el comportamiento de distintas cepas de *L. monocytogenes* al interactuar con otros microorganismos en biopelículas mixtas, utilizando especies bacterianas comúnmente encontradas en la industria alimentaria.

**Objetivos específicos:**

- 1- Identificar especies bacterianas desde superficies de una planta salmonera capaces de formar biopelículas mixtas junto a *L. monocytogenes*.
- 2- Evaluar el efecto de otras especies bacterianas en la formación de biopelículas mixtas de *L. monocytogenes*.
- 3- Estudiar el efecto de las especies presentes sobre la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* formando biopelículas mixtas.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 1, se observa de manera global la estrategia experimental llevada a cabo en el presente trabajo.



**Figura 1.** Esquema de la estrategia experimental llevada a cabo en esta investigación.

### 2.1 Aislamiento e identificación de especies bacterianas desde la industria salmonera

Muestras de distintas superficies tomadas en una planta procesadora de la industria salmonera se encontraban disponibles en nuestro laboratorio. Las muestras en que anteriormente se identificó la presencia de *L. monocytogenes* fueron procesadas para aislar la microbiota acompañante. Inóculos fueron traspasados a placas de TSA [Trypticase Soy Agar (BBL™)], correspondiente a un medio nutritivo que permite el crecimiento de diferentes microorganismos (Murray y col., 2003). Estas placas fueron incubadas 24 horas a 37°C, y se observó la morfología de las colonias crecidas. Las colonias más abundantes fueron seleccionadas para realizar pruebas de tinción Gram. A partir de lo visualizado por el microscopio óptico, se escogieron bacterias Gram positivas y Gram negativas, y

posteriormente se aislaron en medios diferenciales y selectivos: agar MacConkey (BBL™) para bacilos Gram negativos, CHROMagar Listeria (Oxoid) para cocobacilos Gram positivos (descartar que correspondieran a *L. monocytogenes*), mientras que cocos Gram positivos fueron aislados nuevamente en TSA. El siguiente paso fue realizar pruebas bioquímicas para tener una identificación preliminar de los aislados.

Para su identificación definitiva, a cuatro aislados se les secuenció la región del rRNA 16S. Para ello, se realizó un PCR de colonia con partidores correspondientes al gen del rRNA 16S (1492R y 27F) (Frank y col., 2008), y se utilizó el siguiente programa de PCR: un ciclo de denaturación a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de amplificación con denaturación a 94 °C por 30 s, alineación a 58 °C por 90 s, y elongación a 72 °C por 90 s; un ciclo de elongación final a 72 °C por 10 min. Los productos PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1 % y una vez verificados fueron enviados a la Unidad de Secuenciación de la Universidad Católica. El análisis de la secuenciación requirió que las secuencias fueran editadas con el programa Chromas para mayor exactitud y guardadas en formato FASTA. Luego, a través de la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se llevó a cabo un alineamiento con la base de datos 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea). Lo mismo se hizo con el sitio EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) a fin de comparar las especies bacterianas con mayor % de identidad.

## **2.2 Selección y cultivo de cepas de *L. monocytogenes***

El laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA de la Universidad de Chile posee una colección de más de 400 aislados de *L. monocytogenes* provenientes de distintos orígenes (ríos, alimentos, ambientes de la industria alimentaria) con sus genomas secuenciados. En un trabajo anterior de nuestro grupo, se cuantificó la capacidad de formación de biopelículas de

18 aislados pertenecientes a esta colección, mediante el método de tinción con cristal violeta (CV). Para fines del presente trabajo, se revisaron los datos cuantitativos ( $DO_{595nm}$ ) a 37°C obtenidos, y se escogió un total de 14 aislados con fenotipos contrastantes, es decir, que mostraron alta y baja formación de biopelículas. Para estos aislados, se analizó nuevamente la capacidad de formación de biopelículas. Los orígenes y serogrupos de las cepas estudiadas se especifican en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas para los ensayos de formación de biopelículas.

<b>Nombre cepa</b>	<b>Linaje</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Origen</b>
A17/661-8	I	IIb	Superficie piso cafetería
A18/75-3	I	IIb	Superficie piso
A18/79-3	I	IVb	Superficie desagüe
A18/81-5	I	IVb	Superficie desagüe
List2-2	II	IIa	Alimentos
Lmo 115-1	I	IIb	Agua de arroyo
Lmo 186-1	II	IIa	Agua de río
Lmo 340-1	I	IVb	Agua de canal
Lmo 405-1	II	IIa	Agua de río
Lmo 640-1	I	IVb	Agua superficial
Lmo 642-1	I	IVb	Agua superficial
Lmo 643-1	I	IVb	Agua de río
Lmo 656-1	I	IVb	Agua superficial
Lmo 689-1	I	IIb	Agua superficial

Para la recuperación de las cepas de *L. monocytogenes* almacenadas en el cepario a -80 °C, estas fueron sembradas en placas de CHROMagar Listeria (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Luego, una colonia característica de cada cepa fue traspasada a placas de TSAYE [Trypticase Soy Agar (BBL™) 0,6 % Yeast Extract (Bacto™)] e incubadas a 37 °C por 24 horas. Desde esta placa se tomó el inóculo para los diferentes ensayos.

### **2.3 Ensayos de formación de biopelículas de distintas cepas de *L. monocytogenes* en dos superficies**

Se evaluó la formación de biopelículas para las 14 cepas de *L. monocytogenes* escogidas en el punto 2.2, de acuerdo con el protocolo de tinción con cristal violeta descrito por Darwish & Asfour (2013), con algunas modificaciones. Para este ensayo se utilizaron dos tipos de superficies comúnmente encontradas en la industria alimentaria, acero inoxidable y poliestireno.

Las cepas de *L. monocytogenes* recuperadas desde el cepario fueron inoculadas en 5 ml de caldo TSBYE [Trypticase Soy Broth (BBL™) 0,6 % Yeast extract (Bacto™)] suplementado con 1 % de glucosa más 2 % de NaCl, y se incubaron a 37 °C durante la noche, además de un tubo como control de esterilidad (CE). A partir de este cultivo, un medio fresco fue inoculado y ajustado a una  $DO_{600nm}$  de 0,1 (correspondiente a  $10^8$  UFC/ml). Posteriormente, se agregó 1 ml de cultivo ajustado a cada pocillo de placas de poliestireno (BIOFIL), y a otras que contenían un disco de acero inoxidable en cada pocillo (10 mm de diámetro, 1 mm de espesor, MECSUS Ltda.). Para cada superficie la cepa fue inoculada por triplicado, y se consideraron algunos pocillos como blancos con medio sin inocular. Estas placas se incubaron a 37 °C por 48 horas. Pasados los dos días, se eliminó el sobrenadante de los pocillos dando vuelta las placas, y se lavaron dos veces con 500 µl de suero fisiológico

(cloruro de sodio al 0,9 %) con el fin de descartar las células en suspensión no adheridas. En el caso de los discos de acero inoxidable, para evitar su caída al dar vuelta las placas, estos fueron traspasados cuidadosamente a otras placas para ser lavados utilizando una pipeta con suero fisiológico. Terminados los lavados, las placas semitapadas fueron secadas por 20 minutos a 37 °C, luego se agregó a cada pocillo 500 µl de metanol e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (fijación biopelículas). Pasado este periodo, se eliminó el metanol y se agregó a cada pocillo 500 µl de una solución de cristal violeta al 0,5 % (Darwish & Asfour, 2013), y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente (tinción pared celular y matriz extracelular de las biopelículas). Se eliminó el exceso de cristal violeta lavando tres veces con suero fisiológico. Finalmente, a cada pocillo se le agregó 1 ml de etanol al 95 % para disolver el cristal violeta. Se traspasó 1 ml a una nueva placa (células en suspensión) y se realizó la lectura de la DO<sub>595nm</sub> en un lector de microplacas (TECAN Trading AG, Switzerland). La determinación de biopelícula se realizó con tres réplicas técnicas por cepa y tres réplicas biológicas de este procedimiento. Se seleccionaron cepas entre bajas y altas formadoras de biopelículas según el parámetro DO<sub>595nm</sub> promedio para ser utilizadas en los siguientes experimentos.

#### **2.4 Ensayos de formación de biopelículas monoespecie, duales y mixtas**

Se llevaron a cabo ensayos de formación de biopelículas monoespecie y mixtas y además se agregaron conformaciones duales, utilizando los géneros bacterianos aislados en el punto 2.1 y las cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas en el punto 2.3. Además, se incorporó a *S. aureus* cepa SCL 645, dado que esta especie puede contaminar ambientes de la industria alimentaria y también es formadora de biopelículas (Rode y col., 2007; Bencardino y col., 2021). Cabe señalar que, para fines de este estudio, se hizo una separación entre los términos

biopelícula dual (dos especies bacterianas) y mixta (más de dos especies o multiespecie, cuatro en este caso), ambas correspondientes a conformaciones experimentales.

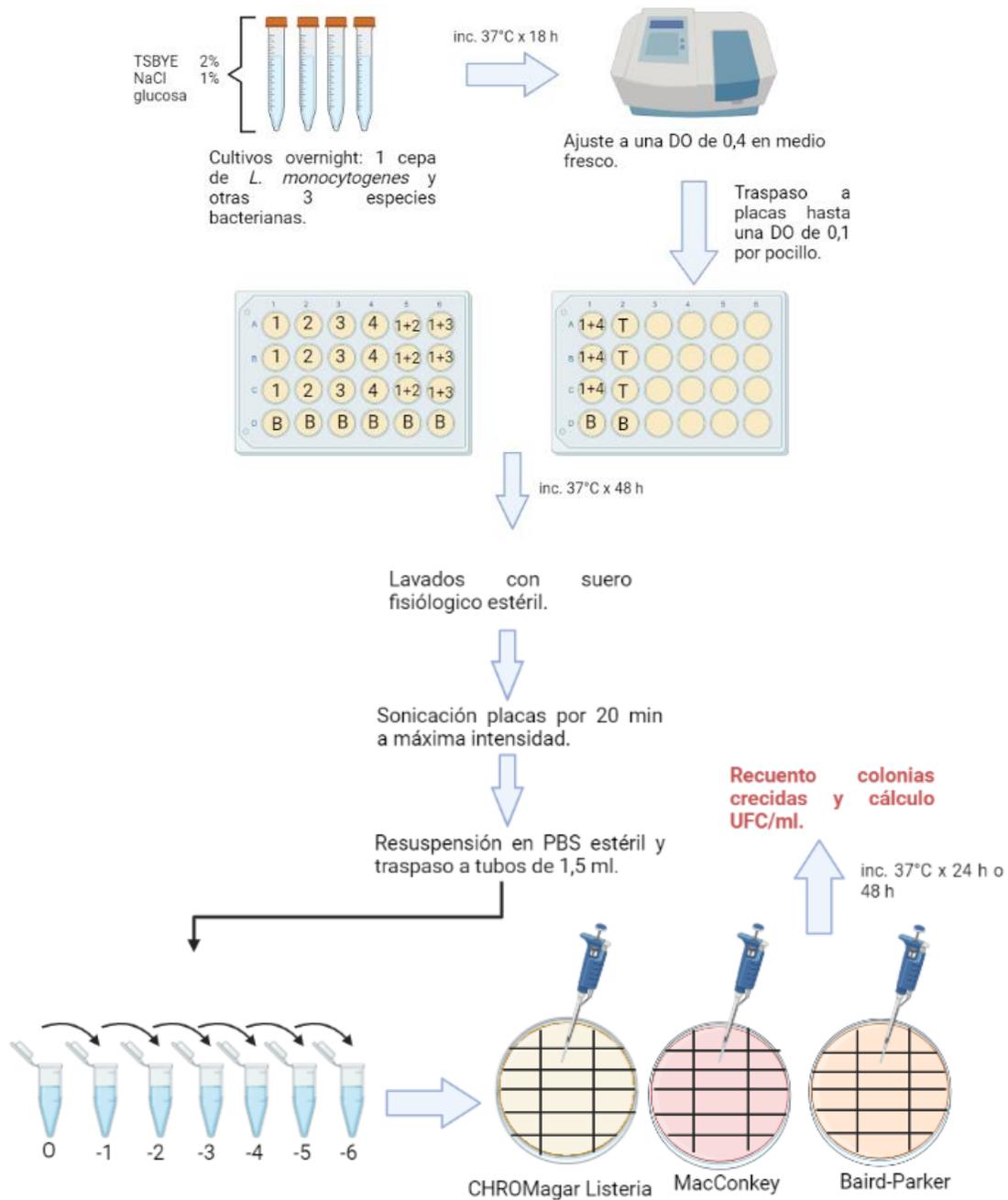
#### 2.4.1 *Cuantificación total de biopelículas mixtas y duales mediante el método de cristal violeta:*

Se determinó la cantidad total de biopelícula formada mediante el método de CV (Darwish & Asfour, 2013), similar a la metodología utilizada en el punto 2.3. Para ello, las diferentes especies bacterianas (en total tres) y las cepas de *L. monocytogenes* (en total seis) fueron inoculadas en 9 ml de caldo TSBYE 1 % glucosa 2 % NaCl y se incubaron a 37 °C durante la noche (además de un tubo como CE). A partir de este cultivo, un medio fresco fue inoculado y ajustado a una  $DO_{600nm}$  de 0,4. Luego, cada pocillo de las placas, por triplicado, fue llenado de la siguiente manera para alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,1: para la formación de biopelículas de cada especie por sí sola, se agregó 250  $\mu$ l de cultivo bacteriano ajustado y 750  $\mu$ l de medio (**biopelícula monoespecie**); para la formación de biopelículas de dos especies, se agregó 250  $\mu$ l de cultivo ajustado de cada especie y 500  $\mu$ l de medio (**biopelícula dual**, conformación experimental); y para el crecimiento de todas las especies juntas (n=4), se agregó 250  $\mu$ l de cultivo bacteriano ajustado de cada una de las especies (**biopelícula mixta**, conformación experimental). Además, se consideraron algunos pocillos como blancos con medio sin inocular. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 horas, y se hicieron los lavados y tinciones con cristal violeta descritos en el punto 2.2 más las lecturas de  $DO_{595nm}$  correspondientes. La determinación de biopelícula se realizó con tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas de este procedimiento.

