



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y**  
**DE LA SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE**  
**BIOPELICULA POR *Actinobacillus seminis*.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**JUAN FERNANDO MONTES GARCÍA**

**Tutor: ERASMO NEGRETE ABASCAL (FES- IZTACALA)**

**COMITÉ TUTOR**

**EDGAR ZENTENO GALINDO (FAC. MEDICINA)**

**JOSÉ ÁNGEL GUADALUPE GUTIÉRREZ PABELLO (FMVZ)**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México abril 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Dedicatorias

Dedico este trabajo a los Montes, mi familia paterna y a los García, mi familia materna. Ya que soy el primero en alcanzar este grado académico en ambas familias. Espero en un futuro no olvidar nuestros orígenes humildes y que las futuras generaciones recuerden bien: “origen no es destino”

A mis padres por su profunda paciencia, su apoyo emocional, su constante apoyo moral y su infinita Fé en mis capacidades.

A mis hermanos Norma y Jorge ¡¡¡ si se puede!!!

**Carpe diem**

## **Agradecimientos**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética en la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México con el financiamiento de DGAPA-UNAM PAPIIT IN219919 y IN204122 y con una beca otorgada por el CONACYT (283503).

## RESUMEN

*Actinobacillus seminis* es una bacteria Gram negativa autóctona que afecta a los órganos reproductivos, causando epididimitis, baja fertilidad y abortos ocasionales en ovinos y caprinos. Los factores de virulencia y los mecanismos de patogenicidad de *A. seminis* aún no se han dilucidado claramente. En este trabajo se describe y caracteriza la producción de biopelículas por *A. seminis* en ensayos *in vitro*. Después de 48 h de incubación a 37 °C en caldo de soya y tripticaseína, *A. seminis* formó biopelículas que contenían una matriz extracelular compuesta principalmente de material fibrilar. La microaerofilia o la presencia de calcio disminuyeron la formación de biopelículas en aproximadamente un 50% y un 70%, respectivamente, pero las bajas concentraciones de hierro la incrementaron en un 40%. A través de digestión enzimática de los componentes de la biopelícula, se encontró que las proteínas eran el componente principal de estas. Las observaciones estructurales mediante microscopía electrónica de barrido indicaron la presencia de una gran cantidad de material fibrilar en el que se encontraban inmersas las bacterias. Los anticuerpos contra diferentes proteínas de la superficie bacteriana, como a los componentes de matriz de biopelícula y anti-sueros que reconocen proteínas de la matriz de la biopelícula o diferentes adhesinas disminuyeron la formación de biopelícula en un 70 % y un 25 %, respectivamente; mientras que furanona C-30 y LED-209, compuestos descritos como inhibidores de quórum sensing, inhibieron completamente la formación de biopelículas. En conclusión, las condiciones ambientales pueden influir fuertemente en la formación de biopelículas en *A. seminis* y esto podría ser una estrategia ventajosa que permite que las bacterias persistan dentro de un hospedero.

Palabras clave: *A. seminis*; biopelícula; exopolímeros; quórum sensing; virulencia

## Abstract

*Actinobacillus seminis* is an autochthonous gram-negative bacterium that affects reproductive organs, causing epididymitis, low fertility, and occasional abortions in ovine and goats. The virulence factors and the pathogenicity mechanisms of *A. seminis* have not been clearly elucidated yet. In this work, biofilm production by *A. seminis* in in vitro assays is described and characterized. After 48-h incubation at 37 °C in trypticase soy broth, *A. seminis* formed biofilms containing an extracellular matrix comprised mainly of fibrillar material. Microaerophilia or the presence of calcium diminished biofilm formation in approximately 50% and 70%, respectively, but low iron concentrations increased it 40%. Through enzymatic digestion, it was found that proteins were the main component of these biofilms. Structural observations through scanning electron microscopy indicated the presence of a high amount of fibrillar material in which bacteria were immersed. Antibodies against different bacterial surface proteins, such as anti-biofilm matrix and anti-adhesin, diminished biofilm formation in 70% and 25%, respectively; whereas furanone C-30 and LED-209, compounds described as quorum-sensing inhibitors, completely inhibited biofilm formation. In conclusion, environmental conditions can strongly influence biofilm formation in *A. seminis*, and this could be an advantageous strategy that allows bacteria to persist inside a host.

Keywords: *A. seminis*; biofilm; exopolymers; quorum sensing; virulence.

## Índice

Lista de cuadros y figuras .....	08
<b>1.- Introducción</b>	
1.1.- Familia <i>Pasteurellaceae</i> .....	10
1.2.- Género <i>Actinobacillus</i> .....	11
1.3.- <i>Actinobacillus seminis</i> .....	14
1.4.- Factores de virulencia de <i>A. seminis</i> .....	15
1.5.- Patología causada por <i>A. seminis</i> .....	16
1.6.- La biopelícula bacteriana .....	18
1.6.1 Formación de biopelícula .....	20
1.6.2 Composición de la biopelícula .....	22
1.6.3 Estructura de la biopelícula .....	25
1.6.4 Regulación de la formación de la biopelícula .....	27
1.6.5 Virulencia asociada a la biopelícula .....	32
<b>2.- Antecedentes</b> .....	35
<b>3.- Justificación</b> .....	37
<b>4.- Hipótesis</b> .....	37
<b>5.- Objetivos</b> .....	37
<b>6.- Materiales y métodos</b> .....	38

<b>7.- Resultados .....</b>	<b>45</b>
<b>8.- Discusión .....</b>	<b>59</b>
<b>9.- Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
<b>10.- Perspectivas.....</b>	<b>70</b>
<b>11.- Referencias .....</b>	<b>71</b>

## Lista de cuadros y figuras

Figura 1.- Árbol filogenético de la familia *Pasteurellaceae*

Figura 2.- Árbol filogenético del género *Actinobacillus*

Figura 3.- Imágenes de microscopía electrónica de *A. seminis*

Figura 4.- Cabra con epididimitis

Figura 5.- Disección de testículos ovinos con signos de epididimitis

Figura 6.- Biopelícula de *Streptococcus mutans*.

Figura 7.- Pasos de la formación de una biopelícula microbiana

Figura 8.- Esquema de los componentes de la matriz exopolimérica de una biopelícula

Figura 9.- Estructuras variadas de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*

Figura 10.- Heterogeneidad en biopelículas de *Bacillus subtilis*.

Figura 11.- Detección de Quorum-sensing (QS) en la formación de la biopelícula

Figura 12.- Formación de biopelícula por *A. seminis*

Figura 13.- Formación de biopelícula por *A. seminis* a lo largo de 72h de incubación.

Figura 14.- Biopelícula de *A. seminis* formada en caja Petri

Figura 15.- Efecto de las condiciones de estrés micro ambiental sobre la formación de biopelícula de *A. seminis*.

Figura 16.- Imágenes de microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada por *A. seminis* cepa ATCC 15768.

Figura 17.- Tinción de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos de la biopelícula formada sobre cubreobjetos por *A. seminis* ATCC 15768.

Figura 18.- Degradación enzimática de los componentes de la biopelícula de *A. seminis*.

Figura 19.- Cuantificación de los componentes bioquímicos de la biopelícula de *A. seminis*

Figura 20.- Efecto de anti-sueros sobre la formación de biopelícula de *A. seminis*.

Figura 21.- Inhibición de la formación de biopelícula por LED-209 Y Furanona C-30

Figura 22.- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la formación de biopelícula de *A. seminis*.

Figura 23.- Aspecto de la biomasa de la biopelícula de *A. seminis*.

Figura 24.- Patrones de proteínas de la biopelícula y del cultivo platónico de *A. seminis* en geles SDS-PAGE 10%.

Figura 25.- inmunorreconocimiento de las fracciones proteicas de la biopelícula de *A. seminis*.

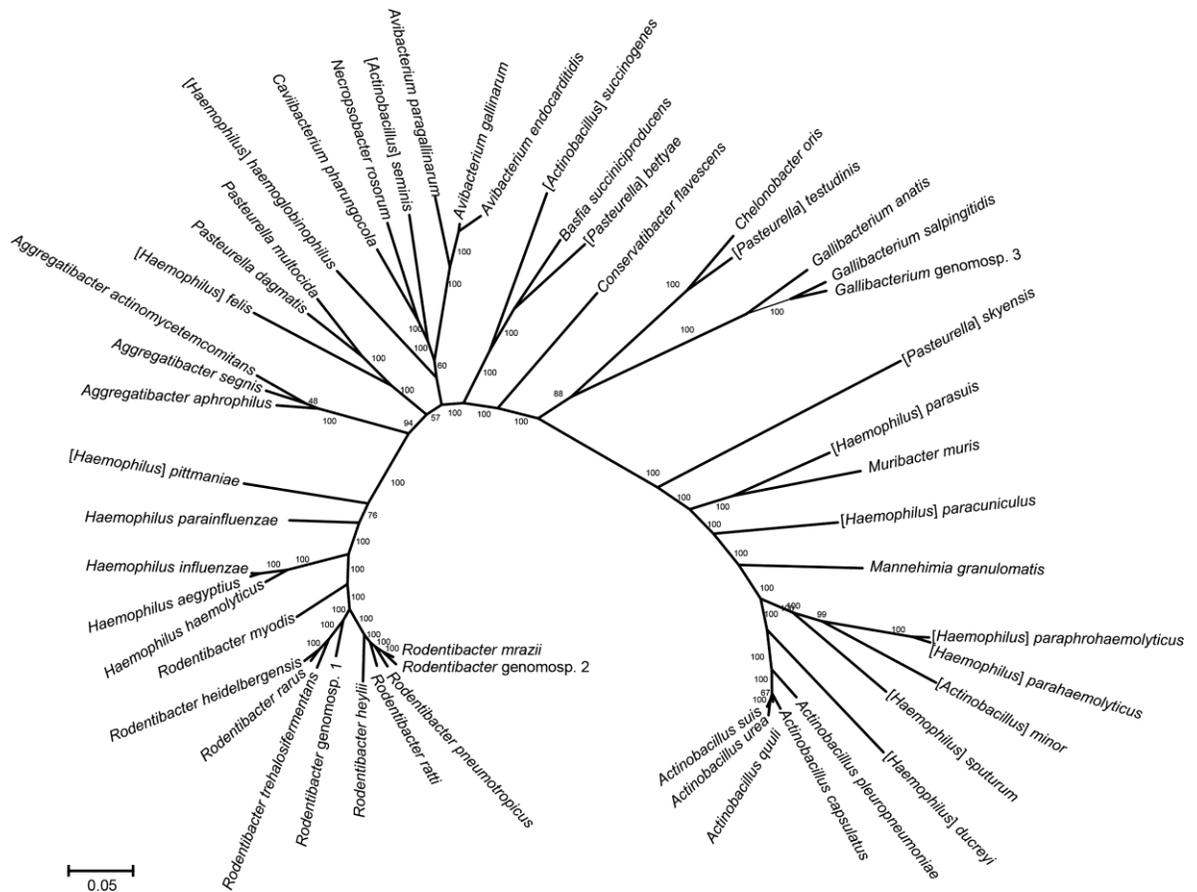
# INTRODUCCION

## 1.1.- Familia *Pasteurellaceae*

La familia de bacterias *Pasteurellaceae* (Pohl 1979) incluye patógenos oportunistas y primarios asociados principalmente con animales de sangre caliente, incluidos los humanos (Christensen et al., 2014; Murmullos et al., 1989). Originalmente, la clasificación de la familia incluía tres géneros: *Pasteurella*, *Haemophilus* y *Actinobacillus*. El trabajo taxonómico adicional, que involucra principalmente la caracterización fenotípica y la clasificación molecular basada en la hibridación ADN-ADN y el análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA, ha dado como resultado numerosos géneros nuevos, así como la reclasificación de algunos de los miembros originales de *Pasteurella*, *Haemophilus* y *Actinobacillus* resultando en un total de 28 géneros (Christensen et al., 2014 a, b; Adhikary et al., 2018; Nicklas et al., 2015).

La clasificación a nivel de género se ha basado principalmente en el análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA. Recientemente se informó que este enfoque implica ciertas limitaciones y, en cambio, se sugirió el análisis filogenómico mediante la inferencia de árboles filogenéticos (árboles filogenómicos) sobre la base de múltiples genes conservados para proporcionar un mejor marco taxonómico, especialmente en el género y niveles superiores (Chun et al., 2018).

