



http://www.cdc.gov/listeria/

Formació de biofilms de *Listeria monocytogenes* en la indústria alimentària

INTRODUCCIÓ

Listeria monocytogenes és un bacteri gram positiu, patògen important transmès pels aliments que pot causar listeriosis amb altes taxes de mortalitat entre poblacions susceptibles [1]. És un bacteri ubic, que es troba àmpliament distribuït en l'ambient, pot formar biofilm en una gran varietat de superfícies i pot créixer en una àmplia varietat d'aliments, incloent aliments emmagatzemats a la nevera, mínimament processats o preparats pel consum. Gràcies a la formació del biofilm és capaç de sobreviure a condicions desfavorables incloent alta concentració de sal i desinfectants [2].

El genoma de *L. monocytogenes* codifica per σ^B , un factor de transcripció que té un paper important en la supervivència durant el processament d'aliments i emmagatzematge i en la formació del biofilm sota condicions d'estrès [2].

Objectius: Conèixer el factor de transcripció σ^B implicat en la formació del biofilm i noves substàncies inhibidores en la indústria alimentària degut a les resistències que hi ha actualment

RESULTATS

Factor de transcripció σ^B

1998

Contribució de σ^B a la resposta adaptativa [3]

- ✓ Activitat de σ^B com a resposta a l'estrès osmòtic, baixa T°C i presència de EDTA en el medi
 - Resposta de σ^B augmenta després d'un canvi en la osmosi
- ✓ Anàlisis genètics i fisiològics demostren que σ^B facilita el creixement sota condicions d'alta osmolaritat