#### 2.4.2 Cuantificación celular de biopelículas mixtas y duales por recuentos en placas:

Adicionalmente, se determinó el número de células de cada especie en las biopelículas monoespecie, duales y mixtas en placas de medios selectivos y diferenciales. Los pasos llevados a cabo fueron guiados por las metodologías de Darwish & Asfour (2013) y Heir y col. (2018), con algunas modificaciones.

Las biopelículas se formaron como fue descrito en el punto 2.4.1, y transcurrido el tiempo de incubación (37 °C por 48 horas) se continuó con la siguiente metodología: las placas fueron cuidadosamente dadas vueltas y lavadas dos veces con 500 µl de suero fisiológico estéril, con el fin de descartar las células en suspensión no adheridas. Luego, en cada pocillo se agregó 400 µl de PBS estéril y las placas fueron sometidas a sonicación (POWER SONIC405, Mundolab) durante 20 minutos a máxima intensidad. De esta forma, las células adheridas a las superficies fueron despegadas. Posteriormente, a cada pocillo se le agregó 600 µl más de PBS, completando 1 ml. Con una pipeta se mezcló el PBS con las células en suspensión, y se traspasaron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Así, se hicieron diluciones decimales seriadas hasta la dilución -6. Luego, desde la dilución -1, se sembraron 5 µl en los siguientes agares: CHROMagar Listeria para el crecimiento de *L. monocytogenes*, MacConkey para bacterias Gram negativas y Baird-Parker (Difco™) para *S. aureus*. Cada placa fue incubada durante 24 horas, en el caso del agar MacConkey, y 48 horas para los agares CHROMagar Listeria y Baird-Parker. Finalmente se contaron las colonias crecidas para los cálculos de UFC/ml. Se llevaron a cabo tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas de este procedimiento. El diseño experimental de este ítem se observa en la Figura 2.



**Figura 2. Diseño experimental para realizar el recuento celular de las especies formadoras de biopelículas mixtas y duales. 1 = *L. monocytogenes*; 2,3 y 4 = otras especies bacterianas. Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37°C por 48 horas. Se llevaron a cabo tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas de este procedimiento. Creado en BioRender.com.**

## 2.5 Ensayos transcripcionales

Con el fin de estudiar la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* formando biopelículas con otras especies bacterianas, se estandarizaron las condiciones experimentales para llevar a cabo análisis de abundancia relativa del mRNA de determinados genes, mediante técnicas de retrotranscripción y qPCR (RT-qPCR).

### 2.5.1 Selección de genes y partidores:

Como primer paso, se realizó una búsqueda bibliográfica de genes de *L. monocytogenes* descritos en la literatura cuyas proteínas codificadas estuviesen involucradas en los procesos de formación de biopelículas y/o respuesta a estrés. Posteriormente, las secuencias nucleotídicas de los genes seleccionados de *L. monocytogenes* (n=20) fueron analizadas con el fin de identificar si estos eran específicos para *L. monocytogenes* y no se encontraban entre los genomas de *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus*. Para ello, los 20 genes fueron alineados en los genomas de referencia de las especies bacterianas, con el programa ProteinOrtho. Los genes con identidad sobre 75 % fueron descartados. Para los genes identificados como candidatos específicos de *L. monocytogenes*, se confirmó la especificidad de partidores mediante la reacción de PCR con DNA extraído de *L. monocytogenes* y de las otras especies bacterianas. En la Tabla 2, se especifican las funciones de las proteínas codificadas por los genes candidatos cuyos partidores fueron probados para su especificidad, y en asterisco aquellos que finalmente fueron seleccionados para los estudios de respuesta transcripcional.

**Tabla 2. Genes de *L. monocytogenes* candidatos para ser utilizados en los ensayos transcripcionales.** Se detallan los partidores de cada gen cuya especificidad para *L. monocytogenes* fue probada por PCR convencional. En asterisco, se indican aquellos genes seleccionados para los ensayos de abundancia relativa.

Gen	NCBI Locus TAG	Función	Referencia	Secuencia partidores
<i>agrD</i> *	<i>lmo0049</i>	Precursor del péptido autoinductor AgrD	(Rieu y col., 2007)	F 5' CCATGAAAGTTGCGGATT 3' R 5' CAAATGGACTTTTTGGTTCG 3'
<i>lmo0202</i>	<i>lmo0202</i>	Precursor listeriolisina O	(Assisi y col., 2021)	F 5' GCTTTTGATGCTGCCGTAAG 3' R 5' TGCCGTCGATGATTTGAACT 3'
<i>lmo0583</i>	<i>lmo0583</i>	Transporte y metabolismo de aminoácidos	(Assisi y col., 2021)	F 5' TGGATGTCGTGGTAATCCCT 3' R 5' TCGCTCCGTTCCAATTACAG 3'
<i>lmo0644</i> *	<i>lmo0644</i>	LTA primasa (de la familia sulfatasa de membrana). Síntesis de la estructura principal del ácido lipoteicoico o LTA	(Chang y col., 2012)	F 5' CGGTGAGGTTGGCGTAGTTA 3' R 5' CGGCTAGTTAGGCGGAATGA 3'
<i>motA</i>	<i>lmo0685</i>	MotA. Proteína del estator del motor flagelar	(Alonso y col., 2014)	F 5' ATGCCGGACAAAGTGGATGT 3' R 5' CTAAGCGCATGCCTCGTTTC 3'
<i>motB</i>	<i>lmo0686</i>	MotB. Rotación del motor flagelar	(Lemon y col., 2007)	F 5' GCAGTCTTGAAGGCGATG 3' R 5' AAGTAAGGCTGCTGCTGCT 3'
<i>flgD</i>	<i>lmo0696</i>	FlgD. Proteína de modificación de varilla del cuerpo basal flagelar	(Lemon y col., 2007)	F 5' TGCGCAACTTTCCTT 3' R 5' GATTGCAAGGCGGAGTTT 3'
<i>sigB</i> *	<i>lmo0895</i>	Factor sigma de la RNA polimerasa. Adaptación a diferentes condiciones de estrés y virulencia	(Lakicevic y col., 2022)	R 5' GGCACAGCAAATGCTTCAAA F 5' ACCTAGTAGAGTCCATCGCC 3'
<i>pflA</i> *	<i>lmo1917</i>	Producto similar a una piruvato formiato liasa. Metabolismo de carbohidratos	(Melian y col., 2022)	F 5' GCCAACATGGGATTCGGTAT 3' R 5' TATGCACTGGGAGTTACCA 3'
<i>rRNA 16S</i> (normalizador)	<i>lmor04</i>	rRNA 16S de la subunidad ribosomal pequeña	(Rieu y col., 2007)	F 5' GTGCAGAAGAGGAGAGTGGA 3' R 5' TCAGCGTCAGTTACAGACCA 3'
<i>rpoB</i> *	<i>lmo0258</i>	Subunidad beta de la RNA polimerasa	(Zilelidou y col., 2020)	F 5' ATGCTTCCGCAGACGAAGA 3' R 5' TTTCAGCGGCTGCATTTTCC 3'
<i>rpoA</i> (normalizador)	<i>lmo2606</i>	Subunidad alfa de la RNA polimerasa	(Luo y col., 2013)	F 5' CGACTCGTGGTCTGTGGTTAC 3' R 5' ACTGCTTCTTCTGGGCTGATAC 3'
<i>Idh</i> (normalizador)	<i>lmo0210</i>	L-lactato deshidrogenasa	(Zhang y col., 2016)	F 5' CGACGGAGCAGTTGGTTCTA 3' R 5' TTTGAGCAGTACCGGCAGTT 3'

\*Genes seleccionados para estudio de respuesta transcripcional.

Una vez definidos los genes que serían analizados, se procedió con la búsqueda de genes normalizadores candidatos que fueran específicos para *L. monocytogenes*. Para ello, usando DNA extraído de *L. monocytogenes* y de *Hafnia* sp., se llevaron a cabo reacciones de PCR convencional para los genes *rRNA 16S* (Rieu y col., 2007), *rpoA* (Luo y col., 2013), *rpoB* (Zilelidou y col., 2020) e *idh* (Zhang y col., 2016), y posteriores qPCR. Estos genes habían sido utilizados por nuestro grupo como genes normalizadores de *L. monocytogenes* en investigaciones previas.

#### 2.5.2 Extracción de RNA desde biopelículas:

En el presente estudio, se evaluó el efecto de la presencia de *Hafnia* sp. (aislada en el punto 2.1) en la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* formando biopelículas. Para ello, se utilizó la cepa List2-2 de *L. monocytogenes* para su evaluación en el estado de biopelícula, la cual ha sido utilizada como cepa modelo por nuestro grupo de laboratorio. De manera similar a los primeros pasos del punto 2.4.1, se realizaron biopelículas de *L. monocytogenes* (**monoespecie**) y junto a *Hafnia* sp. (**duales**, conformación experimental), con tres réplicas técnicas por condición. Transcurrido el tiempo de incubación a 37 °C y realizados los lavados con suero fisiológico, las placas fueron sonicadas por 20 minutos a máxima intensidad. Las células suspendidas en PBS fueron traspasadas a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 17.000 g por 5 minutos. Después, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de PBS. Posteriormente, se agregó 200 µl de lisozima (20 mg/µl) (Promega) por tubo y se incubaron 20 minutos a 37°C. Pasado este tiempo y luego de una tercera centrifugación, se procedió al protocolo de extracción de RNA con el kit High Pure Viral RNA (Roche), según las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA desde las biopelículas en cantidad adecuada, se verificó su integridad en un gel de agarosa 1 %. Luego, se utilizó el kit TURBO

DNA-free<sup>TM</sup> (Invitrogen) con el fin de eliminar trazas de DNA, para lo cual se ajustó la concentración del RNA por muestra a 200 ng/μl y se siguieron las instrucciones del fabricante. La obtención de cDNA se realizó a partir de 1 μg de RNA total por muestra utilizando la enzima transcriptasa inversa M-MLV RT (Promega), como lo indica el fabricante.

### 2.5.3 Reacción de qPCR:

A partir del cDNA sintetizado, se llevaron a cabo reacciones de qPCR en el equipo AriaMx qPCR System (Agilent Technologies). La mezcla de reacción se preparó con 5 μl del mix Brilliant II SYBR® Green (Agilent Technologies), 0,5 μl de partidor forward y reverse a una concentración de 10 μM cada uno, 2 μl de cDNA con una concentración aproximada de 500 ng/μl, y 2 μl de agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 10 μl.

El cálculo de la abundancia relativa se llevó a cabo con el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$  descrito por Livak & Schmittgen (2001), con el fin de obtener posibles cambios en la abundancia de genes específicos de *L. monocytogenes* List2-2 cuando se encuentra formando biopelículas duales junto a *Hafnia* sp. (condición experimental), respecto a su conformación monoespecie (condición control).

## 2.6 Estadística

El análisis estadístico de los datos de las cepas de *L. monocytogenes* formando biopelículas en poliestireno y acero inoxidable, más los recuentos UFC/ml de *L. monocytogenes*, se realizaron mediante un Anova simple con el fin de verificar si hubo diferencias significativas ( $P$  value <0,05) en la cantidad de biopelícula formada según la superficie, y entre los

recuentos de *L. monocytogenes* formando biopelículas mono especie, duales y mixtas. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey.

Para los datos de cuantificaciones totales con el método de CV de las cepas de *L. monocytogenes*, se realizó un Kruskal Wallis con el fin de verificar si hubo diferencias significativas ( $P$  value  $<0,05$ ) en la cantidad de biopelícula formada según la conformación de biopelícula (mono especie, dual y mixta). Luego, se hizo una prueba de Post Hoc.

El análisis estadístico de los datos de abundancia relativa fue realizado mediante un Anova simple para verificar si hubo expresión diferencial entre los genes, y luego una prueba de Tukey.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificación y selección de especies bacterianas desde muestras de superficie de la industria salmonera

En el laboratorio se disponía de muestras de superficie de una planta procesadora de la industria salmonera recolectadas con tómulas, en las cuales se identificó previamente la presencia de *L. monocytogenes*. Estas muestras fueron reprocesadas con el fin de aislar la microbiota acompañante. Para ello, inóculos (5-10 µl) fueron traspasados a placas de TSA, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas. Según la morfología de las colonias crecidas, aquellas más abundantes fueron seleccionadas para realizar pruebas de tinción Gram. A partir de lo visualizado por el microscopio óptico, se escogieron tres bacterias Gram positivas y cinco Gram negativas. Estas bacterias fueron traspasadas a medios diferenciales y selectivos, los que se indican en el punto 2.1. Las colonias crecidas en agar MacConkey mostraron características particulares en su morfología, y cambios marcados de color en el medio (amarillo y rosado) indicando fermentación diferencial de la lactosa, por lo que a cuatro de estos aislados se les realizó pruebas bioquímicas.