Desde un punto de vista taxonómico, el enfoque para seleccionar miembros de la familia *Pasteurellaceae*, para la secuenciación genómica completa, a menudo se basaba en un interés clínico o en organismos modelo, descuidando el uso de cepas tipo. Sin embargo, a la fecha existe una serie de genomas completos de cepas tipo disponibles en las bases de datos públicas, esto ha permitido esclarecer la relación filogenética por medio de comparaciones de secuencias de 31 proteínas conservadas, presentes en 52 tipos de cepas de especies disponibles. Utilizando esta información, se ha establecido la similitud dentro y entre 14 géneros de esta familia (Figura 1) (Christensen and Bisgaard, 2018).



**Figura 1. Árbol filogenético de la familia *Pasteurellaceae*:** Relaciones filogenéticas basadas en análisis de máxima verosimilitud entre cepas tipo de especies de la familia *Pasteurellaceae* basadas en la comparación de 31 secuencias de proteínas predichas concatenadas y conservadas, obtenidas de secuencias genómicas completas. Los soportes para grupos monofiléticos por análisis bootstrap se indican como números de 100. La barra de escala representa la variación de la secuencia considerando los modelos para la sustitución de aminoácidos (Dayhoff) (Christensen and Bisgaard ,2018).

## 1.2.- Género *Actinobacillus*

El género *Actinobacillus* consta de 17 especies. La taxonomía de la familia *Pasteurellaceae* es compleja, ya que los estudios moleculares han demostrado que las especies que pertenecen a varios géneros, incluidos *Actinobacillus*, *Haemophilus* y *Pasteurella*, están entremezcladas filogenéticamente (Christensen and Bisgaard, 2018). Al igual que la familia *Pasteurellaceae*, la taxonomía del género *Actinobacillus* en sí es compleja e inconsistente. Solo nueve de las 17 especies actualmente reconocidas forman un grupo taxonómico monofilético y se asignan a *Actinobacillus sensu stricto* (Christensen et al., 2014; Bisgaard et al., 2012), las especies restantes, están a la espera de su reclasificación

probablemente como parte de otros, o nuevos géneros, dentro de la familia *Pasteurellaceae*.

*Actinobacillus sensu stricto* incluye la especie tipo: *Actinobacillus lignieresii*, así como *A. equuli*, *A. suis*, *A. pleuropneumoniae*, *A. hominis*, *A. ureae*, *A. arthritidis*, *A. anseriformium* y *A. capsulatus* (Figura 2) (Bisgaard et al., 2012).

Las ocho especies restantes: *A. seminis*, *A. rossii*, *A. indolicus*, *A. delphinicola*, *A. scotiae*, *A. succinogenes*, *A. minor* y *A. porcinus* podrían ser reclasificadas en nuevos géneros o dentro de los géneros existentes de la familia *Pasteurellaceae*. Algunos miembros anteriores del género, como *A. muris* y *A. actinomycetemcomitans*, se han reclasificado dentro de nuevos géneros como *Muribacter muris* (Nicklas W et al., 2015) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Nørskov-Lauritsen et al., 2006), respectivamente.

Las especies de *Actinobacillus* infectan a una variedad de animales, aunque solo *A. pleuropneumoniae* generalmente se considera un patógeno primario (Christensen et al., 2014). Los huéspedes incluyen ovejas, cerdos, caballos, vacas, liebres y aves, algunas de las cuales pueden actuar como reservorio de infecciones humanas oportunistas (Graevenitz et al., 2007).

Una de las más recientes reclasificaciones de *Actinobacillus* fue el caso de *Actinobacillus vicugnae* sp. nov., que anteriormente se pensaba como una nueva especie, sin embargo, estudios de filogenia, revelaron que pertenece al grupo de *Actinobacillus sensu stricto*, cabe mencionar que esta especie fue aislada de alpacas (*Vicugna pacos*) que están distribuidas en todo el Reino Unido (Hunt et al., 2013).

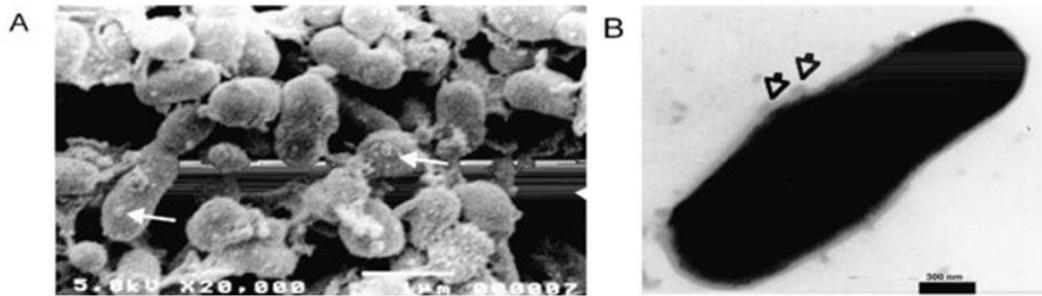


### 1.3.- *Actinobacillus seminis*

*A. seminis* se reportó como una especie nueva por primera vez en 1960, en Australia, después de confirmar que este agente biológico es causante de la epididimitis en caprinos libres de *Brucella ovis*, que hasta entonces era el agente principal asociado a esta patología. Estos estudios se realizaron con muestras de líquido seminal de caprinos con signos de epididimitis infecciosa. (Baynes and Simmons, 1960).

Desde entonces se han reportado aislamientos en todos los continentes y principalmente en zonas productoras de ganado caprino como son: Estados Unidos de América (1964), Sudáfrica (1977), Nueva Zelanda (1977), Hungría (1987), Argentina (1990), Reino Unido (1991), Turquía (1991), Kenia (1996), México (1999), España (2000) y Brasil (Al-Katib & Dennis, 2009; Dos Santos et al., 2009).

*A. seminis* es una bacteria Gram negativa que se ha descrito como un bacilo pleomórfico, de 1 x 1-4 micras, inmóvil y no forma endoesporas (Figura 3). Las condiciones de crecimiento son: una atmósfera de 10 % de CO<sub>2</sub>, e incubación a 37°C, en medio infusión cerebro corazón o soya y tripticaseína; no crece en MacConkey, además de que su crecimiento, se ve favorecido con la adición, al medio de cultivo, de sangre de carnero o suero bovino descomplementado. Después de 24 h se observan las colonias del tamaño de una cabeza de alfiler, a las 48 h alcanzan un diámetro de 1 a 2 mm, poseen color gris blanquecino, convexas, redondeadas con márgenes enteros, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm y muestran estriaciones radiales. Las características bioquímicas de *A. seminis* incluyen presentar reacciones de catalasa positiva, oxidasa negativa, nitrato negativo, indol negativo y presentar pobre fermentación de la glucosa. En estudios de microscopía electrónica no se observan esporas, cápsulas, ni pili en las cepas evaluadas (Acosta Dibarrat, 2001). *A. seminis* se ha reportado como sensible a penicilina, estreptomina, cloranfenicol, aureomicina, tetraciclinas, eritromicina, sulfonamidas y novobiocina, pero resistente a bacitracina y parcialmente resistente a neomicina (Baynes y Simmons 1960; Erasmus et al., 1982). Patrones de susceptibilidad o resistencia, más recientes, son desconocidos.



**Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de *A. seminis*:** (A) microscopía electrónica de barrido y (B) microscopía electrónica de transmisión después de la tinción con ácido fosfotúngstico (Nuñez del Arco et al., 2006).

#### 1.4.- Factores de virulencia de *A. seminis*

La patogénesis de *A. seminis* es incierta; se sugiere que asciende desde la cavidad prepucial donde se sabe que es parte de la microbiota autóctona y coloniza el tracto genital, causando los signos clínicos en el epidídimo (Acosta et al., 2006). Respecto a su patogénesis y a los factores de virulencia de *A. seminis*, a nivel mundial existe poca información, hasta el momento se ha descrito su capacidad de adherirse a células epiteliales de bovino y su inhibición por suero policlonal contra *A. seminis* (Healey et al., 1991); Se han descrito que las proteínas Fosfoglicerato mutasa y el factor de elongación-Tu tienen función de adhesinas (Montes-García et al., 2018). Se ha caracterizado el potencial inmunogénico de una proteína similar a la proteína tomB de *Yersinia pestis*, asociada a la captación de hierro y unión a transferrina (Soto-Ramírez, 2006). Se ha demostrado que cuenta con una proteína homóloga a GroEL que funciona como hemaglutinina y también interactúa con fibrinógeno y fibronectina (Montes-García et al., 2019). Recientemente se reportó el primer genoma de *A. seminis*, encontrando que cuenta con varios factores asociados a virulencia (Negrete-Abascal et al., 2018). También se sugiere la producción de una toxina tipo RTX, por inmuno reconocimiento cruzado con suero contra ApxI (Schaller et al., 2000); la capacidad de secretar micro vesículas conteniendo proteínas inmunogénicas en ellas (Núñez-del Arco et al., 2006), así como la identificación de actividad proteolítica en fracciones de proteínas secretadas (Jiménez-Pacheco et al., 2008). Más ampliamente se ha descrito y caracterizado una metaloproteasa secretada por *A. seminis*, la cual es capaz de degradar IgG y fibrinógeno de bovino (Cruz Montoya, 2015). Se ha realizado la purificación de dos proteasas secretadas de 150 kDa y 50 kDa, ambas reconocidas por antisueros dirigidos contra proteasas de *A. pleuropneumoniae* (Jiménez Suárez, 2022).

## 1.5.- Patología causada por *A. seminis*

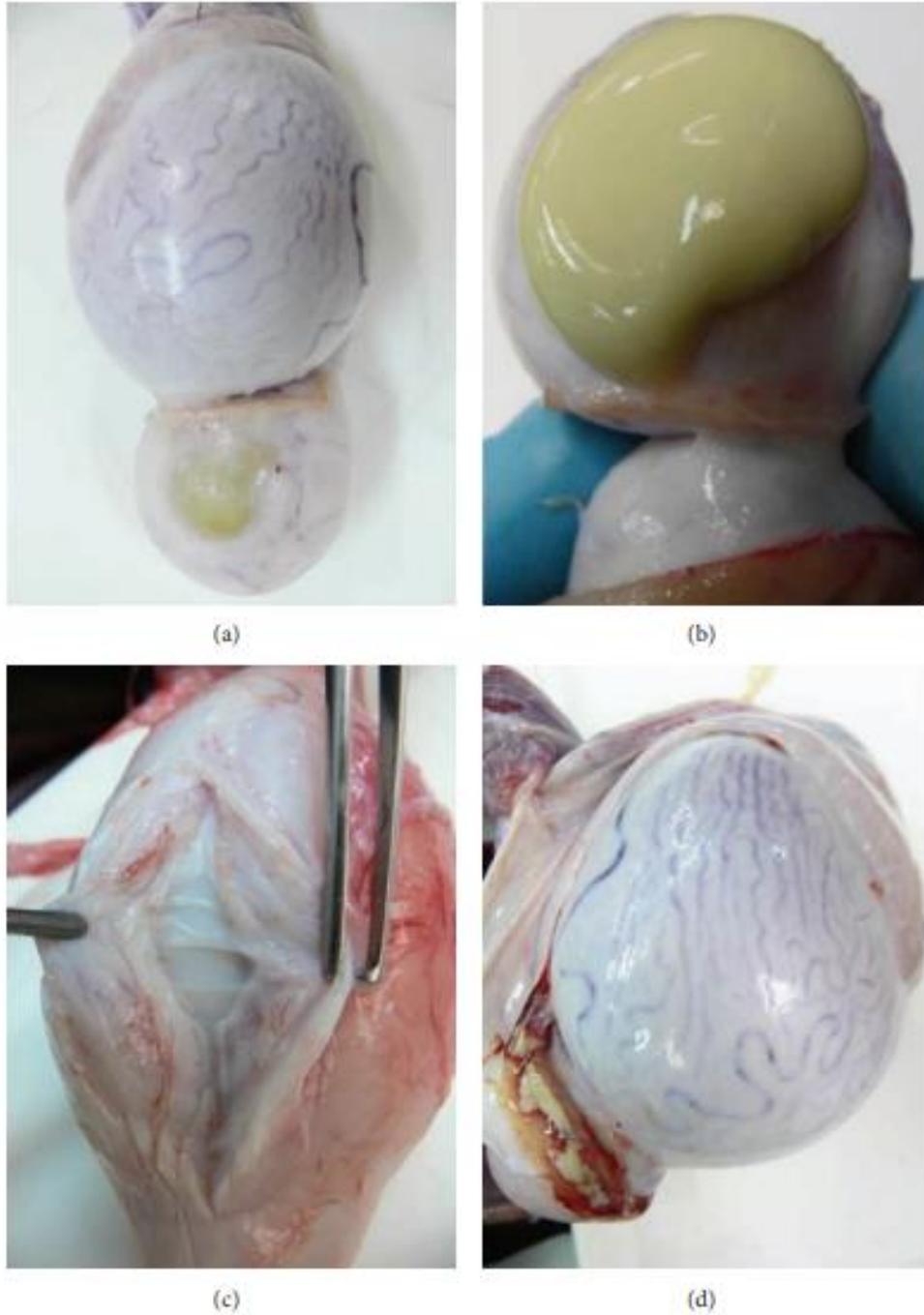
La inflamación del epidídimo es muy común. Independientemente de la causa, el daño al conducto del epidídimo da como resultado un efecto negativo a los espermatozoides y otros contenidos luminales, granulomas espermáticos y el desarrollo subsiguiente de epididimitis crónica. La excepción son los animales prepúberes en los que no hay espermatozoides; en estos casos, se producen verdaderos abscesos. La epididimitis en ausencia de granulomas espermáticos es posible en adultos, pero por lo general es un evento subclínico o temprano (Figura 4).