L. monocytogenes i mutant de σ^B crescuts en medi DM suplementat amb 0,4% glucosa en presència i absència de 0,5M NaCl

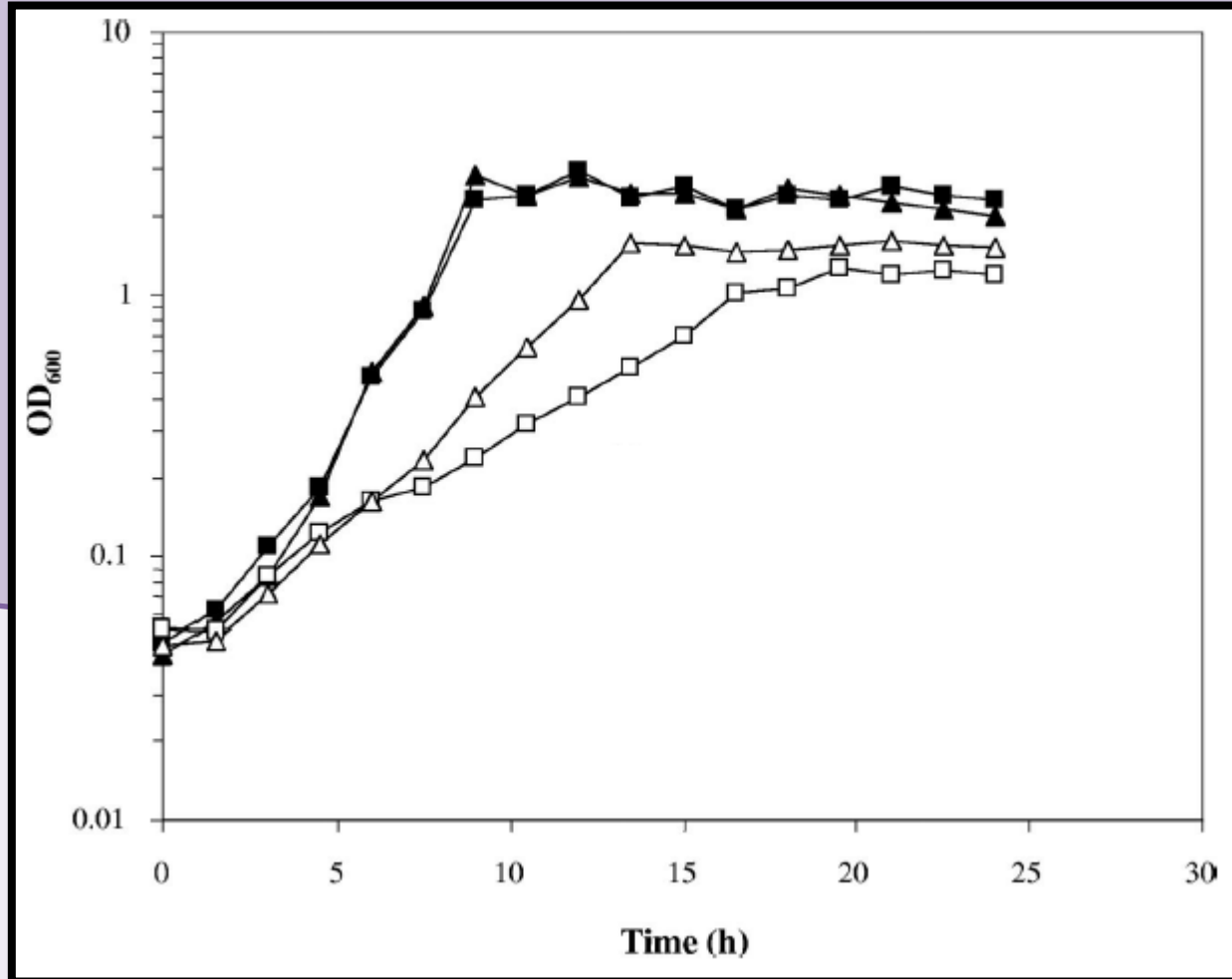


Fig.1. Creixement de *L. monocytogenes* i mutant de σ^B en medi DM suplementat amb 0,4% glucosa en presència i absència de 0,5M NaCl [4]

- ✓ Sense NaCl: Les dos soques tenen patrons de creixement molt similars
- ✓ En presència de NaCl: Les dos soques creixen més lentament

Inesperadament, el mutant de σ^B creix de manera més ràpida que la soca salvatge

Impacte de la delecció de σ^B en el proteoma de *L. monocytogenes* [4]