Para su identificación definitiva, el gen *rRNA 16S* de los aislados anteriores fue enviado a secuenciar a la Unidad de Secuenciación de la Universidad Católica. El análisis de las secuencias permitió identificar las especies bacterianas considerando aquellas con mayor porcentaje de identidad, para lo que se utilizó los programas Nucleotide BLAST del NCBI y EZBioCloud (Tabla 3).

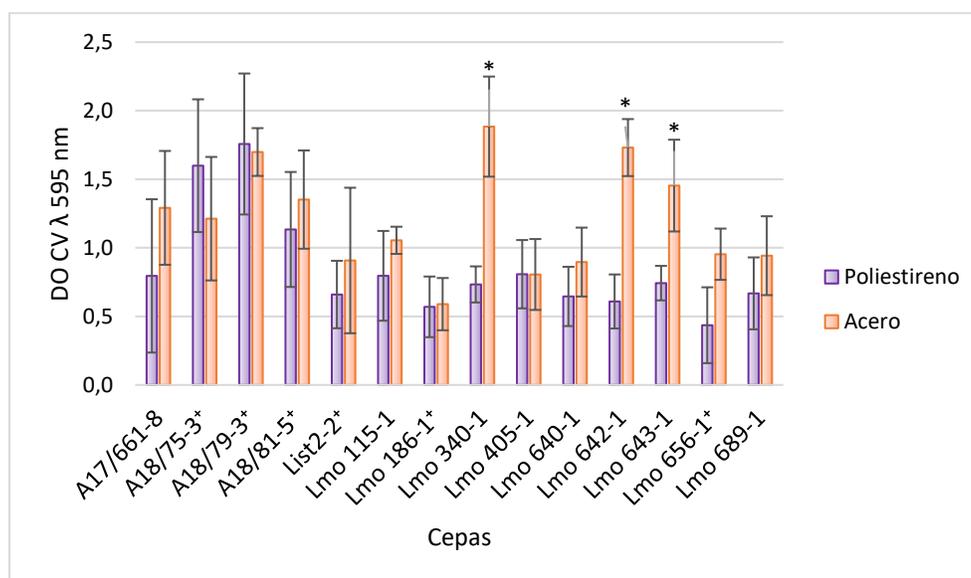
**Tabla 3. Identificación de especies mediante el análisis de secuencia del gen *rRNA 16S*.**  
Herramienta Nucleotide BLAST del NCBI y sitio EZBioCloud.

Cepa	Especie Nucleotide BLAST	% de identidad	Especie EZBioCloud	% de identidad
1B-1	<i>Hafnia paralvei</i>	98,17 %	<i>Hafnia alvei</i>	97,83 %
	<i>Hafnia alvei</i>	98,00 %	<i>Hafnia paralvei</i>	97,83 %
6A-3	<i>Citrobacter freundii</i>	99,71 %	<i>Citrobacter portucalensis</i>	100,00 %
	<i>Citrobacter murliniae</i>	99,71 %	<i>Citrobacter tructae</i>	99,86 %
1B-4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99,95 %	<i>Alcaligenes aqualitis</i>	99,62 %
	<i>Alcaligenes aqualitis</i>	98,44 %	<i>Alcaligenes faecalis subsp. Parafaecalis</i>	99,40 %
6A-2	<i>Proteus hauseri</i>	99,00 %	<i>Proteus hauseri</i>	98,88 %
	<i>Proteus columbae</i>	98,36 %	<i>Proteus columbae</i>	98,36 %

Dos especies de bacterias Gram negativas definidas en base al análisis de las secuencias del gen *rRNA 16S*, *Hafnia* sp. y *Citrobacter* sp. (cepas nombradas 1B-1 y 6A-3, respectivamente), fueron seleccionadas para evaluar cómo su presencia afecta la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. También, como se indicó en la sección de Metodología, se agregó como tercera especie a *S aureus* cepa SCL 645, cuyo origen es de muestras clínicas y resistente a metilina.

### 3.2 Ensayos de formación de biopelículas de distintas cepas de *L. monocytogenes* en dos tipos de superficies

Se evaluó la capacidad de formar biopelículas de 14 cepas de *L. monocytogenes* sobre superficies de poliestireno y acero inoxidable. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Figura 3.



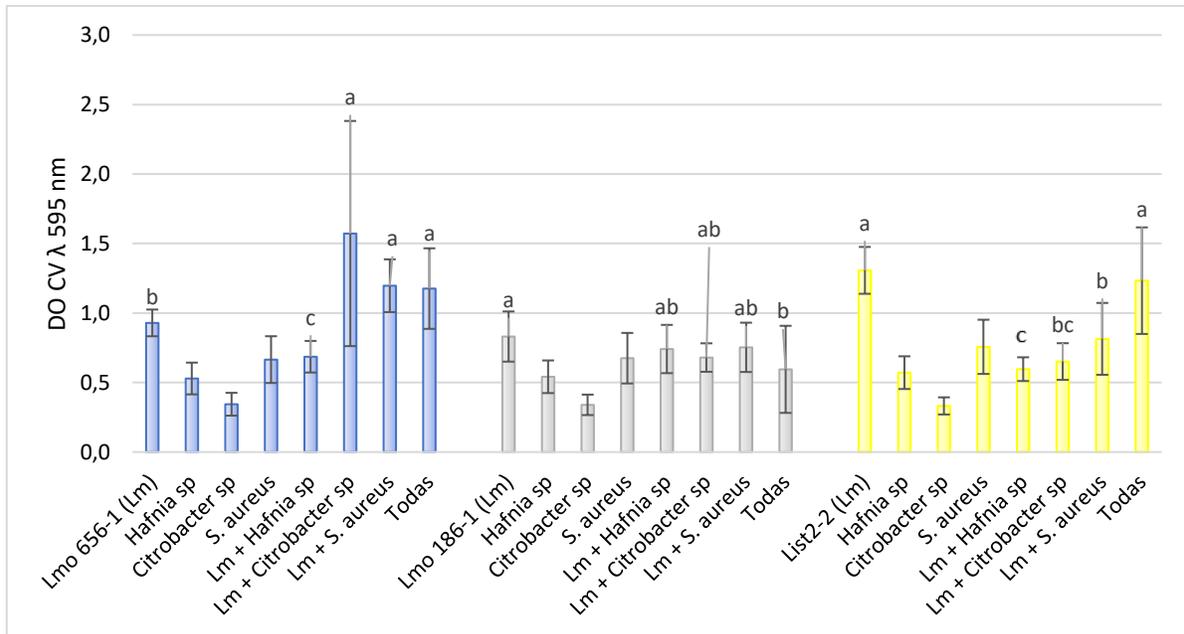
**Figura 3. Formación de biopelícula en superficies de poliestireno y acero inoxidable de diferentes cepas de *L. monocytogenes*.** Morado superficie de poliestireno, y naranja acero inoxidable. El nombre de la cepa marcada con signo “más” indica aquellas utilizadas en los siguientes ensayos de biopelículas mixtas. Biopelículas formadas en placas de poliestireno y acero inoxidable e incubadas a 37°C por 48 horas. Cada barra indica el promedio de tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas, y aquellas marcadas con asterisco muestran diferencias significativas entre superficies ( $P$  value <0,05).

Se observó que solo tres de las 14 cepas de *L. monocytogenes* evaluadas formaron significativamente mayor cantidad de biopelícula en acero inoxidable comparado a poliestireno ( $P$  value <0,05), mientras que el resto tuvo un comportamiento similar en ambas superficies. Además, para algunas cepas (tales como Lmo 656-1, Lmo 186-1 y List2-2 en poliestireno) el nivel de biopelículas formado era bajo, mientras para otras, la tendencia fue

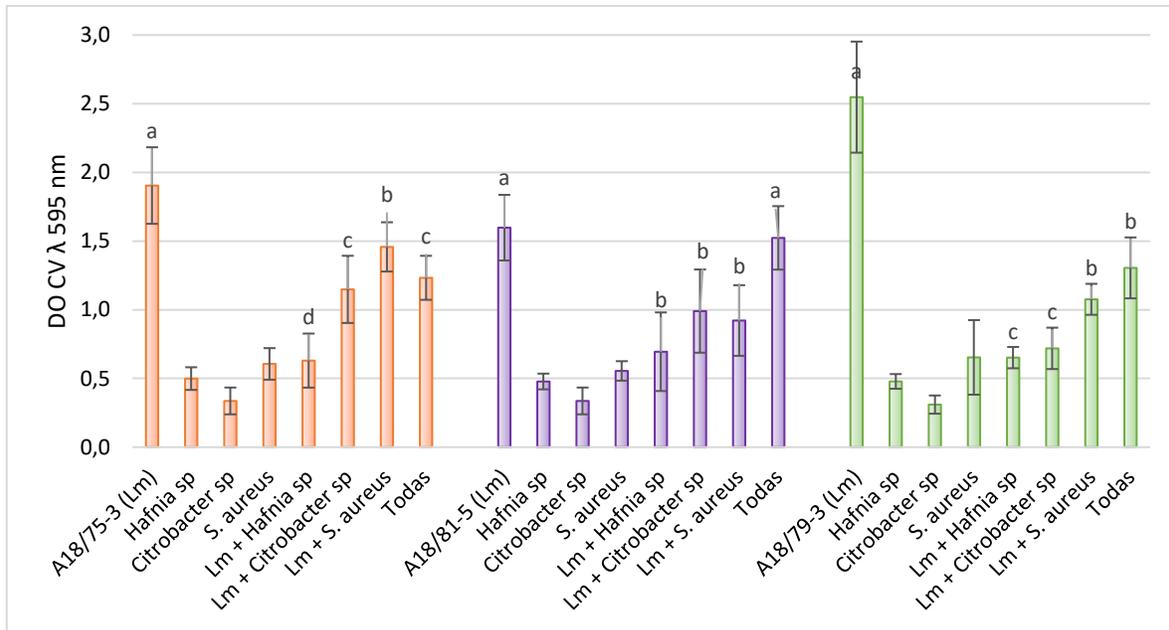
formar mayor cantidad de biopelículas (A18/75-3, A18/81-5 y A18/79-3 en poliestireno). Para los siguientes ensayos de formación de biopelículas mixtas se decidió utilizar superficies de poliestireno, y se consideró los seis aislados anteriores por su fenotipo contrastante, es decir cepas bajas y cepas altas formadoras de biopelículas, las cuales cuando fueron comparadas entre sí evidenciaron diferencias significativas en la cantidad formada ( $P$  value  $<0,05$ ).

### **3.3 Ensayos de formación de biopelículas monoespecie, duales y mixtas**

Posteriormente, se evaluó el efecto de otras especies bacterianas en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. Para ello, con un total de cuatro especies (*L. monocytogenes*, *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus*), se llevaron a cabo diferentes combinaciones para los ensayos de formación de biopelículas mixtas y duales. Para este estudio se consideró a las seis cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas anteriormente. La cantidad total de biopelícula formada por conformación, determinada mediante el método de tinción con CV (2.4.1), se presenta en las Figuras 4 y 5.



**Figura 4. Cantidad total de biopelícula formada según cepas de *L. monocytogenes* (Lm) bajas formadoras en distintas conformaciones experimentales.** Se observan conformaciones de biopelículas monoespecie, duales y mixtas (Todas: *L. monocytogenes*, *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus*). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas. Cada barra indica el promedio de tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las conformaciones indicadas ( $P$  value <0,05).

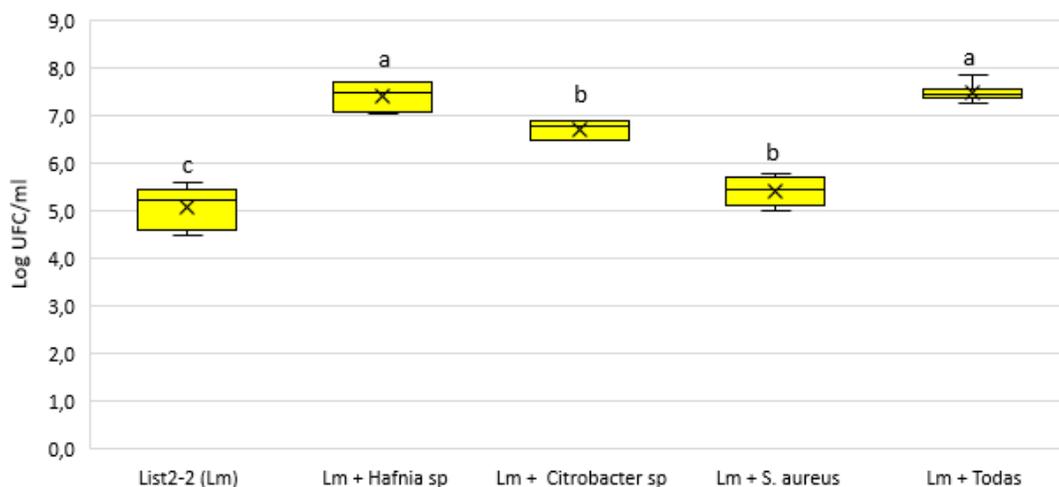


**Figura 5. Cantidad total de biopelícula formada según cepas de *L. monocytogenes* (Lm) altas formadoras en distintas conformaciones experimentales.** Se observan conformaciones de biopelículas monoespecie, duales y mixtas (Todas: *L. monocytogenes*, *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus*). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas. Cada barra indica el promedio de tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las conformaciones indicadas ( $P$  value <0,05).