Figura 4.- Caprino con epididimitis: Macho cabrío reproductor Moxotó de cuatro años con cuadro clínico de orquitis unilateral y epididimitis (Dos santos et al 2014).

La epididimitis suele ser infecciosa, y la enfermedad infecciosa con frecuencia causa un espectro de lesiones, incluida la inflamación de las glándulas genitales accesorias. Los efectos de la epididimitis suelen ser más dramáticos que los de la prostatitis, la adenitis vesicular o la ampulitis, y a menudo se pasan por alto. La epididimitis con granulomas espermáticos ocurre en trastornos ductales congénitos del desarrollo sexual, adenomiosis, traumatismos y reflujo de orina (Elderbrook et al., 2019).

Las bacterias causan la mayoría de las infecciones del epidídimo. Aunque muchos virus se replican en el epidídimo, rara vez inducen epididimitis. Cualquier agente que cause orquitis es capaz de inducir epididimitis (Gkentzis et al., 2014).



**Figura 5.- Disección de testículos ovinos con signos de epididimitis:** Hallazgos generales en carneros experimentalmente infectados con *A. seminis*. ((a) y (b)) Absceso epididimario. (a) Cola

de testículo izquierdo donde se aprecia el epidídimo aumentado con un área focal amarillenta y (b) lleno de líquido viscoso amarillento (exudado purulento). (c) La atrofia testicular es asociada con fibrosis difusa de la túnica vaginal. El testículo izquierdo está disminuido de volumen y la túnica vaginal está engrosada y firmemente adherida al testículo. (d) Epididimitis purulenta severa. La cola del epidídimo izquierdo está rodeada de exudado purulento y hemorragia (Moustacas et al., 2014).

La epididimitis infecciosa es más común e importante en los carneros. Ocurre de dos formas principales en carneros: por vía hematógena, por *Brucella ovis*, y por infección ascendente con bacterias como *A. seminis*, *Histophilus somni* y *Escherichia coli*. Independientemente del microbio causante, la lesión es similar y está dominada macroscópica y microscópicamente por la hinchazón y luego por la formación de granulomas espermáticos (Bulgin, 1990).

Macroscópicamente, las lesiones suelen estar restringidas a la cola del epidídimo, independientemente de la bacteria causante. La cola del epidídimo se agranda hasta 10 veces y es más grande cuando se forman granulomas espermáticos. Microscópicamente, la luz del conducto contiene una mezcla de espermatozoides, neutrófilos y macrófagos y células gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño (Figura 5) (Paul S., 2017).

El epitelio cambia de columnar simple y ciliado a columnar pseudoestratificado y cúbico con hiperplasia focal. Estas regiones a menudo desarrollan espacios o cavidades intraepiteliales. Parte del epitelio se vuelve de tipo escamoso estratificado (metaplasia escamosa). La pared de músculo liso del conducto y el intersticio contienen muchos linfocitos y células plasmáticas, además de edema y fibrina inicialmente (Robert F., 2017).

El tejido fibroso se desarrolla rápidamente comenzando con el tejido de granulación y eventualmente formando tejido fibroso maduro. Los abscesos intersticiales y los granulomas espermáticos se desarrollan después de la muerte del tejido o la ruptura del conducto y el desarrollo de un espermatocele. El espermatocele puede romperse en la cavidad de las túnicas vaginales y producir una periorquitis grave. Con el tiempo y la gravedad, las túnicas se engrosan con edema y depósito de fibrina, seguido de tejido de granulación y finalmente fibrosis. (Paul S., 2017; Moustacas et al., 2010).

Existen reportes de abortos en borregas a causa de *A. seminis*. Los casos de epididimitis ovina causados por *A. seminis* se han reportado en diferentes regiones productoras del mundo, en México se reportó por primera vez en 1986 (Núñez-del Arco et al., 2006); las pérdidas económicas a los productores se deben a que la infección por *A. seminis* causa esterilidad en los machos sementales.

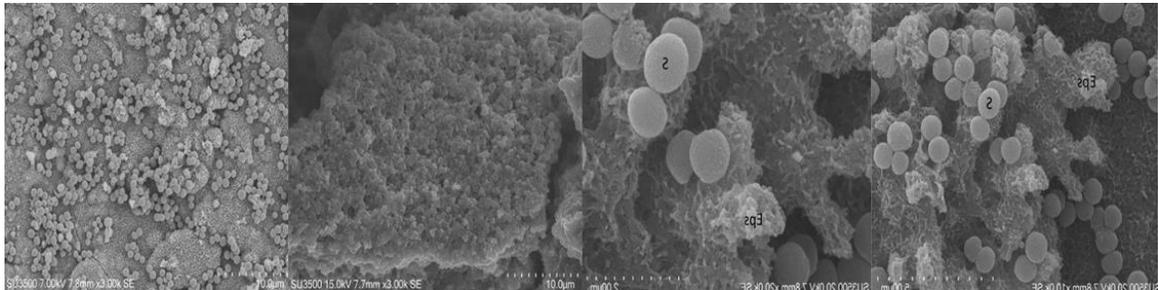
## 1.6.- La biopelícula bacteriana

Históricamente el estudio de bacterias se había centrado en la búsqueda de biosidas contra bacterias mortales, cultivando a los patógenos bacterianos en medios de cultivos líquidos, debido a la arraigada idea de que las bacterias eran microorganismos individuales que flotan libremente, carentes de interacción social o asociación alguna. La aparición de bacterias resistentes a los medicamentos y la dificultad para matar algunas bacterias llevaron a una reevaluación del estilo de vida bacteriano y ahora se reconoce que la agregación de bacterias dentro de matrices auto producidas, llamadas biopelículas, dota a las bacterias de mecanismos para resistir los biocidas. Ya en 1684, un científico holandés, Antonie van Leeuwenhoek, había observado la placa dental usando un microscopio construido por él mismo y lo describió como caspa, esto era una biopelícula, pero aún no se comprendía su naturaleza, las biopelículas se observaron unos siglos antes de que se comprendiera su relevancia para la persistencia de la enfermedad (Rabin et al., 2015).

Durante el siglo XX los científicos comenzaron a darse cuenta de que algunas bacterias sésiles, es decir bacterias no plantónicas estaban directamente relacionadas con la enfermedad, por ejemplo, en 1977, se encontró una agregación de *Pseudomonas aeruginosa* en el esputo de los pulmones de pacientes con fibrosis quística infectados con esta bacteria. En 1978, Clark informó que un componente importante de la biopelícula de *Streptococcus mutans*, que se le llamo glucocáliz, compuesto de polisacárido, se formaba en los dientes. El término 'biopelícula' fue introducido formalmente en 1978 por Costerton (Costerton et al., 1978).

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero; estas estructuras complejas están constituidas principalmente de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (exopolímeros). Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen. En un principio en el hombre, las biopelículas se asociaban con un gran número de procesos infecciosos, que por lo general son de transcurso lento o crónicas. Actualmente se reconoce la importancia de las biopelículas en enfermedades infecciosas de animales importantes en el sector ganadero. El estudio de las biopelículas es un área excitante, en continua evolución; las biopelículas tienen repercusiones importantes para la humanidad; las

implicaciones que presentan estas asociaciones en los diversos ámbitos abarcan la medicina y la industria, e incluso la producción e inocuidad alimentaria (Betancourth et al., 2004)



**Figura 6.- Biopelícula de *S. mutans*:** Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la biopelícula de *S. mutans*, mostrando la conformación del material secretado por las bacterias y la forma en la que se arregla en conformación 3D (Relucenti et al., 2021).

Una forma de persistir, por una bacteria, en un hospedero, es a través de la producción de biopelículas. Las bacterias presentes en estas estructuras pueden controlar su fisiología a través de una regulación genética, induciendo cambios en la morfología celular, propiedades superficiales generales y/o expresión de determinantes específicos para la adhesión. Una gran variedad de componentes de la biopelícula puede estar involucrada en el proceso de colonización bacteriana (Flemming et al., 2010).

### 1.6.1 Formación de biopelícula

El proceso de formación de biopelículas se desencadena con la adherencia de los microorganismos planctónicos a las superficies y, por lo tanto, se considera una etapa importante para desarrollar los microorganismos de flujo libre en una estructura de comunidad ensamblada (Haggag, 2010). Durante la etapa inicial de formación de biopelículas, los microorganismos se adhieren de manera transitoria y reversible a las superficies y esta etapa se caracteriza por la presencia de microorganismos polarmente unidos a las superficies. A partir de entonces, los microorganismos cambian la orientación para “acostarse” sobre las superficies y buscan una unión irreversible que desarrolla resistencia a muchos factores físicos que podrían dificultar la formación de biopelículas (Banerjee et al., 2015) (Figura 7).

## **Crecimiento o formación de micro colonias**

Poco después de la adhesión exitosa de los microorganismos a las superficies, los microorganismos adheridos comienzan a multiplicarse y agregarse dentro del exopolímero de producción propia, lo que conduce a la formación de micro colonias en presencia de una alta concentración de c-di-GMP. Las motilidades mediadas por flagelos y pili tipo IV son importantes para las interacciones entre los microorganismos y las superficies, y las agregaciones de células para formar micro colonias, respectivamente (Rabin et al., 2015).