2008

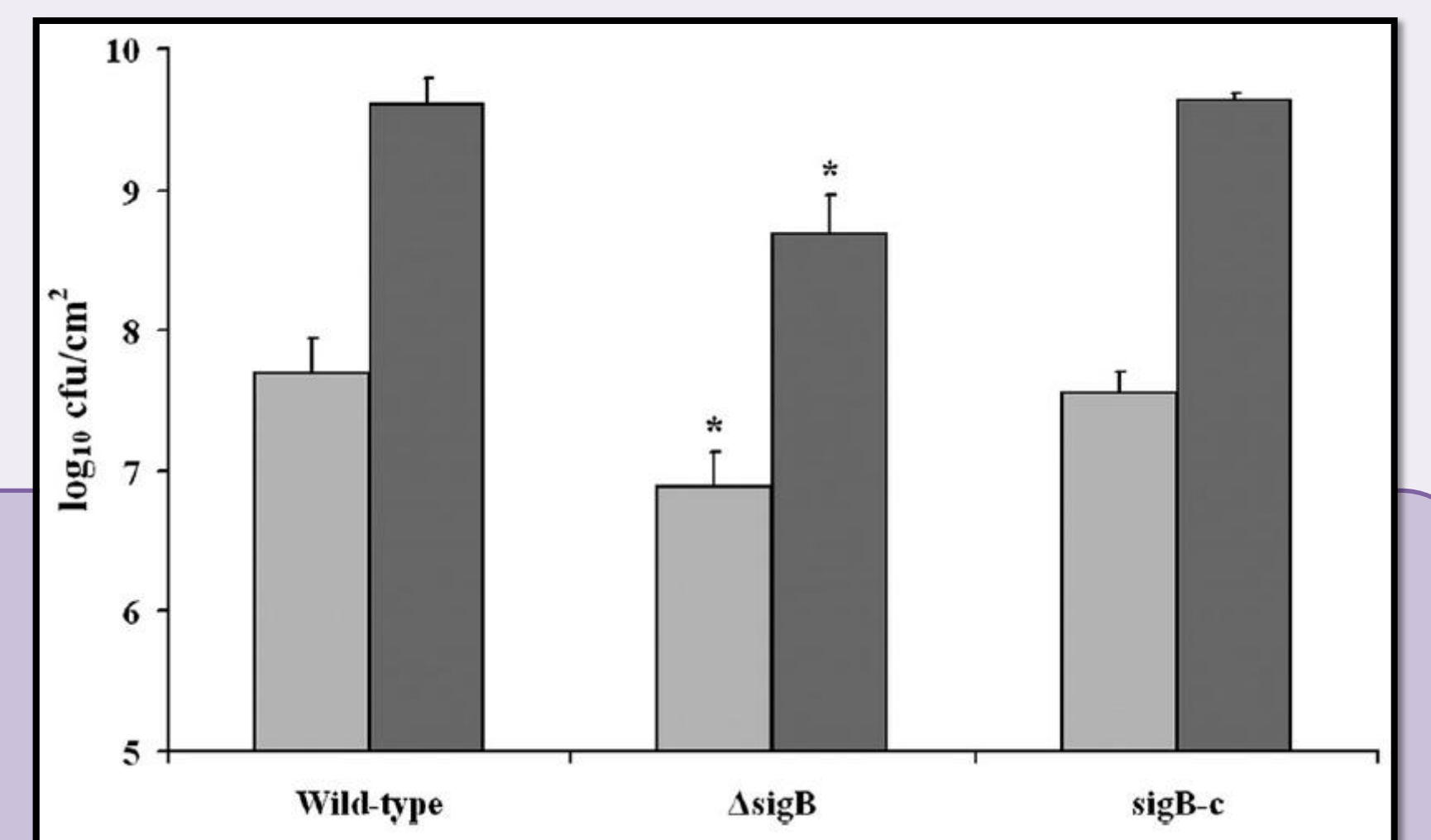


Fig.2. Comparació de la formació de biofilm en cultiu estàtic (gris) i en flux continu (negre) amb la soca salvatge, el mutant *sigB* i el mutant complementat (*sigB-c*) [5]

2010

Paper funcional de σ^B en la formació de biofilm en cultiu estàtic i en flux continu i la funció en la resistència als desinfectants [5]

- ✓ Deficiència de la formació de biofilm en el mutant σ^B tant en cultiu estàtic (gris) com flux continu (negre) que desapareix quan és complementat amb σ^B (*sigB-c*)
- ✓ σ^B s'activa específicament quan el biofilm està exposat a desinfectants

- Activitat de σ^B determinada per qRT-PCR → Nivells de transcripció de *ilnA* i *gadD3*
- ✓ Gens dependents de σ^B induïts després de la exposició a l'estrès salí
- ✓ No diferències entre soques persistents i no persistents respecte els nivells de transcripció

Determinació de la relació entre l'expressió dels gens de σ^B i la capacitat que té *L. monocytogenes* per persistir en entorns de processament d'aliments sota condicions d'estrès salí [6]

2012

2014

Contribució de σ^B en la formació del biofilm quan *L. monocytogenes* creix sota varies temperatures i diferents medis [2]

- Soca salvatge i mutant per σ^B en medi BHI → Sense NaCl, amb 6 i 9% de NaCl a 24°C durant 24, 48 i 72h
 - BHI i BHI-6%NaCl → Nombre de cèl·lules viables similars en soca salvatge i mutant en els tres temps
 - BHI-9% NaCl → Disminució nombre de cèl·lules viables en els tres temps
- També es fa créixer a 15°C durant 72h:
 - BHI-6% NaCl → Soca salvatge 4 vegades més biofilm que soca mutant
 - BHI-9% NaCl → Les dos soques defectives per formar biofilm

Substàncies inhibidores del biofilm

Esfingosina i palmitoil-DL-carnitina [7]