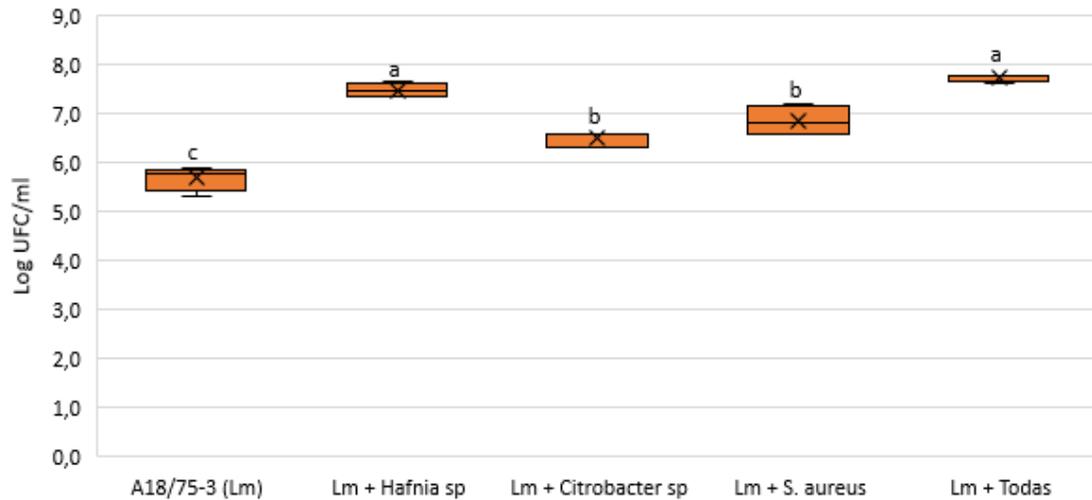
En la Figura 4, que incluye a las cepas de *L. monocytogenes* definidas como bajas formadoras de biopelículas, se observa que cuando se formaron biopelículas con todas las especies, la cantidad total es similar a cuando *L. monocytogenes* formó biopelículas sola o con una especie. Por su parte, en la Figura 5 (cepas altas formadoras de biopelículas), en su mayoría los resultados muestran una menor cuantificación ( $P$  value <0,05) de biopelículas mediante CV cuando *L. monocytogenes* está con una o con todas las especies respecto a cuando está sola.

Posteriormente, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) totales en las diferentes conformaciones de las biopelículas. Para ello, se utilizaron las cepas Lmo 656-1, List2-2, A18/75-3 y A18/79-3. Los recuentos obtenidos de las cepas de *L.*

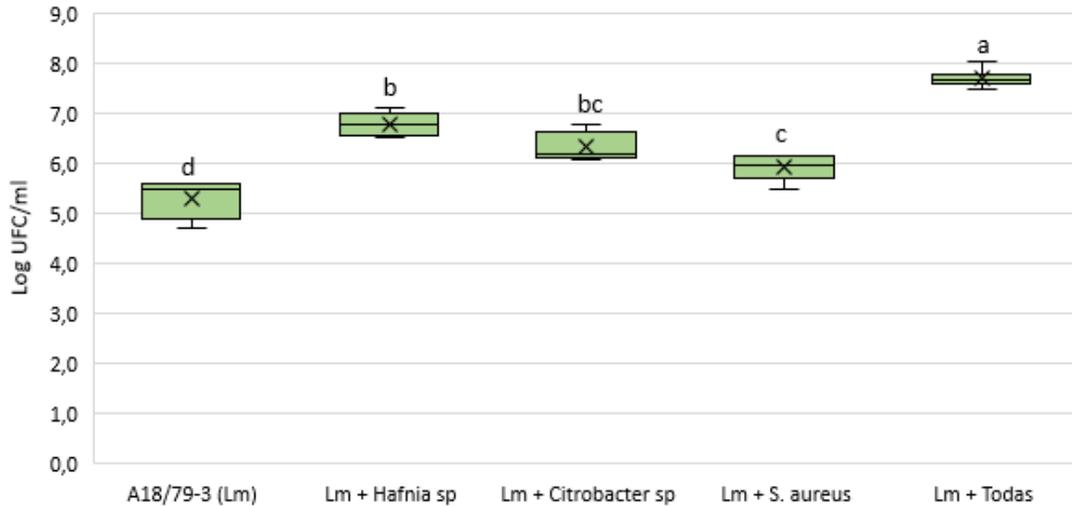
*monocytogenes* según la conformación experimental de formación de biopelículas, se presentan en las Figuras 6, 7 y 8.



**Figura 6. Recuentos de UFC/ml de la cepa baja formadora de *L. monocytogenes* List2-2 según la conformación experimental de biopelículas.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en las conformaciones biopelícula mono especie (Lm), dual (Lm + otra especie) y mixta (Lm + Todas). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value <0,05). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.



**Figura 7. Recuentos de UFC/ml de la cepa baja formadora de *L. monocytogenes* A18/75-3 según la conformación experimental de biopelículas.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en las conformaciones biopelícula monoespecie (Lm), dual (Lm + otra especie) y mixta (Lm + Todas). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value <0,05). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.

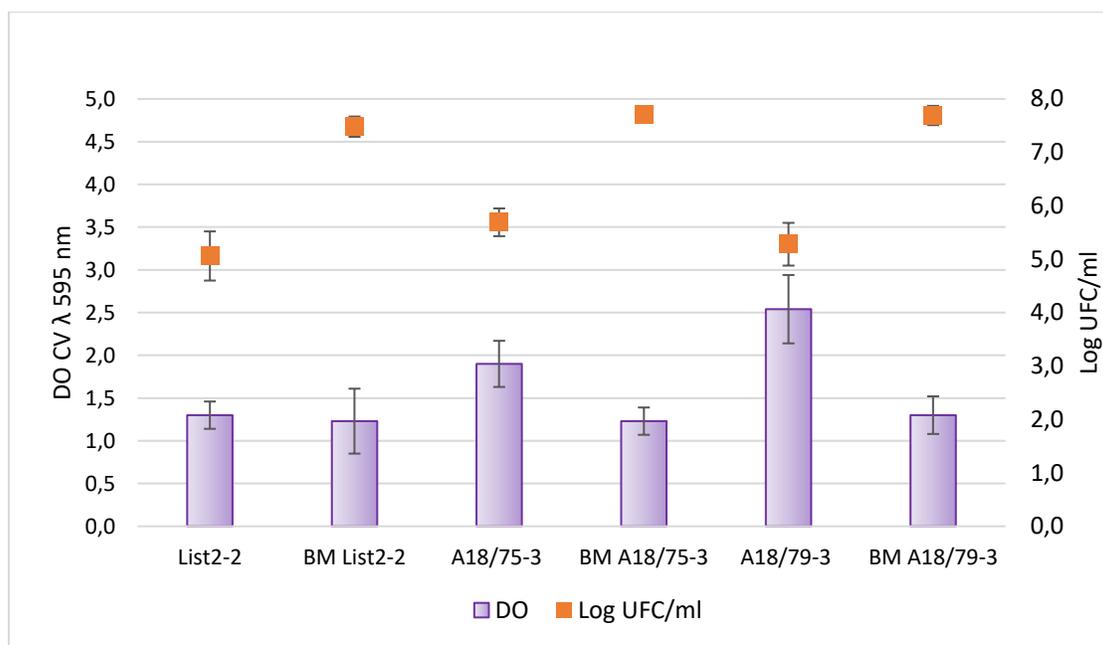


**Figura 8. Recuentos de UFC/ml de la cepa baja formadora de *L. monocytogenes* A18/79-3 según la conformación experimental de biopelículas.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en las conformaciones biopelícula monoespecie (Lm), dual (Lm + otra especie) y mixta (Lm + Todas). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value  $<0,05$ ). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.

El análisis cuantitativo de las biopelículas muestra aumentos estadísticamente significativos ( $P$  value  $<0,05$ ) de las UFC de *L. monocytogenes* formando biopelículas acompañada en comparación a su crecimiento como biopelícula monoespecie. Asimismo, se observó que los mayores aumentos ocurrieron cuando formó biopelículas duales junto a *Hafnia* sp. y mixtas con todas las especies. Cabe señalar que no se observó crecimiento de colonias por la cepa Lmo 656-1 en las conformaciones de biopelícula dual y mixta.

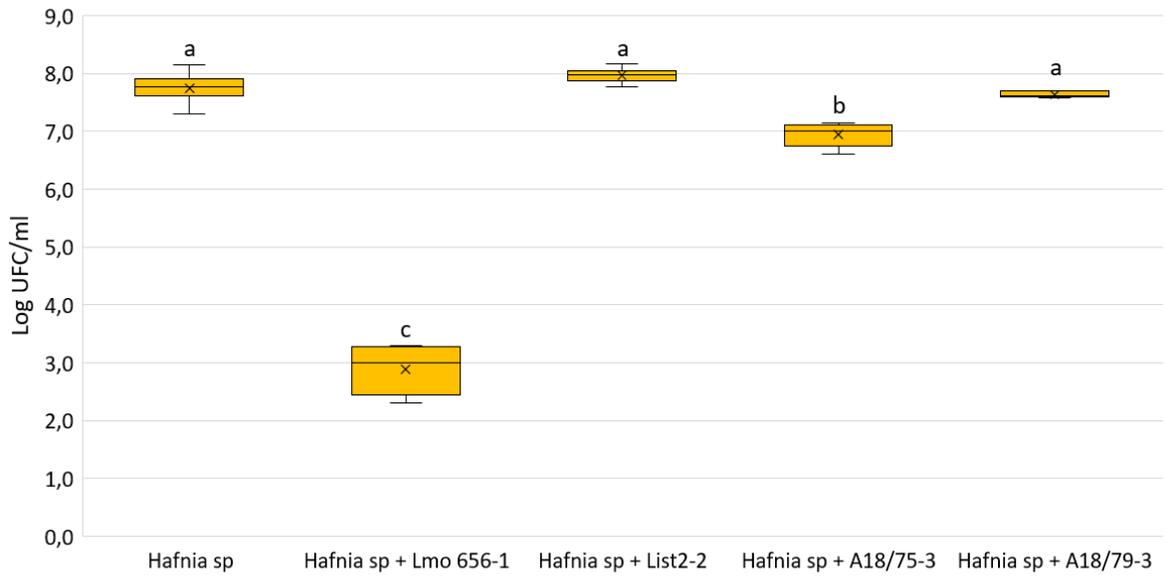
El análisis de los resultados observados con el método de tinción con CV y los recuentos de UFC, reveló diferencias en las tendencias obtenidas. Mientras que en general las cuantificaciones totales con CV de las cepas List2-2, A18/75-3 y A18/79-3 de *L. monocytogenes* formando biopelículas monoespecie eran mayores a las cuantificaciones de las biopelículas duales y mixtas que las incluían, sus recuentos celulares (UFC) fueron

mayores cuando se encontraban acompañadas por una o por todas las especies bacterianas. En la Figura 9, se resumen las fluctuaciones entre las cuantificaciones con CV y los recuentos de *L. monocytogenes* en biopelículas monoespecie y mixtas.

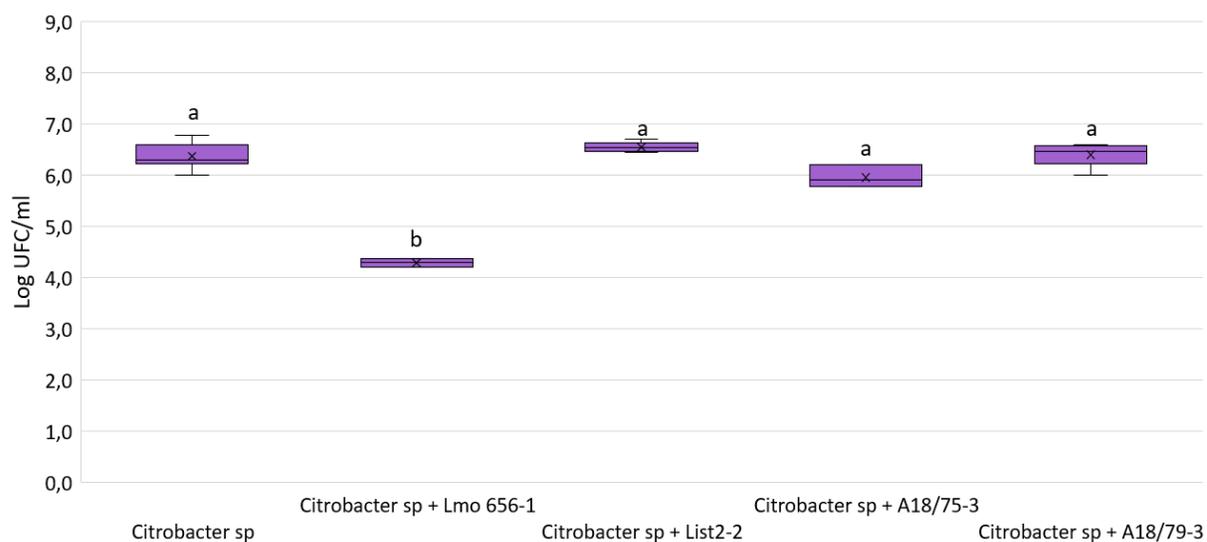


**Figura 9. Cuantificaciones totales mediante tinción con CV y recuentos celulares por cepa de *L. monocytogenes* formando biopelículas monoespecie y mixtas.** En morado, se observan las cuantificaciones totales con CV de las biopelículas monoespecie de *L. monocytogenes* y mixtas (BM) que incluyen todas las especies bacterianas junto a la cepa de *L. monocytogenes* correspondiente. En naranja, se indican los recuentos celulares de *L. monocytogenes* en biopelículas monoespecie y mixtas (BM). Los recuentos en las biopelículas mixtas incluyen solo a *L. monocytogenes*. Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas. Cada barra y cuadrado indica el promedio de tres réplicas técnicas y dos réplicas biológicas.