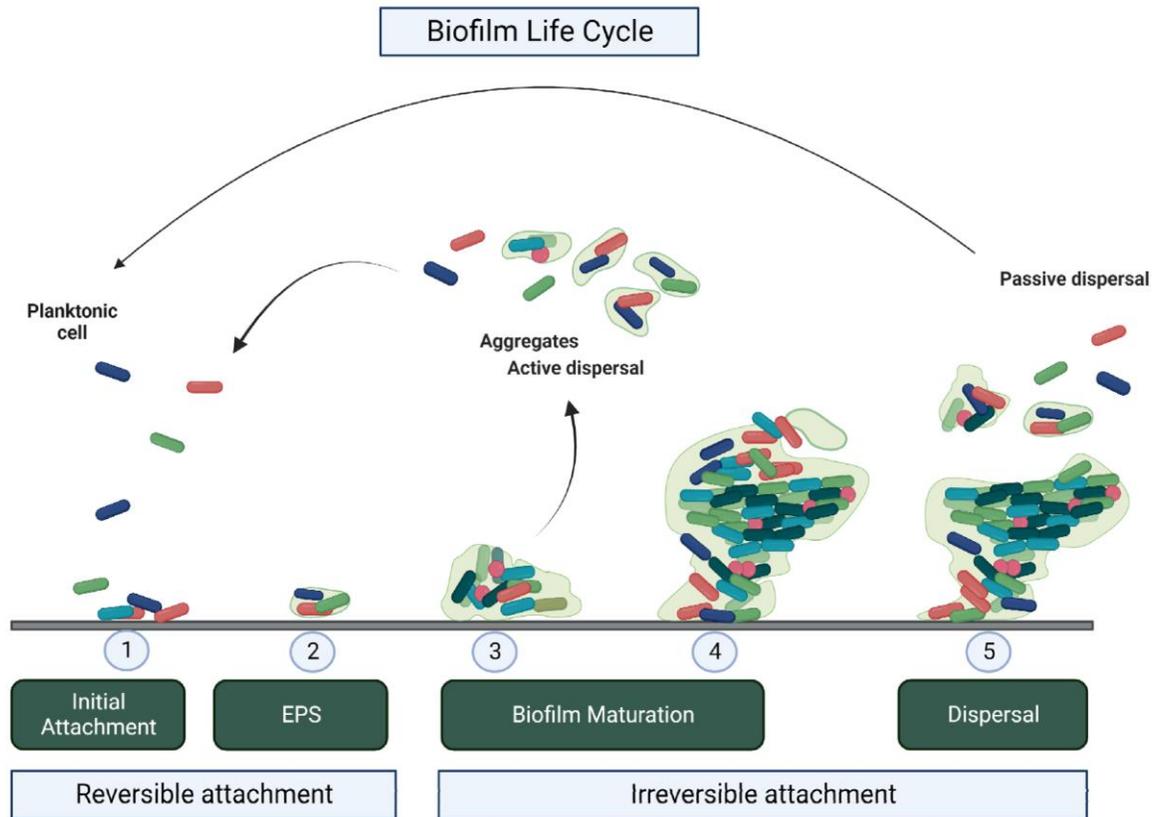
## **Maduración**

El exopolisacárido (EPS) juega un papel crucial en la maduración de biopelículas, ya que ayuda en la unión microbiana a las superficies, estabilizando la estructura tridimensional de la biopelícula, agrupando células, protegiéndolas de diversos estreses como la respuesta del sistema inmunológico del huésped, antimicrobianos, daño oxidativo y cationes metálicos; también encapsular moléculas de señalización necesarias para la detección de quórum, productos metabólicos y enzimas (Toyofuku et al., 2016). Una biopelícula madura puede adquirir una estructura en forma de "hongo" o "torre" en la que los microorganismos se organizan según la aerotolerancia y la tasa de metabolismo (Rabin et al., 2015). Otto en 2013 demostró el papel de los tensoactivos y las modulinas en la maduración de la biopelícula de *Staphylococcus spp* a través de mecanismos mediados por detección de quórum. Una biopelícula madura es una estructura de tres capas: capa reguladora interna, capa basal microbiana media y capa externa habitada por la forma planctónica de microorganismos que están listos para salir de la biopelícula (Zhao et al., 2017).

## **Dispersión**

Finalmente, la biopelícula madura se rompe de forma activa (dispersión dependiente de la degradación de exopolímeros y la motilidad) o pasiva (factores físicos como la dispersión dependiente del flujo de líquido) para dispersar los microorganismos y comenzar un nuevo ciclo de formación de biopelícula. Algunos factores que son los principales responsables de la dispersión de la biopelícula madura incluyen la población superada, la competencia intensa, la falta de nutrientes (Rabin et al., 2015), la acción enzimática que provoca la digestión del alginato en *Pseudomonas spp.* (Costerton et al., 1999), y la variación en las condiciones ambientales como la temperatura, la deficiencia de oxígeno y la acumulación de metabolitos, así como la regulación positiva de genes responsables de la motilidad celular y la degradación de EPS, y la regulación

negativa de genes importantes para la síntesis de polisacáridos y fimbrias (McDougald et al., 2012).



**Figura 7.- Pasos de la formación de la biopelícula microbiana:** 1-Inicio de la adhesión bacteriana (fuerzas más débiles); 2-Acción de detección de quórum y comienzo de fuerzas vinculantes más fuertes; 3-Formación de micro colonias con mayor producción de EPS y formación de estructuras tridimensionales; 4-biopelícula madura; 5-Desprendimiento y reversión al crecimiento planctónico (dispersión celular) (Banerjee et al., 2015).

### 1.6.2 Composición de la biopelícula

La biopelícula es una estructura heterogénea que comprende principalmente células microbianas (10-25 %) y una matriz exopolimérica de producción propia (75-90 %). Además, en una biopelícula heterogénea, los huecos intersticiales o canales de agua de la biopelícula son necesarios para separar las micro colonias entre sí (Evans, 2003). La matriz exopolimérica forma un andamio que mantiene unida la biopelícula y, por lo tanto, ayuda en la comunicación de célula a célula y proporciona las fuerzas de adhesión y cohesión necesarias para la formación de

biopelícula. La matriz exopolimérica ayuda en el flujo de nutrientes, mantiene la disponibilidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) para la transferencia horizontal de genes (HGT) y actúa como una barrera protectora contra los biocidas oxidantes, los antibióticos, la radiación ultravioleta, la desecación y el sistema de defensa inmunitario del huésped (Flemming et al., 2000; Rather et al., 2021) (Figura 8).

### **Polisacáridos**

La mayoría de los polisacáridos son heterogéneos, mientras que algunos son homogéneos, como la celulosa, los fructanos derivados de la sacarosa y los glucanos (Flemming et al., 2010). Varias interacciones como las descritas de van der Waals, las fuerzas electrostáticas de atracción y repulsión, las fuerzas de atracción iónicas y los enlaces de hidrógeno, promueven la interacción de los polisacáridos consigo mismos o con las proteínas y los iones necesarios para mantener la estructura y la estabilidad de la matriz de la biopelícula (Lembre et al., 2012). En *P. aeruginosa*, tres exopolisacáridos, a saber, Pel, Psl y alginato, contribuyen predominantemente a la formación de biopelículas y al mantenimiento de la arquitectura de biopelículas (Rehm, 2010). El papel de los polisacáridos es actuar como un pegamento molecular necesario para la adhesión bacteriana entre sí y con las superficies bióticas y abióticas para la colonización, además de desempeñar un papel protector contra el sistema inmunitario y otras tensiones externas (Limoli et al., 2015).

### **Proteínas extracelulares**

Las proteínas extracelulares en la matriz de la biopelícula son la amalgama de proteínas extracelulares secretadas, subunidades proteicas de apéndices celulares como pelos y flagelos, adherencias a la superficie celular y proteínas de vesículas de membrana externa. Estas, interactúan con exopolisacáridos y ácidos nucleicos, por lo que ayudan en la estabilización de la matriz de la biopelícula, la colonización de la superficie y el mantenimiento de la integridad y la arquitectura de la biopelícula (Fong et al., 2015). Algunas proteínas ayudan en la degradación y dispersión de la matriz de la biopelícula, como las proteasas, que digieren las proteínas de la matriz (Martí et al., 2015), la dispersina B, de la glicosil hidrolasa, que degrada los polisacáridos (Kaplan et al., 2003) y las ADNasas que rompen los ácidos nucleicos extracelulares (Mann et al., 2003; Nijland et al., 2005). Jiao y colaboradores describieron una diferencia significativa entre la composición del proteoma de la matriz de la biopelícula y la de la fracción de células individuales y encontró una concentración alta de proteasas, proteínas de pared celular, enzimas

del metabolismo de los polisacáridos, disulfuro-isomerasas, chaperonas y proteínas de unión al ADN en la matriz de la biopelícula. Toyofuku y colaboradores demostraron en el 2016 que alrededor del 30 % de las proteínas de la matriz de *P. aeruginosa* eran proteínas de membrana que se encontraban en vesículas de membrana externa (OMV), mientras que una parte de las proteínas se derivaba de células lisadas y proteínas secretadas por esta bacteria.

#### ADN extracelular

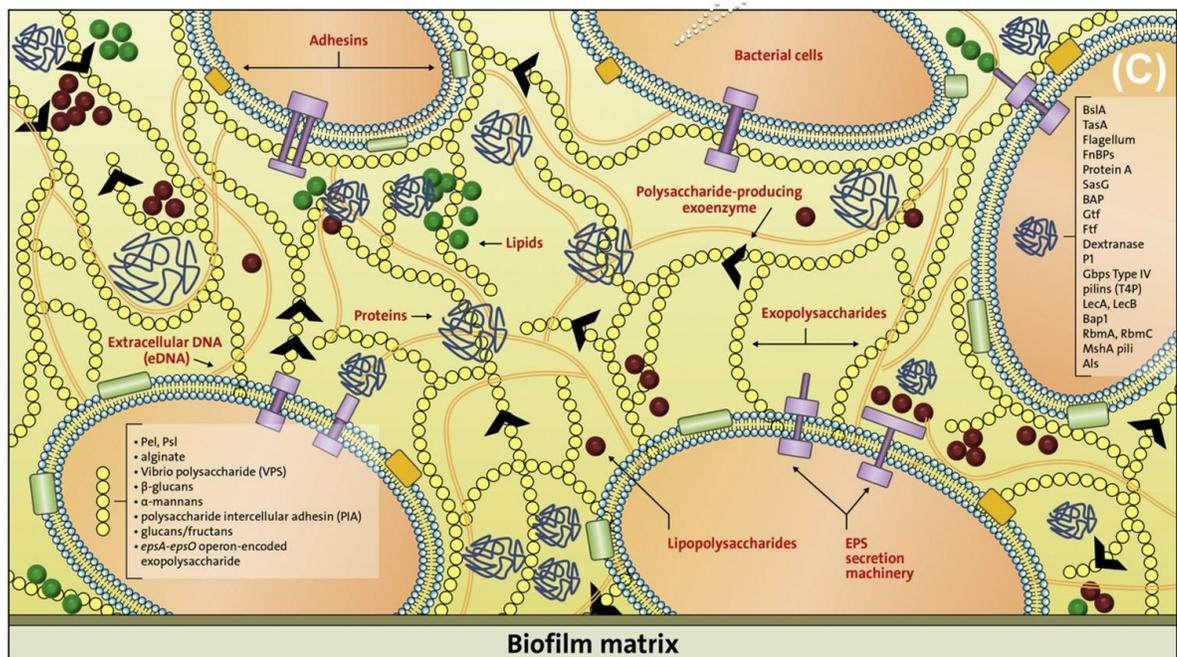
El ADN extracelular (eADN) es uno de los componentes clave de la matriz de la biopelícula; importante para la agregación microbiana dentro de una biopelícula. El mecanismo de origen del eADN es diverso, ya que se libera a través de los sistemas de secreción bacterianos, la lisis celular debido a infecciones por fagos, la autólisis, la liberación de ADN regulada por detección de quórum o tal vez se encuentre en asociación con OMV que contienen ADN (Allesen-Holm et al., 2003; Montanaro et al., 2011; Vorkapic et al., 2016; Wilton et al., 2016; Ibáñez de Aldecoa et al., 2017). El eADN guía la motilidad, proporciona estabilidad estructural, favorece la patogenicidad y quela los cationes que mejoran la resistencia a los antibióticos. El eADN también desempeña un papel integral en la adhesión celular, el mantenimiento de la integridad estructural de la matriz, la protección contra el sistema inmunitario del huésped y los antibióticos (Okshevsky et al., 2015). Wilton et al. en 2016 describieron que el eADN es responsable de la acidificación de la matriz que contribuye a una mayor resistencia de *P. aeruginosa* contra los antibióticos. Además, Harmsen y colaboradores en 2010 describieron el papel de eADN en la unión y la formación de biopelículas en cepas de *Listeria monocytogenes*.

#### Surfactantes y lípidos

Algunas especies como *Rhodococcus spp.* producen exopolisacáridos hidrofóbicos y se adhieren al teflón y colonizan superficies cerosas (Neu et al., 1988). Ron y Rosenberg en el 2001 informaron sobre el papel de los biosurfactantes en la unión de metales pesados y la producción de factores de virulencia. Algunos lípidos con propiedades tenso activas disponibles en la matriz de la biopelícula son la surfactina, el emulsán y la viscosina; estos aumentan la disponibilidad de sustancias hidrofóbicas dispersándolas. Los ramnolípidos, una clase importante de tensoactivos estudiados en *P. aeruginosa*, inician la formación de micro colonias, ayudan a formar biopelículas y también facilitan la dispersión de biopelículas (Kjelleberg et al., 2007).

## Agua

El agua se considera el componente más abundante de la matriz exopolimérica de la biopelícula, mantiene la biopelícula hidratada y la protege de la desecación; incluso durante las fluctuaciones del contenido de agua ambiental (Flemming, Wingender, 2010). El flujo y el mantenimiento de los nutrientes esenciales dentro de una biopelícula se atribuyen a la cantidad de agua disponible (Sutherland, 2001).