Estudi de 80 inhibidors de proteïnes kinasa eucariotes en el desenvolupament del biofilm

- 5 inhibidors del creixement planctònic
- 15 inhibidors de la formació de biofilm
- 3 estimulen la formació de biofilm

Esfingosina
Palmitoil-DL-carnitina

Grups polars i cadenes d'àcids grassos saturats de 16 C

Àcids grassos saturats [7]

Assaig amb àcids grassos saturats amb cadena de 9 a 18 carbonis

- ✓ Àcids grassos de cadenes curtes (C9 i 10) → Poc efectives per inhibir la formació del biofilm
- ✓ Àcids grassos de cadenes mitjanes (C12, 13 i 14) → Més efectives per inhibir la formació del biofilm
- ✓ Àcids grassos de cadenes llargues (C16, 17 i 18) → Estimulen la formació del biofilm

DNasa I i Proteïna K [8]

DNasa I

En presència de DNasa I (Rang de concentració 6,3 -200 µg/ml)
Concentració més baixa → Biofilm 60-70% menys que el control
Increment de concentració → No més reducció del biofilm

Proteïna K

En presència de Proteïna K (Rang de concentració 6,3 -200 µg/ml)
➢ Inhibició completa del biofilm
0,2 µg/ml → Biofilm 60% menys que el control
> 8 µg/ml → No biofilm

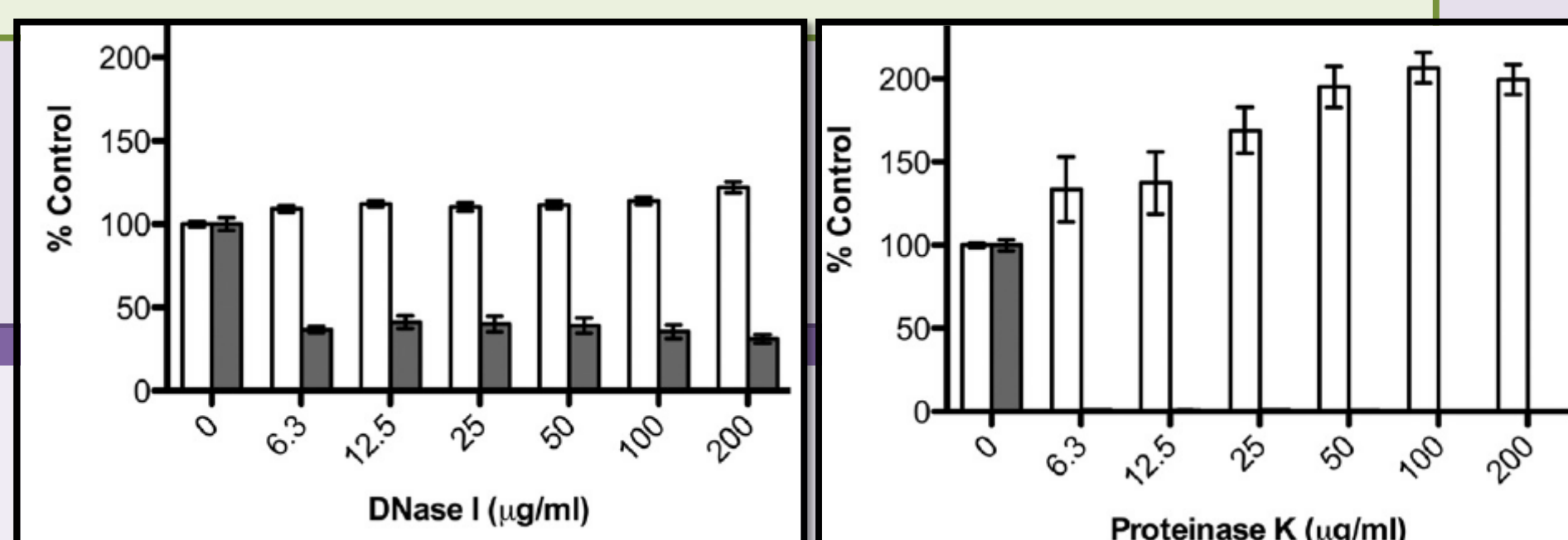


Fig.3. Inhibició de la formació de biofilm de *L. monocytogenes* en poliestirè per DNasa I i Proteïna K. Creixement planctònic als 3 dies (barres blanques) i formació de biofilm (barres negres) expressats com un percentatge del control [8]