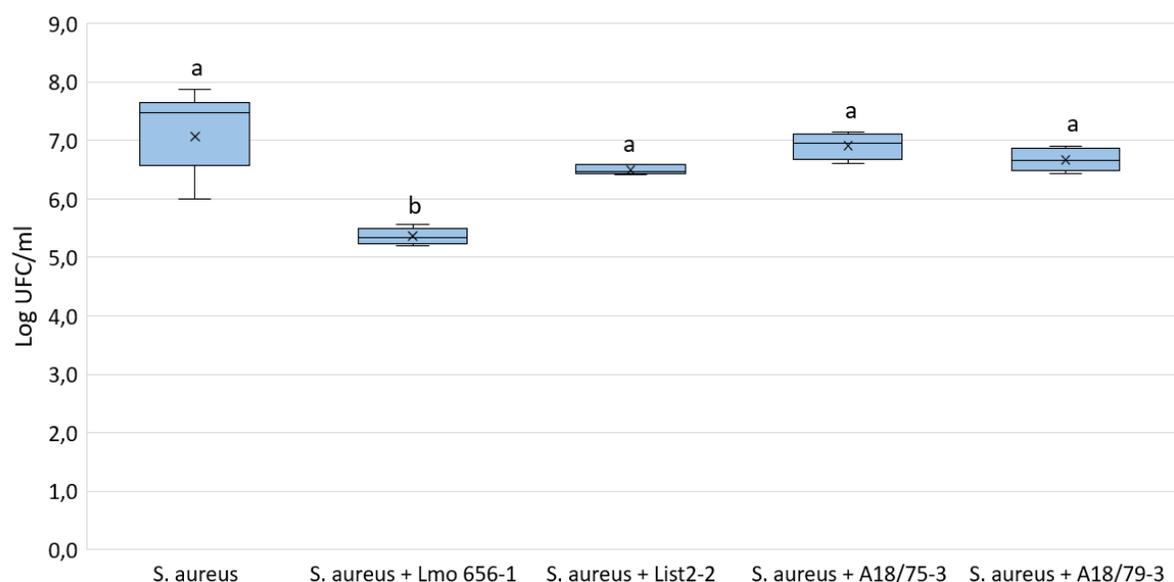
Por su parte, la cantidad de células de *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus* en biopelículas monoespecie y junto a las distintas cepas de *L. monocytogenes* se presentan en las Figuras 10, 11 y 12. Solo en el caso de la cepa Lmo 656-1, se observó una baja en los recuentos celulares de las especies bacterianas acompañantes ( $P$  value <0,05).



**Figura 10. Cantidad de células de *Hafnia* sp. en biopelículas monoespecie y duales con las distintas cepas de *L. monocytogenes*.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en conformaciones de biopelícula monoespecie (*Hafnia* sp.) y dual (*Hafnia* sp. + cepa de *L. monocytogenes*). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value <0,05). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.

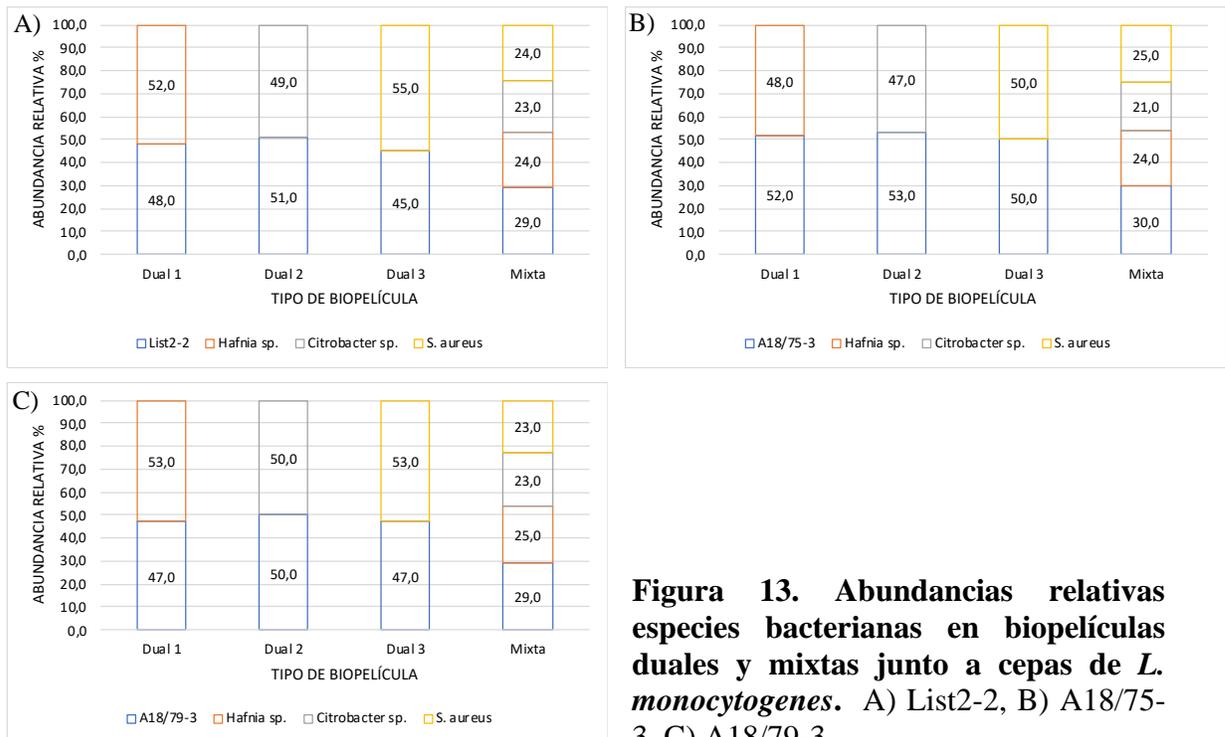


**Figura 11. Cantidad de células de *Citrobacter sp.* en biopelículas monoespecie y duales con las distintas cepas de *L. monocytogenes*.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en conformaciones de biopelícula monoespecie (*Citrobacter sp.*) y dual (*Citrobacter sp.* + cepa de *L. monocytogenes*). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value <0,05). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.



**Figura 12. Cantidad de células de *S. aureus* en biopelículas mono-especie y duales con las distintas cepas de *L. monocytogenes*.** En el gráfico, cada caja indica la distribución de los recuentos en conformaciones de biopelícula mono-especie (*S. aureus*) y dual (*S. aureus* + cepa de *L. monocytogenes*). Las líneas horizontales indican la mediana de los datos, y las líneas verticales (bigotes) los valores mínimos y máximos. Letras distintas sobre las cajas indican diferencias significativas entre las conformaciones ( $P$  value  $<0,05$ ). Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas.

Por último, en base al análisis de los recuentos celulares obtenidos de cada especie bacteriana que conformaron las biopelículas duales y mixtas, se estimaron las abundancias relativas de las diferentes especies según las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas (Figura 13). Para las tres cepas de *L. monocytogenes* analizadas, se observa que en general en las biopelículas duales las proporciones entre especies son semejantes.



**Figura 13. Abundancias relativas especies bacterianas en biopelículas duales y mixtas junto a cepas de *L. monocytogenes*. A) List2-2, B) A18/75-3, C) A18/79-3.**

### 3.4 Ensayos transcripcionales

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la presencia de *Hafnia* sp. en la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* cepa List2-2 en el estado de biopelículas. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de abundancia relativa a través de la técnica de RT-qPCR, y se analizaron genes que codifican proteínas involucradas en los procesos de formación de biopelículas y respuesta a estrés específicos de *L. monocytogenes*.

#### 3.4.1 Genes de formación de biopelículas y respuesta a estrés:

En base a la revisión de literatura se identificaron genes relacionados con la formación de biopelículas y respuesta a estrés en *L. monocytogenes* (Tabla 2). A partir de estos, cuatro de

ellos fueron seleccionados para evaluar su abundancia relativa en respuesta a la presencia de *Hafnia* sp. Estos genes correspondieron a *pflA*, que codifica para la proteína piruvato formiato liasa, la cual participa en el metabolismo de carbohidratos; el gen *lmo0644*, que codifica para una LTA primasa, la cual sintetiza la estructura principal del ácido lipoteicoico o LTA; el gen *agrD*, que sintetiza un precursor del péptido autoinductor AgrD, relacionado al sistema de dos componentes de QS, y el gen *sigB*, que codifica para un factor sigma de la RNA polimerasa, y participa en la adaptación a diferentes condiciones de estrés y virulencia (Tabla 2).

#### 3.4.2 Búsqueda de gen normalizador:

Se evaluó la especificidad de los genes normalizadores candidatos a través de una reacción de PCR con partidores detallados en la Tabla 2, y se utilizó DNA de *L. monocytogenes* y *Hafnia* sp. Los resultados demostraron especificidad de los genes *rpoA*, *rpoB* e *idh* para *L. monocytogenes* (no se detectó amplificación al usar el DNA de *Hafnia* sp., data no mostrada). Posteriormente, se llevaron a cabo qPCR de estos últimos tres genes para seleccionar el gen normalizador de *L. monocytogenes* más apropiado. Para ello, se seleccionó el gen que en la condición control su Ct (“*threshold point*” o ciclo umbral) fuera menor a 20, y que su abundancia se mantuviera relativamente constante entre ambas condiciones (biopelícula monoespecie de *L. monocytogenes* y en presencia de *Hafnia* sp). En base a este análisis se seleccionó al gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa (Zilelidou y col., 2020).

### 3.4.3 Extracción RNA:

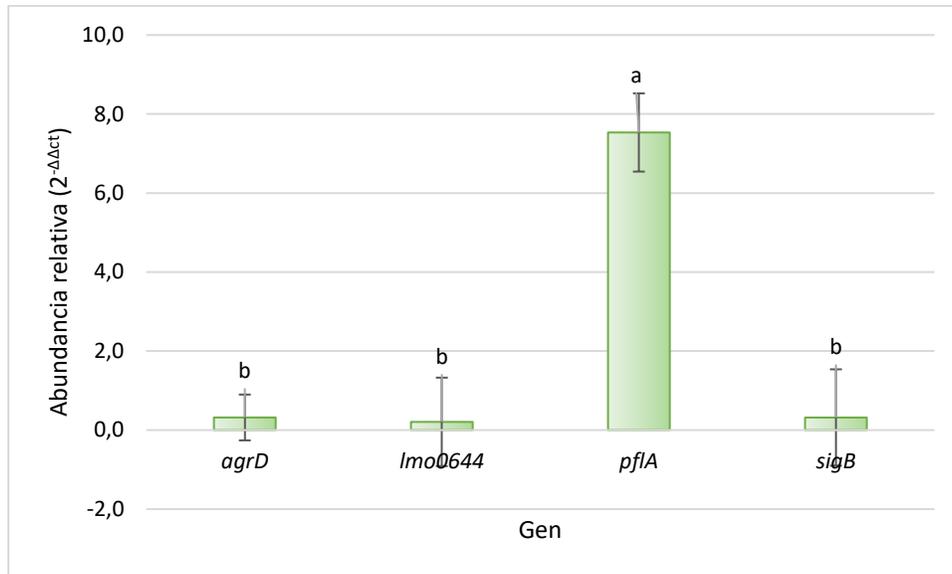
Las concentraciones de RNA extraído desde las biopelículas monoespecie de *L. monocytogenes* y duales junto a *Hafnia* sp., con sus respectivas razones de pureza, se presentan en la Tabla 4. La integridad del RNA extraído por conformación se observa en la Figura S1.

**Tabla 4. Valores de concentración y pureza del RNA extraído por conformación de biopelícula.** Se observan tres réplicas técnicas por condición.

Biopelícula	ng/μl	260/280	260/230
Monoespecie (List2-2)	384,0	3,117	1,765
Monoespecie (List2-2)	764,0	1,910	2,028
Monoespecie (List2-2)	1419	1,829	1,731
Dual (List2-2 + <i>Hafnia</i> sp.)	286,4	1,781	1,178
Dual (List2-2 + <i>Hafnia</i> sp.)	256,0	1,916	1,860
Dual (List2-2 + <i>Hafnia</i> sp.)	514,4	1,822	1,880

### 3.4.4 Evaluación de la abundancia relativa para los genes seleccionados:

A través de la técnica de RT-qPCR, se evaluó si la presencia de *Hafnia* sp. en biopelículas duales con *L. monocytogenes* modifica la respuesta transcripcional de los genes *pflA*, *lmo0644*, *agrD* y *sigB* de *L. monocytogenes* (Figura 14).