Trends in Microbiology

**Figura 8.- Esquema de los componentes de la matriz exopolimérica de la biopelícula:** Representación esquemática de los principales componentes de la matriz de la biopelícula y sus funciones. La matriz de la biopelícula consta de una amplia gama de biomoléculas funcionales, como los exopolisacáridos (Pel, Psl, alginato, Vibrio polisacárido (VPS), β-glucanos, α-mannanos, adhesina intercelular de polisacárido (PIA), glucanos/fructanos, *epsA-epsO*, exopolisacárido codificado por operón), proteínas (BslA, TasA, flagelo, FnBP, proteína A, SasG, BAP, Gtf, Ftf, dextranasa, P1, Gbps, pilinas tipo IV (T4P), LecA, LecB, Bap1, RbmA, RbmC, MshA pili, Als), ácidos nucleicos y lípidos que se organizan en una matriz extracelular. Esta matriz sirve como andamio para el soporte estructural y un entorno dinámico que proporciona señales químicas y físicas variables a las comunidades microbianas, promoviendo un estilo de vida de biopelícula. (Karygianni et al., 2020)

### 1.6.3 Estructura de la biopelícula

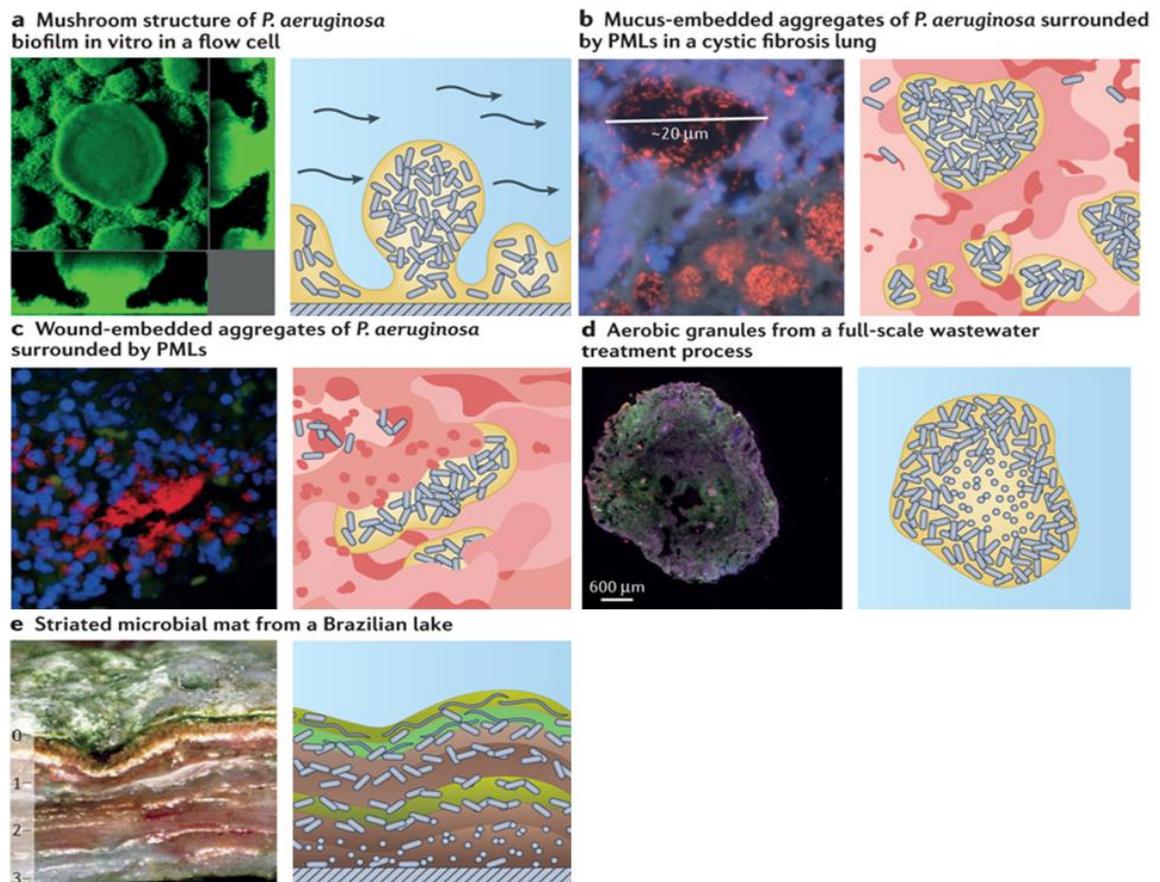
Las propiedades estructurales y bioquímicas de la biopelícula proporcionan las propiedades emergentes de ésta, incluida la adhesión a la superficie, las heterogeneidades espaciales y químicas, las interacciones polimicrobianas sinérgicas/competitivas, así como la resistencia antimicrobiana; estas propiedades están relacionadas con la capacidad virulenta de las bacterias patógenas, sin embargo, la biopelícula también es una forma de vida común en ambientes fuera del hospedero. Por ejemplo, la microbiota en la piel, donde la mayoría de las bacterias se organizan como pequeños agregados (Burmolle et al., 2010).

Además de las biopelículas asociadas a infecciones y otras asociadas al hospedero, las bacterias en el medio ambiente están presentes como colonias adheridas a una superficie y como agregados incrustados o que flotan libremente. Un ejemplo de esto son los procesos biológicos en el tratamiento de aguas residuales, donde agregados densos de múltiples especies de microorganismos se auto ensamblan en procesos aeróbicos y anaeróbicos para mantener un buen ritmo de procesamiento de desechos orgánicos presentes en el agua a tratar. La observación general es que la microbiota ambiental está dominada por patrones heterogéneos de bacterias agregadas en lugar de películas continuas de bacterias en áreas grandes (centimétricas); sin embargo, hasta cierto punto, se trata de una cuestión de escala. Las biopelículas de algas en los cascos de los barcos pueden aparecer macroscópicamente continuas y, en áreas localizadas, como una capa plana uniforme, pero aparecen irregulares bajo el examen microscópico (Salta et al., 2013; Flemming et al., 2019).

La arquitectura de las biopelículas está influenciada por muchos factores micro ambiental, incluido las condiciones hidrodinámicas, la concentración de nutrientes, la motilidad bacteriana y la comunicación intercelular, así como los exopolisacáridos y las proteínas, como lo demuestra la morfología alterada de las biopelículas producidas por mutantes que carecen de componentes de EPS. Por ejemplo, los exopolisacáridos de *V. cholerae* y el ácido colánico de *E. coli* están involucrados en la formación de una arquitectura de biopelícula tridimensional (Danese et al., 2000)

Uno de los exopolisacáridos mejor estudiados involucrados en la formación de biopelículas es el alginato en las biopelículas de cepas mucoides del patógeno oportunista *P. aeruginosa*. El alginato no es esencial para la formación de biopelículas en este microorganismo, pero tiene un efecto notable en la arquitectura de la biopelícula cuando está presente (Figura 9) (Tielen et al., 2005).

En condiciones en las que los productores de alginato forman biopelículas estructuralmente heterogéneas, las cepas no mucoides desarrollan biopelículas planas y más homogéneas. Los grupos acetilo son sustituyentes comunes de los exopolisacáridos y aumentan las propiedades adhesivas y cohesivas del EPS y alteran la arquitectura de una biopelícula. La modificación del alginato con grupos acetilo influye fuertemente en la agregación de bacterias en micro colonias y determina la arquitectura estructuralmente heterogénea de biopelículas maduras (Wozniak et al., 2003).



**Figura 9.- Estructuras variadas de la biopelícula de *P. aeruginosa*:** Variedad de estructuras de biopelículas que subrayan las diferencias entre biopelículas *in vitro* e *in vivo* o ambientales. Las imágenes originales se muestran en la columna de la izquierda y un dibujo esquemático de las estructuras y su organización se proporciona en la columna de la derecha con sombreado que denota agua (azul), células microbianas agregadas (púrpura) y sus sustancias poliméricas extracelulares (amarillo), células huésped y otro material, incluido moco o tejido (rojo), y la superficie de inserción (gris sombreado) (Tielen et al., 2005).

La arquitectura de la biopelícula también puede verse fuertemente influenciada por la interacción del EPS aniónico, que contiene grupos carboxílicos, con cationes multivalentes. Por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede formar un puente entre moléculas de alginato polianiónico, estimulando el desarrollo de biopelículas gruesas y compactas con mayor estabilidad mecánica (Körstgens et al., 2001)

#### **1.6.4 Regulación de la formación de la biopelícula**

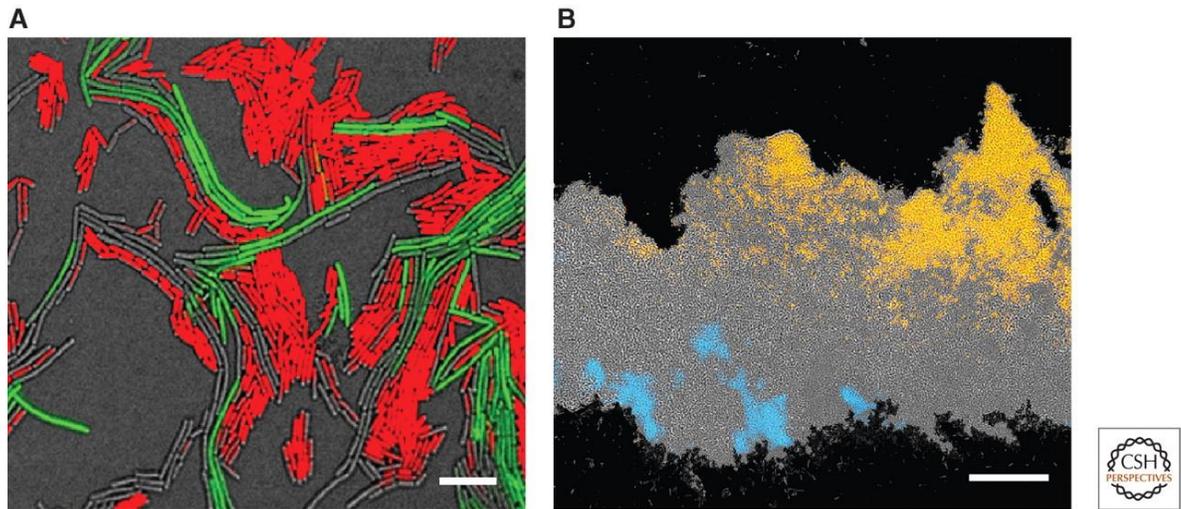
La organización de las biopelículas bacterianas, basados en la matriz, permite que las bacterias puedan interactuar entre sí, lo hagan en estrecha proximidad entre las células. Esto permite el intercambio de metabolitos, moléculas de señalización, material genético y compuestos defensivos, todos los cuales dictan interacciones entre organismos de la misma especie o entre diferentes especies. Además, la heterogeneidad de la biopelícula brinda oportunidades de cooperación entre especies con diferentes capacidades metabólicas o gradientes fisiológicos (Flemming et al., 2016).

La actividad fisiológica de las biopelículas produce fuertes gradientes de aceptores y donantes de electrones, así como del valor de pH y las condiciones para reacciones de óxido reducción. Estas características únicas de las biopelículas no solo se pueden detectar en biopelículas multicapa gruesas, sino que ya han surgido después de que solo un número relativamente pequeño de células se haya adherido a una superficie (Kalmbach et al., 1997).

Se observa heterogeneidad estructural y de composición incluso en biopelículas mono especies, que probablemente sea el resultado de la variación fenotípica que surge de la expresión génica fluctuante a lo largo del tiempo en células individuales y la expresión génica diferencial entre diferentes células. La actividad fisiológica localizada de estas células inmovilizadas espacialmente separadas contribuye a la formación de gradientes de nutrientes, desechos y moléculas de señalización que aumentan aún más en las biopelículas multicapa, como los tapetes microbianos o los flóculos (Figura 19) (Flemming et al., 2010).

Uno de los desencadenantes externos más importantes del establecimiento de gradientes es la disponibilidad de aceptores de electrones como el oxígeno. En los hábitats acuáticos, en los que el oxígeno está presente en la fase acuosa, la capa superior de la biopelícula es aeróbica. Las micro colonias aeróbicas que respiran activamente pueden consumir oxígeno más rápido de lo que se difunde a través de la biopelícula, lo que da como resultado la formación de zonas anaeróbicas en

las capas profundas de la biopelícula, mientras que las capas superiores siguen siendo aeróbicas. Los gradientes de disponibilidad de oxígeno pueden ocurrir en una distancia pequeña, de modo que las áreas aeróbicas y anaeróbicas de la biopelícula estén separadas entre sí por solo unos pocos micrómetros (Von Ohle et al., 2010).