CONCLUSIONS

- El factor σ^B és molt important en la formació del biofilm
- El factor σ^B i dels seus gens dependents s'activen com a resposta a l'estrès osmòtic i faciliten el creixement sota aquestes condicions. També s'activen específicament quan el biofilm està sotmès a desinfectants
- Molècules efectives com a inhibidors del desenvolupament del biofilm són: Esfingosina, palmitoil-DL-carnitina, àcids grassos saturats de cadena mitja (C12, 13 i 14) i proteïna K.
- Molècules que també redueixen la formació del biofilm són: DNasa I, àcid oleanòlic, àcid ursòlic i EDTA (EDTA a baixes concentracions també inhibeix la interacció entre cèl·lules i cèl·lules - superfície)
- S'han de buscar noves substàncies per complementar-les amb els mètodes actuals de desinfecció

Àcid oleanòlic i àcid ursòlic [9]

Sintetitzats en plantes medicinals. Tenen acció antibacteriana.

Es van afegir a MBIC de 0,125, 0,25 i 0,5. Es va observar:

- Disminució del biofilm:

- 15% en presència de 0,25 MBIC
- >60% en presència de 0,5 MBIC

-Disminució de la viabilitat cel·lular:

- 14% (OA) i 22% (UA) en presència de 0,125 MBIC
- 42% (OA) i 56% (UA) en presència de 0,5 MBIC

EDTA [10]

Agent quelant sintètic

Estudi de la capacitat de formar biofilm de 8 soques de *L. monocytogenes* en medi MWB en absència i presència de EDTA (0,1 mM)