**Figura 14. Abundancia relativa de los genes de *L. monocytogenes* cepa List2-2 en biopelículas duales con *Hafnia* sp.** La condición control correspondió a las biopelículas monoespecie de *L. monocytogenes* List2-2. Biopelículas formadas en placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 48 horas. Cada barra indica el promedio de tres réplicas técnicas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre los genes.

Los resultados muestran mayor abundancia relativa del gen *pflA* ( $P$  value <0,05) en respuesta a la presencia de *Hafnia* sp., mientras que los genes *agrD*, *lmo0644* y *sigB* no cambiaron su abundancia.

## 4 DISCUSIÓN

*L. monocytogenes* es un patógeno alimentario causante de listeriosis, y entre sus mecanismos de persistencia más estudiados se encuentra la formación de biopelículas (Silva y col., 2008; Galié y col., 2018).

Mientras la mayoría de las investigaciones se han enfocado en estudiar biopelículas monoespecie, existe gran evidencia de que en los ambientes naturales e industriales la conformación de estas biopelículas es predominantemente multiespecie o mixta, incluyendo a *L. monocytogenes* (Burmølle y col., 2014; Lee y col., 2014; Røder y col., 2020). Esto cobra especial relevancia ya que se ha observado que al producirse interacciones inter-especies, el comportamiento de las biopelículas mixtas difiere del comportamiento de las biopelículas de una sola especie, por ejemplo, en cuanto a una mejor tolerancia al estrés, una mayor producción de biomasa, señalización a nivel comunitario y cooperación metabólica (Tan y col., 2017).

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* al interactuar con otros microorganismos en biopelículas mixtas, utilizando especies bacterianas comúnmente encontradas en superficies de la industria alimentaria. El efecto o impacto de microorganismos acompañantes en el comportamiento de *L. monocytogenes* formando biopelículas se evaluó principalmente a nivel de biomasa total y celular, y posteriores estudios de respuesta transcripcional a través de la determinación de la abundancia relativa de ciertos genes.

## **Identificación y selección de especies bacterianas desde muestras de superficie de una planta salmonera**

La presencia de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente descrita en industrias lácteas, cárnicas y salmoneras (Galié y col., 2018; Fagerlund y col., 2021). La coexistencia del patógeno con otros microorganismos encontrados en las mismas infraestructuras podría ser un indicio de generación de biopelículas entre estas especies (Fagerlund y col., 2021). Por ello, en el presente estudio se tomó como referencia una de estas industrias (salmonera) para aislar e identificar especies bacterianas potencialmente capaces de formar biopelículas junto a *L. monocytogenes*.

La identificación de *Hafnia* sp. y *Citrobacter* sp. en muestras de superficie de una planta salmonera supuso buenos candidatos para evaluar la formación de biopelículas mixtas junto a *L. monocytogenes*, ya que miembros de estos géneros han sido descritos en la literatura como microorganismos de interés en la industria alimentaria al ser frecuentemente aislados desde equipos de las plantas procesadoras de alimentos (Monganello y col., 2001; Lorenzo y col., 2010; Carrizosa y col., 2017). Además, se han realizado estudios que involucran la formación de biopelículas principalmente de las especies modelo de estos géneros: *Hafnia alvei* y *Citrobacter freundii* (Allan y col., 2002; Vivas y col., 2008; Cai y col., 2018; Zhu y col., 2019). Por otro lado, también ha sido descrita la patogenicidad en humanos de algunas de sus cepas bacterianas (Benito y col., 2008; Samonis y col., 2009; Librenta y col., 2017).

Por su parte, la bacteria Gram positiva *S. aureus* al igual que *L. monocytogenes*, es un patógeno causante de ETAs, y ha sido ampliamente descrita su capacidad de formación de biopelículas (Rode y col., 2007; Bencardino y col., 2021). Por lo tanto, también fue incorporada a los experimentos de formación de biopelículas monoespecie, duales y mixtas.

## **Ensayos de formación de biopelículas con distintas cepas de *L. monocytogenes* en dos tipos de superficies**

Se evaluó la formación de biopelículas de 14 cepas de *L. monocytogenes* disponibles en nuestro laboratorio. En estos ensayos además se evaluó dos tipos de superficies comúnmente encontradas en la industria alimentaria, sobre las cuales ya se ha descrito la capacidad de colonización y formación de biopelículas por *L. monocytogenes*: acero inoxidable y poliestireno (Takahashi y col., 2010; Poimenidou y col., 2016; da Silva y col., 2021). La finalidad fue realizar una comparación entre estas superficies de la cantidad de biopelícula formada por las distintas cepas de *L. monocytogenes*, utilizando el método de tinción con CV (Darwish & Asfour, 2013).

Se ha investigado la influencia del tipo de material sólido en la capacidad de formación de biopelículas por *L. monocytogenes*, sin haber llegado a un consenso respecto a las características de los sustratos que podrían favorecer la formación de biopelículas por esta bacteria. Sin embargo, existe amplia evidencia que las diferencias en la adherencia inicial y posterior generación de biopelículas de *L. monocytogenes* son resultado de las diferencias en las propiedades fisicoquímicas específicas de la superficie celular de cada cepa, en conjunto con las características de los materiales. Chae y col. (2006) documentaron que la adherencia inicial de *L. monocytogenes* a portaobjetos de vidrio dependía en gran medida de la fuerza de atracción electrostática celular. En el estudio de Takahashi y col. (2010), se obtuvo que la elevada hidrofobicidad celular de cepas de *L. monocytogenes* (con afinidad a solventes no polares) tuvo un alto grado de correlación en la adherencia inicial y la formación de biopelículas en PVC, un material también de propiedades hidrofóbicas. Por lo tanto, las

características fisicoquímicas de las cepas de *L. monocytogenes*, y no solo el tipo de material como se creyó en un principio, serían determinantes en la cantidad de biopelícula formada.

Se proponen experimentos futuros que permitan ahondar en las propiedades fisicoquímicas de las superficies celulares de nuestras cepas. Entre ellos, un ensayo indicado sería MATS (Microbial Adhesion To Solvent) descrito por Bellon-Fontaine y col. (1996), el cual evalúa la hidrofobicidad de las superficies bacterianas y las propiedades ácido-base de Lewis (interacciones donadoras-aceptoras de electrones) comparando las afinidades con solventes polares y no polares. Estos resultados podrían dar cuenta de una relación entre hidrofobicidad celular, interacciones de electrones y afinidad al acero inoxidable de las tres cepas evaluadas que formaron mayor cantidad de biopelícula en esta superficie.

### **Ensayos de formación de biopelículas monoespecie, duales y mixtas**

Con el fin de evaluar el efecto de los géneros bacterianos aislados desde la industria salmonera, junto con *S. aureus*, en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*, se llevaron a cabo ensayos de formación de biopelículas mixtas.

Para comenzar, se determinó la cantidad total de biopelícula formada por cada conformación (monoespecie, dual y mixta) mediante cuantificaciones por tinción con CV. De los resultados obtenidos en esta etapa, se dedujo un comportamiento diferente entre las cepas de *L. monocytogenes* altas y bajas formadoras de biopelículas. Al respecto, Fox y col. (2014) destacaron que la microbiota superficial que se encuentra en las plantas procesadoras de alimentos puede incluir bacterias con el potencial de aumentar o disminuir la adhesión y formación de biopelículas por *L. monocytogenes*. Asimismo, Chen y col. (2019) investigaron los cambios dinámicos en biopelículas monoespecies y duales por *L. monocytogenes* y el

patógeno *Vibrio parahaemolyticus*. En comparación con las biopelículas de una sola especie, la biomasa total de las biopelículas duales fue significativamente más baja, lo que se confirmó mediante tinción con CV y algunos tipos de microscopía. Por lo tanto, en una primera aproximación los resultados sugerían que ciertas interacciones podrían provocar una disminución en la biomasa total de las biopelículas de *L. monocytogenes* cuando formaba biopelículas con otras especies bacterianas respecto a cuando se encontraba sola.

Con el fin de discernir lo que estaría ocurriendo con *L. monocytogenes*, e identificar la verdadera predominancia de cada especie bacteriana en la estructura de las biopelículas, se realizaron cuantificaciones celulares mediante recuento en placas. Excepto por la cepa Lmo 656-1, y contrario a lo que se infirió a partir de los resultados de cuantificación por cristal violeta, los recuentos de poblaciones sésiles indicaron aumentos estadísticamente significativos ( $P$  value  $<0,05$ ) de las cepas List2-2, A18/75-3 y A18/79 de *L. monocytogenes* al formar biopelículas duales y mixtas. Interesantemente, para las tres cepas los mayores aumentos ocurrieron en las conformaciones duales con *Hafnia* sp. y mixtas con todas las especies bacterianas (que también incluían a *Hafnia* sp).

Se ha reportado que las biopelículas multiespecies podrían proporcionar nichos estables para *L. monocytogenes*, donde la matriz extracelular que engloba a las células puede protegerlas de biocidas y otros factores de estrés (Fagerlund y col., 2021). Sin embargo, hasta la fecha no se habían realizado investigaciones que describieran directamente un aumento en la biomasa celular de *L. monocytogenes* en estas conformaciones. Por el contrario, múltiples estudios que han involucrado bacterias Gram negativas (entre ellas *Pseudomonas* spp y Enterobacterias) y Gram positivas (bacterias ácido-lácticas y *Bacillus cereus*, entre otros), sugieren una disminución en la cantidad de células viables de *L. monocytogenes* en

comparación a su conformación monoespecie, o ningún tipo de efecto (Rieu y col., 2008a; Daneshvar y col., 2013; Heir y col., 2018, Fagerlund y col., 2021). Tampoco han sido reportadas hasta la fecha investigaciones que involucren a las especies bacterianas *Hafnia* sp. y *Citrobacter* sp. en la formación de biopelículas duales o multiespecies con *L. monocytogenes*.

Autores como Burmølle y col. (2014) y Giaouris y col. (2015) describieron posibles mecanismos subyacentes beneficiosos que explicarían algunas de las propiedades emergentes en los conjuntos de biopelículas multiespecie, y que podrían producir los fenotipos obtenidos en este trabajo. Entre ellos, nombran al co-metabolismo, donde una especie bacteriana produce o elimina sustratos permitiendo el crecimiento de otra especie; la co-agregación, donde se producen uniones célula-célula de diferentes especies a través de componentes específicos tipo receptor-ligando asociados a la superficie; la transferencia horizontal de genes (HGT), donde DNA plasmídico se transfiere de una especie a otra a través de los pili conjugativos (conjugación); y la ocurrencia de Quorum Sensing a través de compuestos difusibles.

Además de las interacciones nombradas anteriormente, Burmølle y col. (2014) destacan la cooperatividad y competitividad de las especies. Se clasifica como cooperativa si la acción da como resultado una ganancia de aptitud a través del aumento de la reproducción del receptor. Esto se puede reflejar en una mayor biomasa, resistencia y función de la comunidad de biopelículas en total, de la cual todas las especies presentes pueden beneficiarse. Con nuestros resultados, no es correcto afirmar que ocurrió cooperatividad sin antes someter a otro tipo de estrés a las biopelículas. Por ejemplo, probar resistencia a compuestos antimicrobianos, como se ha realizado en una variedad de estudios enfocados en estudiar

interacciones sinérgicas en biopelículas mixtas con *L. monocytogenes* (Kostaki y col., 2012; Poimenidou y col., 2016; Oxaran y col., 2018; Papaioannou y col., 2018; da Silva y col., 2021).

Por otro lado, los comportamientos competitivos afectan negativamente al receptor (Burmølle y col., 2014). En nuestro trabajo, esto podría haber ocurrido con la cepa Lmo 656-1 de *L. monocytogenes*. Esta cepa tuvo un comportamiento similar a la información general que se ha reportado, donde *L. monocytogenes* se ve inhibida por los microorganismos acompañantes. Sin embargo, es llamativo que el efecto negativo además de ser observado en la cepa Lmo 656-1, también repercutiera en las otras especies bacterianas en co-cultivo, las cuales bajaron sus órdenes de magnitud (Figuras 10, 11 y 12). Probablemente, las razones subyacentes detrás de esta inhibición serían el antagonismo entre todos los microorganismos, principalmente por los nutrientes y el espacio disponible para colonizar (Rendueles & Ghigo, 2012), eliminándose completamente el crecimiento de Lmo 656-1. Las evidencias sobre las interacciones de esta naturaleza en las biopelículas incluyen además producción de bacteriocinas y reducción del pH por parte de algún miembro del consorcio de biopelículas (Burmølle y col., 2006).

Asimismo, estudios anteriores han demostrado que las diferentes cepas de *L. monocytogenes* que están presentes en las comunidades de biopelículas mixtas pueden no contribuir al mismo nivel ni a su formación ni a su resistencia antimicrobiana, indicando que los factores involucrados en estos procesos serían cepa-específicos (Borucki y col., 2003; Nilsson y col., 2011; Mosquera-Fernández y col., 2014).

En el presente estudio, la tendencia observada mediante el método de CV (cantidad total de biopelícula formada) de las biopelículas de *L. monocytogenes*, difirió a lo observado

mediante recuento de células viables en las distintas conformaciones. La tinción con cristal violeta tiene la función de unirse tanto a la pared celular bacteriana como a la matriz extracelular (conformada por carbohidratos, proteínas y DNA) de las biopelículas (Combrouse y col., 2013); esto nos hizo suponer que lo que mayormente se estaba cuantificando en las conformaciones monoespecie de *L. monocytogenes* era matriz extracelular, la cual, por un efecto de las demás especies, disminuyó su secreción cuando *L. monocytogenes* formó biopelículas acompañada, a la vez que sus recuentos celulares aumentaron.