**Figura 10.- Heterogeneidad en biopelículas de *B. subtilis*.** (A) Vista superior de las células al Inicio del Desarrollo de la Colonia (IDC). Superposición de imágenes de fluorescencia con células IDC (gris), móviles (roja) y productoras de matriz (verde). Barra 5 µm. (B) sección delgada de biopelícula de tres días de desarrollo. El agar está en la parte inferior y el centro de la colonia está a la derecha. Superposición de imágenes de fluorescencia con células IDC (gris), móviles (azul) y esporuladas (naranja). Barra 50 µm. (López et al., 2010)

La estratificación fisiológica y la heterogeneidad en las biopelículas permiten la organización espacial de biopelículas de especies mixtas (así como mono especies). Por ejemplo, los microorganismos fototróficos, como las algas, las cianobacterias y las bacterias fototróficas anoxigénicas, generan y liberan sustratos orgánicos como exudados, y las especies vecinas cercanas a las células productoras se benefician de estos sustratos y muestran una actividad metabólica mejorada. Estas interacciones metabólicas permiten el desarrollo de biopelículas espacialmente organizadas que son sistemas interactivos complejos, como las esteras microbianas o las biopelículas fluviales. Los detalles microscópicos de tales biopelículas solo se volvieron accesibles experimentalmente con la disponibilidad de micro electrodos específicos que permitieron medir parámetros como el oxígeno y el pH a una resolución de micro escala (Billings et al., 2015).

La compleja red y la división coordinada del trabajo que emerge de la estrecha proximidad entre las células en la matriz de la biopelícula ha inspirado la

introducción del término antropomórfico “sociomicrobiología”. Uno de los mecanismos habilitadores de la sociomicrobiología es el proceso de señalización intercelular, que en sí mismo está fuertemente influenciado por las propiedades de la matriz de la biopelícula, pero la actividad metabólica también es una característica importante de las interacciones sociales en las biopelículas. De hecho, dadas las altas densidades celulares y la diversidad de especies de muchas biopelículas, no sorprende que las biopelículas sean los sitios principales para el intercambio de subproductos metabólicos entre especies (Kragh et al., 2016).

Tales procesos no son posibles para suspensiones de células planctónicas. La auxotrofia de aminoácidos es una estrategia común mediante la cual las comunidades microbianas reducen la carga metabólica colectiva de la biosíntesis y estabilizan la cooperación, y es probable que esto también sea cierto para los azúcares y los nucleótidos. Así, el intercambio de aminoácidos y azúcares puede considerarse como interacciones mutualistas comunes en sub comunidades que existen en paralelo entre sí (Zelezniak et al., 2015).

La distinción entre poblaciones (grupos de individuos de una especie) y comunidades (grupos de individuos de varias especies) es fundamental para el estudio de la ecología de las biopelículas. Como tal, los resultados biológicos, como la repartición de recursos, el parasitismo (García-Contreras et al., 2020), la cooperación y la competencia, que ocurren en biopelículas de especies mixtas deben enmarcarse en el contexto de una comunidad, en lugar de en el contexto de una población de individuos de una sola especie. Sin embargo, aunque la mayoría de las biopelículas naturales existen como comunidades muy diversas, la mayoría de los experimentos de laboratorio se realizan con biopelículas que son poblaciones de una sola especie en lugar de comunidades de especies mixtas. Estudios recientes de modelos de biopelículas de especies mixtas demuestran claramente la aparición de un comportamiento cooperativo (Lee et al., 2014)

La cooperación no ocurre necesariamente en todas las biopelículas, e incluso se ha sugerido que la mayoría de las interacciones especie-especie en las biopelículas son negativas (es decir, interacciones competitivas o interacciones que son indeseables para un socio y neutrales para el otro). De acuerdo con este argumento, las observaciones que atribuyen un mayor número de interacciones sociales a efectos cooperativos pueden deberse a una selección previa de interacciones cooperativas y/o al uso de una definición de cooperación que carece de rigor. Los mecanismos que median la competencia en las biopelículas se han revisado exhaustivamente por Rendueles y colaboradores en 2015 e incluyen el

uso de antibióticos, bacteriocinas, vesículas de membrana extracelular y sistemas de secreción tipo VI (como es el caso de *V. cholerae*). Estas habilidades de competencia impulsan estrategias competitivas que incluyen la inhibición de la adhesión inicial a la biopelícula, el cubrimiento de la superficie (por ejemplo, la propagación de células de *P. aeruginosa* en la superficie al modificar la motilidad, evitando así la adhesión de células competidoras de *Agrobacterium tumefaciens*) o la producción de biosurfactantes con propiedades antimicrobianas. Además, los invasores pueden inhibir la maduración de una biopelícula y promover su dispersión mediante la regulación a la baja de la producción de adhesinas, la inhibición de la comunicación entre células o la degradación de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas de la matriz (McIntyre et al., 2010).

### **Detección de Quorum-sensing (QS) en la formación de la biopelícula.**

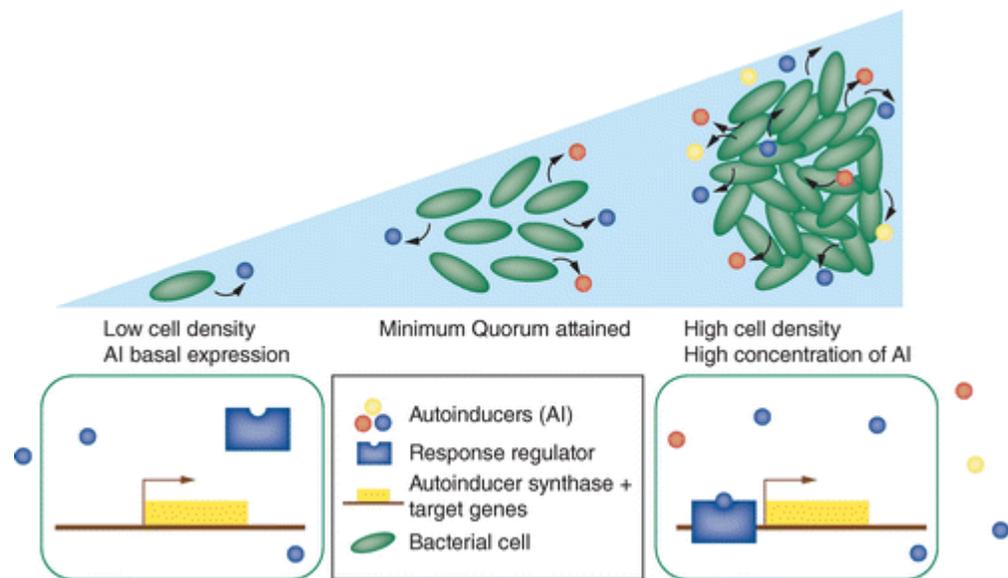
La detección de quórum (QS) es un mecanismo de comunicación descrito primeramente entre bacterias que permite controlar procesos específicos, como la formación de biopelículas, la expresión de factores de virulencia, la producción de metabolitos secundarios y los mecanismos de adaptación al estrés, como los sistemas de competencia bacteriana, incluidos los sistemas de secreción (Figura 11) (Hawver et al., 2016).

El quórum sensing actúa monitoreando la densidad celular a través de señales químicas que permiten la comunicación entre bacterias para regular la expresión de genes involucrados en virulencia, competencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos (Paul et al., 2018). En general, los sistemas QS dependen de la especie microbiana y contribuyen a procesos como el mantenimiento celular, la formación de biopelículas y la transferencia horizontal de genes (Pena et al., 2019).

QS confiere a las bacterias la capacidad de reconocer la densidad de población midiendo la acumulación de una molécula de señalización específica que secretan los miembros de la comunidad. Solo cuando la densidad de población es alta, la acumulación de la señal en el medio extracelular es suficiente para activar una respuesta. Estructuralmente, las moléculas de señal QS tienen un peso molecular bajo y pertenecen a una amplia gama de clases químicas que incluyen acil homoserina lactonas (AHL), diésteres de borato de furanosilo (AI<sub>2</sub>), ácidos grasos insaturados en cis (señales de la familia DSF) y péptidos (Solano et al., 2014)

Las evidencias recientes indican que muchas especies bacterianas utilizan QS para coordinar la formación y el desmontaje de las biopelículas. La dispersión de biopelículas es esencial para permitir que las bacterias escapen y colonicen

nuevos nichos cuando los nutrientes y otros recursos se vuelven limitados y se acumulan productos de desecho. Existen diferentes estrategias para lograr la dispersión de la biopelícula: finalizar la síntesis de los compuestos de la matriz de la biopelícula, degradar la matriz y también interrumpir las interacciones no covalentes entre los componentes de la matriz. Debido a que las redes reguladoras de QS suelen ser muy complejas y pueden incluir varios genes cuyos productos afectan el desarrollo de biopelículas en diferentes etapas, no siempre es fácil entender cómo la activación de QS desencadena finalmente la dispersión de biopelículas (Otto, 2013).



**Figura 11. Detección de Quorum-sensing (QS) en la formación de la biopelícula:** La detección de quórum involucra un sistema regulatorio de dos componentes (Otto, 2013)

El AI se acumula de una manera dependiente de la densidad celular hasta que se alcanza un nivel de umbral (quórum). Cuando se alcanza el umbral, la IA se une a la proteína reguladora de la respuesta y la activa, lo que a su vez induce una cascada de señalización que concluye con la expresión del gen objetivo. El regulador de respuesta consta de dos dominios: la región N-terminal que interactúa con AI y la C-terminal, que es el dominio de unión al ADN (Warrier et al., 2021)

### 1.6.5 Virulencia asociada a la biopelícula

Las propiedades físicas y químicas de la matriz de la biopelícula proporcionan propiedades emergentes que son críticas para la existencia de la biopelícula y la expresión de virulencia. Estos incluyen la adhesión-cohesión, los microambientes

patológicos, la resistencia mecánica y a los antibióticos; que pueden conducir al inicio de la enfermedad y empeorar su gravedad (Karygianni et al., 2020)

La importancia de la matriz en el comportamiento y la función de los colectivos microbianos, así como para la tolerancia a los antimicrobianos, se reconoce cada vez más y se considera parte integral de la biopelícula y su relación con la virulencia (Flemming et al., 2016; Dragoš et al., 2017). La matriz juega un papel esencial en la patogenia de las enfermedades humanas y animales, ya que varios constituyentes de la matriz se reconocen como posibles factores de virulencia (Hyun et al., 2016; William et al., 2018; Giaouris et al., 2015). Por ejemplo, el eADN y el polisacárido de superficie compuesto de poli- N-acetilglucosamina (PNAG), median numerosos rasgos de virulencia, incluida la colonización del huésped y la resistencia a los antimicrobianos. Otro ejemplo es que la activación de la producción de PNAG en *S. aureus* no solo contribuyó a la formación de biopelículas en la superficie de los catéteres implantados (Burgui et al., 2018), sino que también ralentizó el reclutamiento de neutrófilos y la eliminación de bacterias en ratones desafiados por vía intraperitoneal con células de biopelículas de *S. epidermidis* de un mutante defectuoso en PNAG (Ferreirinha et al., 2016). Cepas productoras de biopelículas de *P. aeruginosa* son una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. En un modelo animal, el aumento de los niveles de citoquinas Th2 y macrófagos fue impulsado principalmente por EPS en lugar del propio patógeno *P. aeruginosa* (Bielen et al., 2017).

La secreción de proteasas y otras enzimas extracelulares, como lipasa, esterasa, DNasa, RNasa y fibrinolisisina, es un proceso esencial para el crecimiento bacteriano y la virulencia. Por ejemplo, las glicosiltransferasas bacterianas y sus productos de glucano se han estudiado ampliamente por sus roles funcionales en la patogénesis de la caries dental, en estudios clínicos e *in vivo*. Los glucanos promueven la adhesión-cohesión bacteriana, las interacciones entre especies y la acumulación de biopelículas, además de ayudar a crear microambientes protectores y altamente ácidos. Recientemente, se describió una supuesta glucosiltransferasa en *S. mutans* modula las interacciones dinámicas entre dos componentes clave de la matriz de la biopelícula, el glucano y el eADN. La eliminación de smu-833 disminuye la concentración de glucano y aumenta la del eADN, pero mantiene la biomasa global de la biopelícula con una virulencia reducida en un modelo de caries dental en ratas *in vivo* (Rainey et al., 2019). La dextranasa (Dex) es un tipo de glucanasa de *S. mutans*, que participa en la modificación y degradación de los glucanos extracelulares solubles en agua, que se ha asociado con el desarrollo de caries en ratas (Yang et al., 2019).