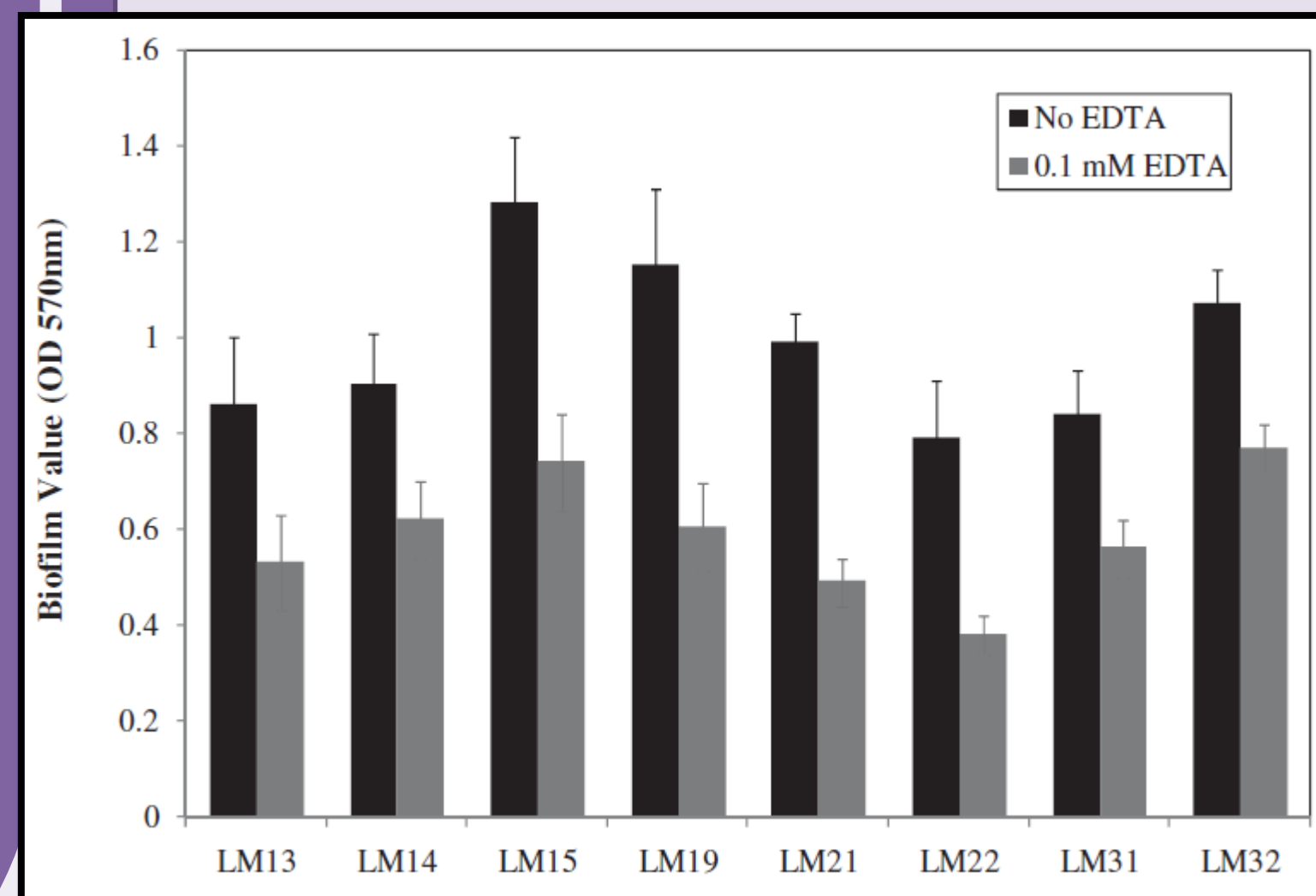


Fig.4. Efecte inhibitori del EDTA contra la formació de biofilm en 8 soques representatives de *L. monocytogenes* [10]

✓ Presència EDTA: Disminueix la formació de biofilm de totes les soques

✓ A 0,3 mM EDTA inhibició més alta
→ Reducció del 58,6%

✓ EDTA en temps inicial major inhibició

Interacció cèl·lules – superfície

- Número de cèl·lules adherides menor

Interacció entre cèl·lules

- Forma suspensions tèrbols de cèl·lules

[1] Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., and Teixeira, P. 2013. Biofilm Formation among Clinical and Food Isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*, 123, 142–150. [2] Lee, J.J., Lee, G. and Shin, J.-H. 2014. σ^B Affects Biofilm Formation under the Dual Stress Conditions Imposed by Adding Salt and Low Temperature in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology*, 52, 849-855. [3] Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W. and Benson, A.K. 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J.Bacteriol.* 180, 4547-4554. [4] Abram, F., Starr, E., Karatzas, K.A., Matlowska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K. J., Connolly, D. and O'Byrne, C.P. 2008. Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6848-6858. [5] Van der Veen, S. and Abee, T. 2010. Importance of σ^B for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7854-7860. [6] Ringus, D.L., Ivy, R.A., Wiedmann, M. and Boor, K.J. 2012. Salt stress-induced transcription of σ^B - and CtsR-regulated genes in persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains from food processing plants. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 198-206. [7] Nguyen, U.T., Wenderska, I.B., Chong, M.A., Koteva, K., Wright, G.D., Burrows, L.L. 2012. Small-Molecule Modulators of *Listeria monocytogenes* Biofilm Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1454-1465. [8] Nguyen U.T., Burrows, L.L. 2014. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 26-32. [9] Kurek, A., Markowska, K., Grudniak, A., Janiszowska, W., Wojska, K. 2013. The effect of oleanolic and ursolic acids on the hemolytic properties and biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Polish Journal of Microbiology*, 63, 21-25. [10] Chang, Y., Gu, W., and McLandsborough L. 2012. Low concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. *Food Microbiol.* 29, 10–17.