Con el fin de comprender en mayor profundidad lo que estaría ocurriendo a nivel de matriz extracelular, se proponen otros enfoques experimentales futuros en nuestra investigación. Una opción es optar por la cuantificación de polisacáridos con el método Fenol-Ácido sulfúrico (Nakamura y col., 2013). Además, con el método Lowry (Janissen y col., 2015), es posible medir la cantidad de proteínas en la matriz. Con estas técnicas se han obtenido resultados como los descritos por Chen y col. (2019), quienes encontraron que los carbohidratos eran el compuesto más abundante en las EPS de biopelículas monoespecie de *L. monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*, los cuales se redujeron significativamente en las biopelículas duales formadas por estos dos patógenos.

### **Ensayos transcripcionales**

El estudio de la respuesta transcripcional en patógenos alimentarios nos permite entender los mecanismos moleculares por los cuales son capaces de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales encontradas en la industria alimentaria, tales como bajas temperaturas, disponibilidad de nutrientes, exposición a antimicrobianos y también presencia de otros

microorganismos. Debido a la ampliamente descrita capacidad de formación de biopelículas por estos patógenos como mecanismo de defensa y las consecuentes problemáticas acarreadas en las plantas procesadoras de alimentos, hasta la fecha se siguen investigando formas más eficientes de extraer mRNA desde estas estructuras en cantidad, pureza e integridad adecuada para su posterior cuantificación por técnicas como qPCR. Esta técnica es la más utilizada para comparar niveles relativos de mRNA para genes de interés entre muestras biológicas (Bustin y col., 2005; Carvalhais y col., 2013).

Sin embargo, uno de los principales desafíos en aplicar técnicas que requieren extracción de ácidos ribonucleicos desde biopelículas tiene relación con la presencia de una matriz extracelular rica en polisacáridos, los cuales parecieran dificultar la lisis celular, a la vez que aumentan la cantidad de sustancias inhibitorias que influirían en la pureza y calidad de los ácidos ribonucleicos obtenidos (França y col., 2012). Además, como ocurrió en este estudio, la presencia de más de una especie bacteriana en estas conformaciones exige una selección rigurosa de las metodologías para obtener medidas cuantitativas de poblaciones individuales dentro de las mismas, y así comprender el comportamiento y dinámica de los miembros (Magalhães y col., 2019). Por lo tanto, desde un comienzo la búsqueda de genes normalizadores y de formación de biopelículas/respuesta a estrés debió ser específica para el genoma de la especie bacteriana en estudio (*L. monocytogenes*).

En el presente trabajo, se tuvo por objetivo realizar una aproximación experimental de la respuesta transcripcional de *L. monocytogenes* cepa List2-2 formando biopelículas duales junto a *Hafnia* sp., utilizando genes relacionados a la formación de biopelículas y respuesta a estrés específicos de *L. monocytogenes*. Los resultados de abundancia relativa calculados a partir de los datos de RT-qPCR indicaron una mayor la abundancia del transcrito del gen

*pflA*, mientras que los genes *lmo0644*, *agrD* y *sigB* no cambiaron su abundancia respecto a las biopelículas monoespecie de *L. monocytogenes*. Hasta la fecha, no se han reportado investigaciones que analicen expresión génica de *L. monocytogenes* en biopelículas duales o multiespecie, y si bien los resultados obtenidos en este estudio requieren de mayor experimentación, dejan entrever posibles mecanismos de interacción inter-especie que a continuación serán analizados.

La función de la proteína codificada por el gen *pflA* se relaciona al metabolismo de carbohidratos, la cual corresponde a una enzima similar a una piruvato formiato liasa, la cual bajo condiciones fermentativas convierte al piruvato en formiato y acetil coenzima A (Arous y col., 2004; Assisi y col., 2021). Si bien se desconoce el mecanismo específico, este gen ha sido ampliamente relacionado a la capacidad de formación de biopelículas en *L. monocytogenes*. Assisi y col. (2021) compararon el transcriptoma de muestras de biopelículas versus células planctónicas de cuatro aislamientos de *L. monocytogenes*, y entre los genes con mayor expresión incluyeron a los genes metabólicos *pflAB*. Por su parte, Melian y col. (2022) estudiaron la formación de biopelículas de tres cepas de *L. monocytogenes* expuestas a frío y bacteriocinas, analizando por RT-qPCR un total de 30 genes relacionados con la adhesión, la virulencia y la respuesta al estrés, así como el metabolismo de carbohidratos. Todas las cepas mostraron una mayor abundancia del transcrito del gen *pflA* y otros genes relacionados al metabolismo del piruvato al formar biopelículas bajo estos estresores. Al respecto, recientemente se ha evidenciado la influencia de la ruta de fermentación del piruvato en la inducción de la formación de biopelículas en otras especies bacterianas (Goodwine y col., 2019; Tremblay y col., 2021). Todo lo anterior nos permitiría sugerir que, en el presente estudio, *L. monocytogenes* cepa List2-2 podría

haber aumentado la función de esta y otras vías del metabolismo de carbohidratos frente a la presencia de otro microorganismo que actuaría como estresor, lo que aumentó su cantidad de células en las biopelículas, tal como como fue observado en los recuentos de esta cepa junto a *Hafnia* sp.

Como fue mencionado, los genes *lmo0644*, *agrD* y *sigB* no cambiaron su abundancia relativa en respuesta a la presencia de *Hafnia* sp. en las biopelículas duales con List2-2 después de 48 horas. *Lmo0644* codifica para una LTA primasa (de la familia sulfatasa de membrana), la cual sintetiza la estructura principal del ácido lipoteicoico o LTA (Chang y col., 2012). Este polímero forma parte de la pared celular de todas las bacterias Gram positivas, y junto con los ácidos teicoicos y teicurónicos, suministran una carga neta negativa a la pared celular para la captación de cationes divalentes que se necesitan en diferentes actividades enzimáticas de la membrana, además de especificidad antigénica al sobresalir de la superficie celular (Brauge y col., 2015). Colagiorgi y col. (2016) resumieron los esfuerzos recientes realizados para caracterizar mejor las sustancias poliméricas que componen la matriz extracelular de las biopelículas de *L. monocytogenes*, y entre sus hallazgos nombraron a los ácidos lipoteicoicos como uno de los mayores componentes de esta matriz. Al respecto, en nuestro trabajo se observó una menor cantidad de matriz extracelular producida por *L. monocytogenes* cepa List2-2 en las biopelículas duales con *Hafnia* sp., lo que no podría relacionarse con el nulo cambio en la abundancia relativa del gen *lmo0644* que resultó de los ensayos transcripcionales. Es posible que la cuantificación de la expresión del gen no se haya realizado al tiempo en que la bacteria respondió transcripcionalmente para la síntesis de matriz extracelular frente a la presencia de otro microorganismo (48 horas).

El gen *sigB* codifica para un factor sigma alternativo de la RNA polimerasa, el cual regula aproximadamente 300 genes relacionados a la adaptación a diferentes condiciones de estrés y virulencia (Lakicevic y col., 2022). Por lo tanto, este gen contribuye a la capacidad de organismos como *L. monocytogenes* y otras bacterias Gram positivas para sobrevivir en condiciones ambientales y energéticas adversas (Kazmierczak y col., 2003). La formación de biopelículas por *L. monocytogenes* en presencia de otro microorganismo fue considerada en nuestro trabajo como una nueva condición de estrés, por lo que analizar genes de estas características nos pareció relevante. Sin embargo, tal como se observó en los resultados, no hubo cambios en la abundancia de *sigB* en la conformación de biopelícula dual con respecto a las biopelículas monoespecie. Por lo tanto, es posible que otros fueran los mecanismos desencadenados por *L. monocytogenes* cepa List2-2 para lograr desarrollarse y aumentar el número de células en presencia de *Hafnia* sp., y/o que la temporalidad evaluada en la formación de biopelículas (48 horas) no diera cuenta de cambios en la abundancia relativa de *sigB* respecto a la condición sin *Hafnia* sp. También, se podría suponer que los mecanismos que permitieron el aumento en la cantidad de células de *L. monocytogenes* no necesariamente se produjeron como respuesta a una condición adversa, sino que, por ejemplo, como una manera de interactuar cooperativamente con *Hafnia* sp.

Por su parte, el gen *agrD* codifica para el precursor del péptido autoinductor AgrD en *L. monocytogenes*, como parte del sistema de comunicación QS de dos componentes descrito para las bacterias Gram positivas (Garmyn y col., 2009). Autores como Riedel y col. (2007) y Rieu y col. (2009) reportaron la relación del sistema Agr de *L. monocytogenes* en el proceso de biopelículas, al desarrollar mutantes  $\Delta agrA$  o  $\Delta agrD$ , las que desarrollaron una significativa menor formación de estas estructuras. Para la conformación de biopelícula dual

estudiada en el presente trabajo, se esperaba que a nivel de señalización entre células de *L. monocytogenes* ocurrieran variaciones que se tradujeran en cambios en la abundancia relativa de *agrD*. Sin embargo, no se observaron cambios. Una de las posibilidades podría tener relación al tiempo de desarrollo de las biopelículas (48 horas), y que este haya sido bajo condiciones estáticas. Rieu y col. (2008b) estudiaron la expresión de los genes del sistema Agr en *L. monocytogenes* mediante seguimiento espaciotemporal de la fluorescencia emitida por el sistema reportero GFP (acoplado al promotor de Agr). Se observó que esta expresión dependía de las condiciones de crecimiento. Bajo condiciones estáticas, como en nuestro trabajo, la expresión fue baja, con menos del 1 % de las células expresando GFP en una biopelícula de 48 horas. En cambio, bajo condiciones dinámicas (agitación), la expresión de los genes de Agr aumentó del 15 % durante la adhesión inicial al 80 % en biopelículas maduras crecidas en celdas de flujo.

Existe un tercer sistema de QS descrito en bacterias, en el que la molécula de señalización se denomina autoinductor-2 (AI-2) y es sintetizado por el gen *luxS*. Este se ha propuesto como un sistema de comunicación entre especies, ya que se ha informado la producción de AI-2 en bacterias Gram positivas y negativas (Schauder y col., 2001; Sela y col., 2006). Es posible que la modulación/señalización de la biopelícula formada por *List2-2* en presencia de *Hafnia* sp. esté bajo la regulación de AI-2, lo cual debiera ser evaluado en ensayos futuros.

Por último, los análisis de abundancia relativa llevados a cabo en el presente trabajo sirvieron como una primera aproximación al estudio de los mecanismos moleculares de *L. monocytogenes* en biopelículas con otras especies bacterianas. Sin embargo, no se descartan futuros enfoques experimentales que entreguen información global, tales como RNAseq (secuenciación de RNA).

Un ejemplo de utilización de RNAseq fue el trabajo realizado por He y col (2017), quienes llevaron a cabo biopelículas duales entre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y el hongo *Candida albicans* (*C. albicans*) para investigar la influencia de este último en el transcriptoma de *S. mutans*. Se observó que la presencia de *C. albicans* modificó la respuesta transcripcional de *S. mutans* en la biopelícula de dos especies, siendo la mayoría de los genes regulados al alza relacionados al transporte de carbohidratos y los procesos metabólicos. Interesantemente, en este trabajo se encontró un elevado metabolismo de piruvato y galactosa por *S. mutans*, y el análisis de metabolitos confirmó una elevada cantidad de formiato en el medio de cultivo de las biopelículas duales. Como fue mencionado, en nuestra investigación también hubo un aumento en la abundancia relativa del gen *pflA* relacionado al metabolismo de carbohidratos, y a pesar de ser especies lejanas, es llamativo que estas vías del metabolismo coincidan en sus cambios al formar biopelículas con más de una especie bacteriana.

Finalmente, cual sea el enfoque experimental utilizado para abarcar estudios transcripcionales, se deben tener en cuenta las características de cada especie bacteriana y el tipo de conformación de biopelícula que se llevará a cabo.

## 5 CONCLUSIONES

Con este trabajo se pretendió aportar conocimiento en cuanto a los mecanismos de supervivencia y persistencia de *L. monocytogenes* en las instalaciones de la industria alimentaria, en esta ocasión con un enfoque en la formación de biopelículas mixtas. Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

- La cantidad de biopelícula formada por *L. monocytogenes* es cepa dependiente.
- El comportamiento de *L. monocytogenes* formando biopelículas con otras especies bacterianas se vio modificado con respecto a cuando formó biopelículas individuales. En biopelículas duales y mixtas junto a *Hafnia* sp., *Citrobacter* sp. y *S. aureus*, *L. monocytogenes* aumentó su biomasa celular independiente de la cepa de *L. monocytogenes*.
- En biopelículas duales y mixtas de *L. monocytogenes*, los cambios en la cantidad de matriz extracelular respecto a las biopelículas mono especie no se relacionaron directamente con los recuentos celulares.
- El gen *pflA*, relacionado al metabolismo de carbohidratos, presentó mayor abundancia transcripcional en *L. monocytogenes* en respuesta a la presencia de *Hafnia* sp., lo que puede estar asociado al mayor número de células formadoras de biopelículas detectadas en esta condición.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

Amador, C. I., Sternberg, C., & Jelsbak, L. 2017. Application of RNA-seq and Bioimaging Methods to Study Microbe–Microbe Interactions and Their Effects on Biofilm Formation and Gene Expression. *Host-Pathogen Interactions*. **1734**: 131–158.