Los patógenos bacterianos *P. aeruginosa* y *S. aureus*, han desarrollado una compleja red de evasión, contra inhibición y subyugación en su batalla por el espacio y los nutrientes. En particular, los componentes de la matriz también juegan un papel importante en las interacciones, *in vivo*, entre especies que conforman una biopelícula (Hotterbeekx et al., 2017). El ensamblaje de la biopelícula entérica es esencial para comprender su papel en la virulencia. La matriz de las biopelículas de bacterias entéricas, que incluyen principalmente proteínas de tipo amiloide como curli, eADN, antígeno O, celulosa y proteínas de superficie como BapA, están etiológicamente asociados con la enfermedad autoinmune lupus eritematoso y pueden activar la fibrilación del amiloide  $\alpha$ , relacionado con la enfermedad de Parkinson (Tursi & Tukul 2018). Los componentes de EPS entéricos se han reconocido durante mucho tiempo como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que pueden activar los receptores inmunitarios innatos pro inflamatorios, como los receptores tipo Toll (TLR2, TLR9), Y el heterocomplejo CD14 y NLRP3. Las proteínas Curli son fibras amiloides extracelulares producidas por entero bacterias como *E. coli* y *Salmonella*. Se ha demostrado que estas fibras desempeñan un papel importante en la formación de biopelículas, ya que interactúan directamente con el sustrato y forman haces entre las células bacterianas, lo que permite una asociación cohesiva y estable de células en la biopelícula. Se ha descubierto que Curli no solo protege a *E. coli*, sino que también mejora su potencial de virulencia al bloquear las acciones de C1q. Otras fibras proteicas, a menudo descritas como amiloides funcionales o fibras similares a amiloide, por ejemplo, las fibras Fap en *Pseudomonas* spp., las fibras TasA no amiloidogénicas formadas por *B. subtilis* y las fibras Bap de *S. aureus*, también están comúnmente presentes en biopelículas (Erskine et al., 2018). Sin embargo, es importante señalar que existe una gran diversidad en la composición de las fibras amiloides como las proteínas “moonlighting” formadas por una amplia gama de especies; esto necesita mayor aclaración, especialmente en la forma en que la biopelícula contribuye a la virulencia (Singh et al., 2020).

## 2.- Antecedentes.

Vaca y colaboradores en 2011 describen por primera vez la formación de una biopelícula por *Gallibacterium anatis*, una bacteria miembro de la familia Pasteurellaceae que infecta aves de corral causando salpingitis y pérdidas económicas en la producción de huevo. Los autores muestran la capacidad de adherencia de *G. anatis* a superficies inertes como vidrio y poli estireno, sus ensayos demuestran la disminución de esta adherencia al tratar a las bacterias con tripsina, al visualizar esta adherencia por microscopia electrónica de barrido después de 6 horas cultivo, observan una matriz exopolimérica robusta lo que sugiere una biopelícula, las bacterias se encuentran entrelazadas por estructuras fimbriales abundantes y observan la secreción de microvesículas, este trabajo concluye que las formas fimbriales pueden ser de origen proteico y que participan en la adherencia, primer paso en la formación de la biopelícula.

Boukahil & Czuprynski en 2015 describen la formación de la biopelícula *in vitro* de *Mannheimia haemolytica*, Esta bacteria miembro de la familia Pasteurellaceae es el principal causante de la fiebre de embarque en bovinos, una enfermedad pulmonar que puede ser mortal y causar fuertes pérdidas económicas para el productor. En este trabajo se describe la condición en la que se forma la biopelícula, así como su composición y la proporción de los exopolímeros presentes en ella; encontrando que los medios enriquecidos como el medio infusión cerebro corazón y el crecimiento a 37°C después de 36 horas incrementa su formación. A través de tinciones y visualización en microscopio evidencian la presencia de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Cuantificando la biomasa determinan que las proteínas son las que la conforman en su mayoría y muestran una mayor resistencia a antibióticos en comparación con los cultivos plántónicos.

Sager y colaboradores en 2015 describen la formación de biopelícula *in vitro* en *Pasteurella pneumotropica* y *Actinobacillus muris*, que son las especies de la familia Pasteurellaceae más aisladas de ratones de laboratorio con rinitis y atrofia osteomuscular de la mandíbula. En este trabajo se investiga si las proteínas, el ADN extracelular y los polisacáridos están involucrados en la formación y estructura de la biopelícula mediante ensayos de inhibición y dispersión de la biopelícula utilizando proteinasa K, DNasa I y peryodato de sodio. Ellos reportan que la biopelícula confiere resistencia a antibióticos; y que *P. pneumotropica* forma biopelículas robustas, posiblemente conformadas principalmente por proteínas y ácidos nucleicos. El uso del peryodato de sodio inhibe el crecimiento bacteriano cuando se añade al comienzo del ensayo de formación de biopelículas, lo que

dificulta la evaluación del papel de los polisacáridos  $\beta$ -1,6-enlazados en la formación de biopelículas, pero tuvo un efecto estimulante en la formación de biopelícula cuando se añade a intervalos preestablecidos en biopelículas maduras de *P. neurotrópica*; en *A. muris* no se observó formación de biopelícula.

Hathroubi y colaboradores en 2018 recapitulan los conocimientos sobre formación, composición, estructura de la biopelícula y relación con el desarrollo de la enfermedad causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*; esta bacteria pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y es el agente causal de la pleuroneumonía porcina, una enfermedad respiratoria altamente contagiosa que es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria porcina mundial. Los autores explican que la biopelícula ha sido descrita *in vitro* e *in vivo* y su composición principal es de carbohidratos y que el uso diferentes medios de cultivo cambian la cantidad en la formación, pero no en su composición, el medio infusión cerebro corazón parece ser el ideal. El N-Poliacetilglucosamina es el principal componente de la biopelícula y se expresa más cuando se induce la biopelícula sobre una superficie de células epiteliales que sobre una superficie inerte, se ha descrito la interacción con proteínas de la superficie de células y que su formación es regulada por Quórum sensing.

Petruzzi y colaboradores en 2020 describen la formación de la biopelícula de *Histophilus somni* y *Pasteurella multocida* que son dos de los múltiples agentes responsables de la enfermedad respiratoria bovina en el ganado y miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Los investigadores plantean la posibilidad de estudiar una biopelícula polimicrobiana *in vitro* e *in vivo*. Las interacciones entre las dos especies en la biopelícula se caracterizaron y cuantificaron mediante fluorescencia. La matriz de biopelícula de cada especie se examinó usando lectinas específicas para el exopolisacárido marcadas con fluorescencia. Las interacciones bacterianas se determinaron por autoagregación y morfología de la biopelícula. *P. multocida* y *H. somni* se distribuyeron uniformemente en la biopelícula *in vitro* y ambas especies contribuyeron a la matriz de biopelícula polimicrobiana. La biomasa promedio y el espesor de la biopelícula, así como el contenido total de carbohidratos y proteínas de la biopelícula, fueron mayores cuando ambas especies estaban presentes. Los aislados de *P. multocida* encapsulados que no pueden formar una biopelícula sustancial mejoran la formación de biopelícula en asociación con *H. somni*, *in vitro*, lo que sugiere que contribuyeron a la matriz de biopelícula polimicrobiana. La evidencia indirecta indicó que *P. multocida* encapsulada también contribuyó a una biopelícula polimicrobiana *in vivo*.

### 3.- Justificación

La producción ovina existe a nivel mundial, pero no es tecnificada como en otros sectores ganaderos o en otros países, la falta de regulaciones sanitarias relacionadas con *A. seminis* ha retrasado las investigaciones relacionadas con la virulencia, la patogenia y el monitoreo epidemiológico.

Aunque se ha confirmado y se ha descrito la patología que desarrolla exclusivamente en el aparato reproductor de machos, aún se desconocen los factores de virulencia implicados en la patogénesis. Con este proyecto se pretende abordar puntos clave en toda infección: la colonización, el establecimiento y la persistencia.

Se desea saber las condiciones óptimas para inducir la formación de biopelícula *in vitro* de *A. seminis*, para caracterizar los exopolímeros presentes en ella y poder identificar la presencia de factores de virulencia. Los resultados obtenidos en este proyecto permitirán conocer algunas de las moléculas involucradas en la formación de esta bioestructura, su composición, y su participación en patogénesis.

### 4.- Hipótesis

*Actinobacillus seminis* es capaz de formar una biopelícula *in vitro*, en condiciones microambientales estresantes con una composición y estructura similar a otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, conteniendo proteínas inmunogénicas y pudiendo ser regulada por Quórum sensing.

### 5.- Objetivos

#### GENERAL.

Caracterizar la formación de biopelícula de *Actinobacillus seminis in vitro*.

#### PARTICULARES.

1.- Determinar las condiciones para la formación de la biopelícula de *A. seminis in vitro*.

2.- Determinar el efecto de las condiciones micro ambientales de estrés sobre la formación de biopelícula de *A. seminis*.

3.- Determinar la naturaleza bioquímica de la biopelícula de *A. seminis*.

4.- Identificar la presencia de posibles factores de virulencia presentes en la biopelícula de *A. seminis* utilizando anti-sueros contra proteínas asociadas con virulencia.

## **6.- Materiales y métodos**

### **Cepas**

Se utilizaron tres cepas de *A. seminis*: una de referencia (ATCC 15768) y dos aislados de campo de borregos con signos clínicos de epididimitis (A4 o ENA-04 y A8 o ENA-08). Las cepas se mantuvieron congeladas en medio TSB con glicerol a -70° C y las cepas de trabajo se mantuvieron por resiembra en agar sangre a 37°C (Montes-García et al., 2018).

### **Condiciones para la formación de la biopelícula *in vitro***

Se probaron los siguientes medios de cultivo: caldo de soya y Tripticaseina (TSB), caldo de infusión cerebro y corazón (BHI) y medio RPMI; incubando a las siguientes temperaturas: 30, 37 y 40 °C en microaerofilia; la formación de biopelícula se midió cada 12 h por 72h (Boukahil & Czuprynski, 2015).

### **Cuantificación de la formación de la biopelícula**

Los ensayos de formación de biopelícula se realizaron en placas de poliestireno de 96 pozos. Ésta se cuantificó por tinción con una solución de cristal violeta al 1%. Después de formada la biopelícula, el medio de cultivo se eliminó y ésta se fijó con metanol durante 5 minutos, se retiró el metanol y enseguida se agregó el colorante y se dejó en el pozo 15 minutos en agitación. El exceso de colorante se

eliminó y el colorante retenido se extrajo con una solución de ácido acético al 30% y se cuantificó a una longitud de 590 nm (Fredheim et al., 2009).

### Efecto de condiciones de estrés sobre la formación de biopelícula

Habiendo determinado que las condiciones más apropiadas de formación de biopelícula eran en medio TSB a 37 °C e incubaciones por 48 h, todos los posteriores experimentos se realizaron usando estas condiciones: se evaluó el efecto de 2,2 dipiridyl (0.25mM), cloruro de calcio (25 mM) y la microaerofilia, ésta última se produjo dentro de una jarra con una vela. Se cuantificó la formación de biopelícula en placa de 96 pozos.

### Observación microscópica de la biopelícula

Se indujeron biopelículas de *A. seminis* en cajas Petri para observar su forma macroscópica y también en cubreobjetos de vidrio dentro de placas de plástico de 80 x 15 mm que contenían medio TSB inoculado con pre cultivos de toda la noche (1% v/v). Después de 48 h de incubación, las biopelículas se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 1 h y se procesaron para ser visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras se recubrieron con oro y se examinaron con un SEM JEOL JSM 6510LV a 25 kV. (Vaca et al., 2011).

### Tinción de los exopolímeros presentes en la biopelícula

Para detectar visualmente la presencia de los diferentes polímeros extracelulares, las biopelículas producidas en cubreobjetos de vidrio inducidas como se describió anteriormente se tiñeron con azul de Coomassie, para evidenciar la presencia de las proteínas; azul Alcian para teñir carbohidratos y GelRed para teñir eADN y se visualizaron con un microscopio de contraste de fase Nikon alphaphotYS2. Las imágenes se fotografiaron con una amplificación de 20X. El ADN extracelular se visualizó en un transiluminador de UV (Boukahil & Czuprynski, 2015).

## Degradación enzimática de la biopelícula

Para determinar la proporción de los exopolímeros presentes en las biopelículas de *A. seminis*, se indujo la formación de biopelícula en placa de 96 pozos en medio TSB a 37°C durante 48 h. posteriormente se reemplazó el sobrenadante con soluciones enzimáticas que contenían de manera independiente proteinasa K (30 mM),  $\alpha$ -amilasa (2.5 U) o ADNsa I (10 mM), todas de Sigma-Aldrich, cada una con sus respectivos tampones de reacción como describen Boukahil y Czuprynski (2015). Después de la incubación, se eliminó el medio y los pocillos se lavaron una vez con agua des ionizada. A continuación, las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y se cuantificaron.