Allan, V. J. M., Callow, M. E., Macaskie, L. E., & Paterson-Beedle, M. 2002. Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology*. **148**: 277–288.

Alonso, A. N., Perry, K. J., Regeimbal, J. M., Regan, P. M., & Higgins, D. E. 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* Determinants Required for Biofilm Formation. *PLoS ONE*. **9**: e113696.

Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hébraud, M., & Héchard, Y. 2004. Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. **150**: 1581–1590.

Assisi, C., Forauer, E., Oliver, H. F., & Etter, A. J. 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.

Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J., & van Oss, C. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **7**: 47–53.

Bencardino, D., Amagliani, G., & Brandi, G. 2021. Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: An ongoing challenge in public health. *Food Control*. **130**: 108362.

Benito, M.H., Hernández, R.S., Fernández-Reyes, M.J. & Hernando, S. 2008. Sepsis por *Hafnia alvei* en una paciente con trasplante renal. *Nefrología*. **28**: 470-471.

Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F. & Call, D.R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7336-7342.

Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. 2015. Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiology Letters*. **363**.

Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*. **45**: 167–178.

Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, S. J. 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology*. **22**: 84–91.

- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. **34**: 597–601.
- Cai, L., Wang, H., Liang, L., Wang, G., Xu, X., & Wang, H. 2018. Response of Formed-Biofilm of *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Citrobacter freundii* to Chlorite-Based Disinfectants. *Journal of Food Science*. **83**: 1326–1332.
- Carrizosa, E., Benito, M. J., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Villalobos, M. D. C., Martín, A., & Córdoba, M. D. G. 2017. Bacterial communities of fresh goat meat packaged in modified atmosphere. *Food Microbiology*. **65**: 57–63.
- Carvalhais, V., Delgado-Rastrollo, M., Melo, L. D., & Cerca, N. 2013. Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, **95**: 195–200.
- Chae, M. S., Schraft, H., Truelstrup Hansen, L., & Mackereth, R. 2006. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*. **23**: 250–259.
- Chang, Y., Gu, W., Fischer, N., & McLandsborough, L. 2012. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **93**: 2051–2062.
- Chen, P., Wang, J. J., Hong, B., Tan, L., Yan, J., Zhang, Z., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. 2019. Characterization of Mixed-Species Biofilm Formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*. **10**.
- Colagiorgi, A., di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. 2016. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms*. **4**: 22.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S. & Ianieri, A. 2017. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*. **6**: 41.
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y. & Midelet-Bourdin, G. 2013. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *J. Appl. Microbiol.* **114**: 1120-1131.
- da Silva, D. A. L., de Melo Tavares, R., Camargo, A. C., Yamatogi, R. S., de Martinis, E. C. P., & Nero, L. A. 2021. Biofilm growth by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and expression of biofilm-related genes under stressing conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **37**: 119.
- Daneshvar Alavi, H. E., & Truelstrup Hansen, L. 2013. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with

*Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling* **29**: 1253–1268.

Darwish, S. F., & Asfour, H. A. E. 2013. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*. 1-9.

Enfermedades de transmisión alimentaria. 2019. Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 26 de enero de 2022, de [https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_2](https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2).

Fagerlund, A., Langsrud, S., & Mørseth, T. 2021. Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. *Current Opinion in Food Science*. **37**: 171–178.

Fox, E. M., Solomon, K., Moore, J. E., Wall, P. G., & Fanning, S. 2014. Phylogenetic Profiles of In-House Microflora in Drains at a Food Production Facility: Comparison and Biocontrol Implications of *Listeria*-Positive and -Negative Bacterial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **80**: 3369–3374.

Flemming, H. C., Wingender, J., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., Rice, S.A., & Szewzyk, U. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. **14**: 563–575.

França, A., Bento, J. C., & 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.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 2461–2470.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*. **9**: 898.

Gandhi, M., & Chikindas, M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. **113**: 1–15.

Garmyn, D., Gal, L., Lemaître, J. P., Hartmann, A., & Piveteau, P. 2009. Communication and Autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*. *Communicative & Integrative Biology*. **2**: 371–374.

Gasanov, U., Hughes, D., & Hansbro, P. M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 851–875.

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kačaniová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **6**: 841.

Goodwine, J., Gil, J., Doiron, A., Valdes, J., Solis, M., Higa, A., Davis, S., & Sauer, K. 2019. Pyruvate-depleting conditions induce biofilm dispersion and enhance the efficacy of antibiotics in killing biofilms in vitro and in vivo. *Scientific Reports.* **9**: 1-16.

He, J., Kim, D., Zhou, X., Ahn, S. J., Burne, R. A., Richards, V. P., & Koo, H. 2017. RNA-Seq Reveals Enhanced Sugar Metabolism in *Streptococcus mutans* Co-cultured with *Candida albicans* within Mixed-Species Biofilms. *Frontiers in Microbiology.* **8**.

Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., & Langsrud, S. 2018. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology.* **275**: 46–55.

Ingham, S. C., Buege, D. R., Dropp, B. K., & Losinski, J. A. 2004. Survival of *Listeria monocytogenes* during Storage of Ready-to-Eat Meat Products Processed by Drying, Fermentation, and/or Smoking. *Journal of Food Protection.* **67**: 2698–2702.

Janissen, R., Murillo, D. M., Niza, B., Sahoo, P. K., Nobrega, M. M., Cesar, C. L., Temperini, M. L. A., Carvalho, H. F., de Souza, A. A., & Cotta, M. A. 2015. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports.* **5**.

Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., & Wiedmann, M. 2003. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  Regulates Stress Response and Virulence Functions. *Journal of Bacteriology* **185**: 5722–5734.

Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G. J., & Giaouris, E. 2012. Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* **78**: 2586–2595.

Lakicevic, B. Z., den Besten, H. M. W., & de Biase, D. 2022. Landscape of Stress Response and Virulence Genes Among *Listeria monocytogenes* Strains. *Frontiers in Microbiology.* **12**: 1-16.

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.

Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. 2014. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal.* **8**: 894–907.

- Lemon, K., Higgins, D. & Kolter, R. 2007. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*. **189**: 4418-4424.
- Listeriosis. 2018. Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 20 de agosto de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- Litrenta, J. & Oetgen, M. 2017. *Hafnia alvei*: A new pathogen in open fractures. *Trauma Case Reports*. **8**:41-45.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. **25**: 402-408.
- Lorenzo, J. M., Cachaldora, A., Fonseca, S., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. 2010. Production of biogenic amines “in vitro” in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages. *Meat Science* **86**: 684–691.
- 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**: 372–378.
- Madsen, J.S., Sørensen, S.J., and Burmølle, M. 2018. Bacterial social interactions and the emergence of community- intrinsic properties. *Curr Opin Microbiol*. **42**: 104–109.
- Magalhães, A. P., França, N., Pereira, M. O., & Cerca, N. 2019. RNA-based qPCR as a tool to quantify and to characterize dual-species biofilms. *Scientific Reports*. **9**.
- Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini, P., & Vay, C. 2001. Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **19**: 11–14.
- Melian, C., Bentencourt, E., Castellano, P., Ploper, D., Vignolo, G., & Mendoza, L. M. 2022. Biofilm genes expression of *Listeria monocytogenes* exposed to *Latilactobacillus curvatus* bacteriocins at 10 °C. *International Journal of Food Microbiology*. **370**: 109648.
- 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. *Frontiers in Microbiology*. **6**: 384.
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L. & Balsa-Canto, E. 2014. Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Int. J. Food Microbiol*. **182**: 26-36.
- Murray, P. R., Baron, J.H., Tenover, J.C., & Tenover, M.C. 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Nakamura, H., Takakura, K. I., Sone, Y., Itano, Y., & Nishikawa, Y. 2013. Biofilm Formation and Resistance to Benzalkonium Chloride in *Listeria monocytogenes* Isolated from a Fish Processing Plant. *Journal of Food Protection*. **76**: 1179–1186.

Nilsson, R.E., Ross, T. & Bowman, J.P. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **180**: 14-24.

Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista chilena de infectología*. **29**: 504–510.

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

Ouyang, Y., Li, J., Dong, Y., Blakely, L. V., & Cao, M. 2012. Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Biotech Research*. **4**: 13-25.

Oxaran, V., Dittmann, K. K., Lee, S. H. I., Chaul, L. T., Fernandes De Oliveira, C. A., Corassin, C. H., Alves, V. F., de Martinis, E. C. P., & Gram, L. 2018. Behavior of Foodborne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Mixed-Species Biofilms Exposed to Biocides. *Applied and Environmental Microbiology*. **84**: e02038-18.

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

Papaioannou, E., Giaouris, E. D., Berillis, P., & Boziaris, I. S. 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International Journal of Food Microbiology*. **267**: 9–19.

Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G. J., & Skandamis, P. N. 2016. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*. **237**: 164–171.

Rendueles, O., & Ghigo, J. M. 2012. Multispecies biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*. **36**: 972–989.

Renier, S., Hébraud, M., & 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.

- Riedel, C. U., Monk, I. R., Casey, P. G., Waidmann, M. S., Gahan, C. G. M., & Hill, C. 2009. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. **71**: 5.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. 2007. *agr* System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in Adherence and Differential Expression Pattern. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 6125–6133.
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., & Piveteau, P. 2008b. *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 4491–4497.
- Rieu, A., Lemaitre, J., Guzzo, J., & Piveteau, P. 2008a. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. **126**: 76–82.
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Mørretrø, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **116**: 372–383.
- Røder, H. L., Olsen, N. M. C., Whiteley, M., & Burmølle, M. 2020. Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. *Environmental Microbiology*. **22**: 5–16.
- Rodicio, M. D. R & Mendoza, M. D. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **22**: 239-245.
- Samonis, G., Karageorgopoulos, DE., Kofteridis, DP., Matthaiou, DK., Sidiropoulou, V., Maraki, S. & Falagas ME. 2009. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **28**: 61-8.
- Sela, S., Frank, S., Belausov, E., & Pinto, R. 2006. A Mutation in the *luxS* Gene Influences *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 5653–5658.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., & Azeredo, J. 2008. Adhesion to and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. *Journal of Food Protection*. **71**: 1379–1385.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., & Bassler, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*. **41**: 463–476.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*. **9**: 1236–1243.

Symptoms. 2014. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado el 28 de enero de 2022, de <https://www.cdc.gov/listeria/symptoms.html>

Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., & Kimura, B. 2010. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*. **50**: 618–625.

Tan, C. H., Lee, K. W. K., Burmølle, M., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. 2017. All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*. **19**: 42–53.

Tremblay, Y. D. N., Durand, B. A. R., Hamiot, A., Martin-Verstraete, I., Oberkamp, M., Monot, M., & Dupuy, B. 2021. Metabolic adaption to extracellular pyruvate triggers biofilm formation in *Clostridioides difficile*. *The ISME Journal*. **15**: 3623–3635.

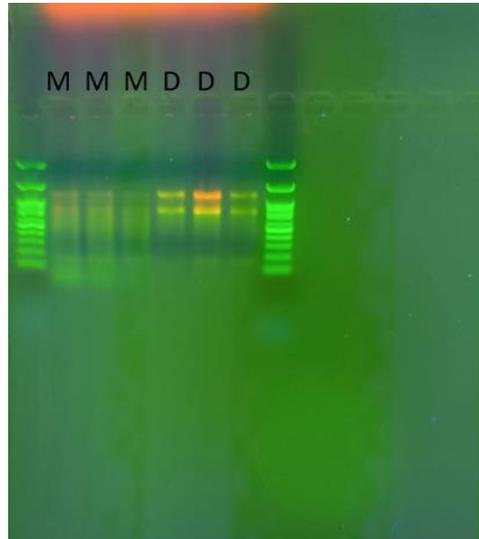
Vivas, J., Padilla, D., Real, F., Bravo, J., Grasso, V., & Acosta, F. 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Veterinary Microbiology*. **129**: 150–155.

Zhang, J., Cao, G., Xu, X., Allard, M., Li, P., Brown, E., Yang, X., Pan, H., & Meng, J. 2016. Evolution and Diversity of *Listeria monocytogenes* from Clinical and Food Samples in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, **7**.

Zhu, Y. L., Hou, H. M., Zhang, G. L., Wang, Y. F., & Hao, H. S. 2019. AHLs Regulate Biofilm Formation and Swimming Motility of *Hafnia alvei* H4. *Frontiers in Microbiology*. **10**.

Zilelidou, E. A., Milina, V., Paramithiotis, S., Zoumpopoulou, G., Poimenidou, S. V., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., & Skandamis, P. N. 2020. Differential Modulation of *Listeria monocytogenes* Fitness, *In Vitro* Virulence, and Transcription of Virulence-Associated Genes in Response to the Presence of Different Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **86**: 17.

## MATERIAL COMPLEMENTARIO



**Figura S1. Integridad del RNA extraído desde biopelículas mono especie y duales.** Se identifican seis muestras, las tres primeras correspondientes a réplicas de biopelículas de *L. monocytogenes* sola (M), y las tres últimas a réplicas de biopelículas duales (D) de *L. monocytogenes* más *Hafnia* sp. Cada carril fue cargado con 3  $\mu$ l de RNA por muestra; sin embargo, se observan bandas más intensas en las tres réplicas de biopelículas duales, por lo que es posible asumir que en esta conformación hay una mayor cantidad de RNA total.