## Cuantificación bioquímica de exopolímeros de biopelículas

Los exopolímeros se cuantificaron a partir de biopelículas inducidas en placas Petri de 10 cm que contenían 7 ml de TSB más 3 ml de *A. seminis* cultivados durante la noche en el mismo medio con agitación a 37°C; Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C, luego, se recolecto la biopelícula y el medio y se centrifugaron a 1800g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con PBS. Para extraer la matriz polimérica, el sedimento se suspendió en 1 ml de NaCl 1.5 M, se mezcló en un vórtex y se incubó en agitación durante 20 min a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). La mezcla se centrifugó a 15.800 g durante 2 min y la fase líquida se congeló hasta su uso (Chiba et al. 2015). Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford, los polisacáridos reducidos mediante el método descrito por Ochoa et al. (2015) y el ADN con un espectrofotómetro NanoDrop <sup>TM</sup> 2000 (ThermoFisher, México) después de limpiar el ADN con un kit de limpieza de Promega (Madison, WI, EE. UU.).

## Efecto de antisueros sobre la formación de biopelícula

Con el fin de determinar la participación de diversos componentes producidos por *A. seminis* en la formación de la biopelícula, se evaluó el efecto de diversos

antisueros: suero de ovino con epididimitis, anti- Fosfoglicerato mutasa (PGM) de *A. seminis* (Montes-García et al., 2018), , anti-Factor de elongación Tu (EFTu) de *G. anatis* (López-Ochoa et al., 2017), anti-hemaglutinina (HA) de *G. anatis* (Montes-García et al., 2016), anti-Omp P2 like de *M. haemolytica* (Montes-García et al., 2018), las proteínas que reconocen estos antisueros, fueron asociadas a la formación de la biopelícula en cada una de las cepas donde se describieron.

Los antisueros anti-*A. seminis* (cepa ATCC), anti-proteínas secretadas de *A. seminis*, anti-matriz de biopelícula de *A. seminis*, y anti-exopolisacárido de *A. seminis* fueron producidos en conejos de acuerdo con la metodología descrita por Montes-García y colaboradores en 2018; brevemente: 200 µg de la muestra se suspendió en adyuvante completo de Freund y se inyectó por vía subcutánea en conejos blancos hembra Nueva Zelanda. Los animales recibieron tres inyecciones de refuerzo de proteínas en adyuvante incompleto de Freund cada 2 semanas antes de tomar muestras de sangre por punción cardíaca para obtener el suero hiperinmune. Se siguieron los lineamientos de la guía oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Como control negativo se usó suero pre-inmune.

Los antisueros fueron adicionados a un pre inoculo con una OD<sub>600</sub> de 0.3 en medio TSB a una concentración final de 1:100. Esta mezcla se colocó en el pozo de la placa de 96 pozos (30 pozos por suero), se incubo por 48h a 37°C, posteriormente se midió la formación de biopelícula por tinción con cristal violeta.

### Efecto de inhibidores de Quórum sensing

Para poder determinar si en la formación de biopelícula de *A. seminis* intervienen mecanismos de comunicación celular (quorum sensing), se evaluó el efecto de dos inhibidores de QS: LED-209 (Curtis et al., 2014) y Furanona C-30 (García-Contreras et al., 2015) a concentraciones de 5 nM y 10 mM respectivamente en placas de 24 pozos, utilizando medio TSB adicionado con 50 µg/ml de rojo Congo, para facilitar la visualización de la biopelícula; se incubo 48 h a 37°C. Para determinar que los cambios en la cantidad de biopelícula no se debían a cambios

en la cantidad de células, se realizó la cuenta viable por dilución del contenido de cada pozo para comparar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en cada pozo.

## Obtención de las fracciones proteicas del cultivo plantónico y de la biopelícula

Se cultivaron las 3 cepas en medio TSB, durante 48h a 37°C después del tiempo de incubación se recuperó el cultivo y se centrifugo a 10 000 rpm para separar la biomasa y el sobrenadante (SN). El SN libre de células, se precipitó con 1 volumen de metanol, en refrigeración, toda la noche. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación 30 min a 10 000 rpm, esta fracción corresponde a las proteínas concentradas.

La biomasa se dividió en tres alícuotas; la primera se re suspendió en PBS y se le adiciono 3% de ácido tricloroacetico (TCA), se mantuvo en agitación por una hora, después se mantuvo en reposo una hora y posteriormente se centrifugo para retirar el sobrenadante, la biomasa se re suspendió en PBS y se sónico por 5 minutos (10 s sonicación 10 s reposo), La suspensión se centrifugó durante 15 min a 13000 g. Las proteínas liberadas, presentes en el SN, se concentraron por precipitación con 1 vol. de metanol, esta fracción corresponde a la fracción enriquecida con probables adhesinas (Rea-Hernández, 2022) (Figuroa-Valenzuela et al., 2022).

La segunda alícuota se re suspendió en PBS-NaCl 2M y se agito vigorosamente durante 15 minutos posteriormente se centrifugo 30 min a 10 000 rpm al SN se le adiciono un volumen de metanol, se mantuvo en refrigeración durante toda la noche y posteriormente se centrifugo a 30 min a 10 000 rpm, para recuperar las proteínas liberadas, considerando esta fracción como proteínas de matriz exopolimérica (Huang et al., 2014)

La biomasa se resuspendió en tampón HEPES 20 mM, pH 7,4, suplementado con 1 mg de lisozima por mililitro. La suspensión bacteriana se incubó 1 hora con agitación y se sonicó durante 5 minutos en hielo (15" encendido/10" apagado, 60 % de amplitud). La suspensión bacteriana sonicada se centrifugó a 13.000 g durante 3 min para recoger las células bacterianas intactas. Una parte del sobrenadante se guardó en una alícuota a la cual se le considero la fracción de extracto total. Continuando con el procedimiento la fase líquida se volvió a centrifugar a 13.000 g durante 30 min. El sedimento se suspendió con HEPES 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1% (concentración final). La suspensión se incubó en agitación durante 2 h y se centrifugó a 13.000 g durante 30 min. El sedimento se lavó con HEPES y se centrifugó durante 2 min. Esta fracción se consideró la fracción enriquecida de proteínas de membrana externa (OMPs) (Figueroa-Valenzuela et al., 2022).

Los procedimientos descritos se realizaron para el cultivo planctónico y con la biopelícula formada en cultivo estacionario

### Separación electroforética de las fracciones proteicas.

Las diferentes fracciones proteicas fueron cuantificadas por el método de Bradford, cada muestra fue separada electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 10% cargando 20 µg por carril. Los patrones de proteínas fueron visualizados por tinción con azul de Coomassie y posteriormente se quitó el exceso de colorante con una solución al 15% de ácido acético y metanol (López-Ochoa et al., 2017)

### Inmunorreconocimiento por Western-blot

Con el fin de determinar si las proteínas obtenidas eran inmunogénicas, se realizaron reconocimientos inmunes usando sueros de borrego con epididimitis, o sueros de conejo anti-proteínas secretadas de *A. seminis*; anti-biopelícula de *A. seminis*, o anti- *A. seminis*, de acuerdo con Núñez-del Arco et al., (2006). La

reacción se determinó usando anticuerpos anti-borrego o anti-conejo marcados con peróxidasa.

## Efecto de carbohidratos sobre la formación de biopelícula

Aunque previamente se ha demostrado que el medio TSB es el más apropiado para la formación de biopelícula de *A. seminis*, este medio contiene glucosa al 2.5%, por lo que para evaluar el efecto de glucosa, fructosa, galactosa o fucosa, a concentraciones de: 0.1, 0.3, 0.5 y 0.7 % p/v, se realizó en medio LB incubado a 37°C y evaluando la formación de biopelícula a las 24 h, el medio TSB únicamente se utilizó para comparar.

## 7.- Resultados

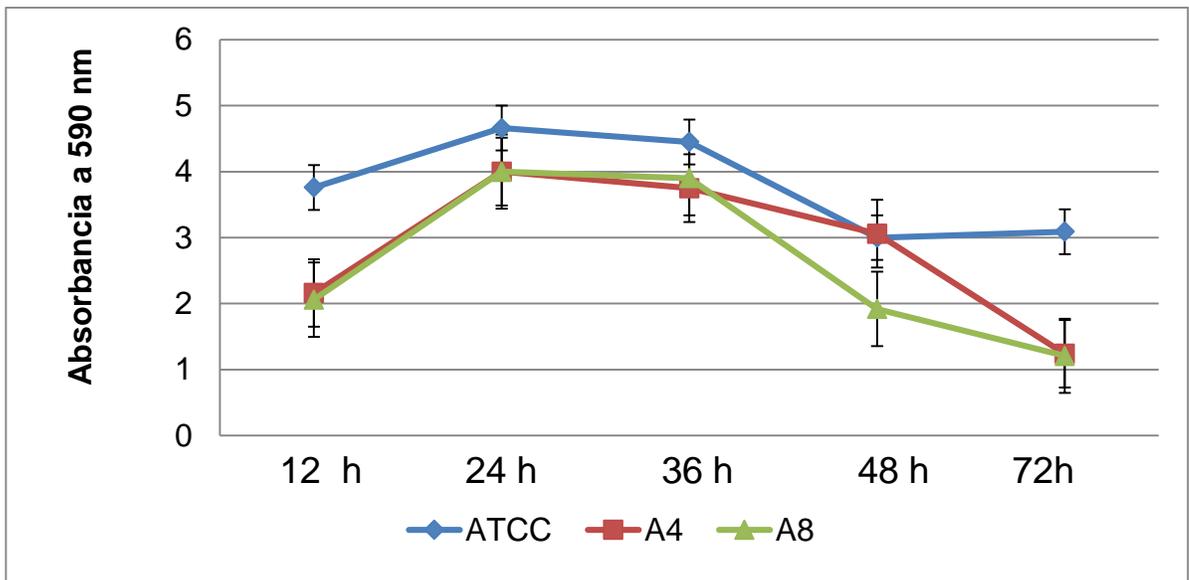
*A. seminis* puede formar una biopelícula a partir de las 24 h a 37°C, en condiciones estacionarias, en cualquiera de los medios probados. Sin embargo, se observó una mayor formación de biopelícula en TSB (Figura 12). La incubación a 40°C afecta esta formación considerablemente, no así la incubación a 30°C.

cepa	RPMI	BHI	TSB	30°C	37°C	40°C
ATCC	0.41	2.0	3.5	2.9	2.9	0.5
A4	0.20	1.5	2.5	1.5	2.4	1.1
A8	0.25	0.75	2.5	2.9	3.5	1.4



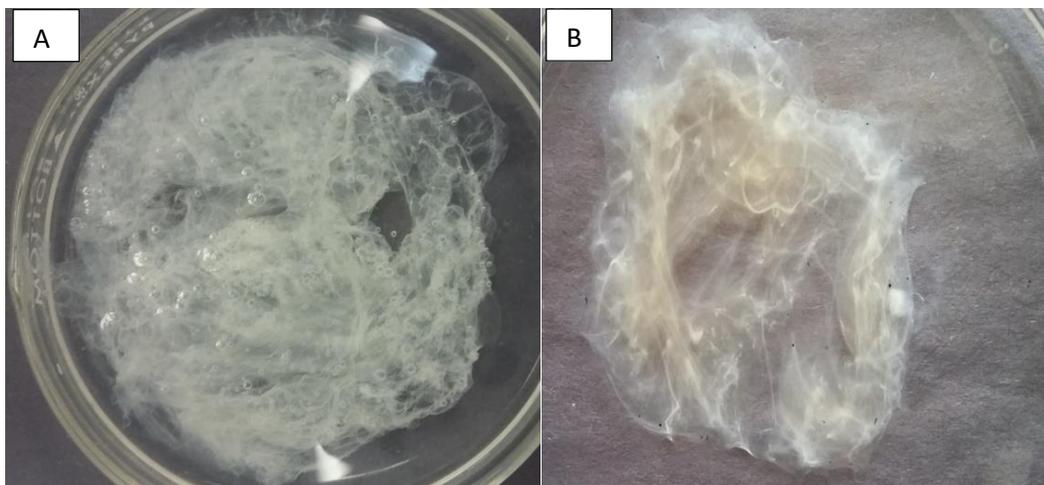
**Figura 12.- Formación de biopelícula por *A. seminis*:** valores de absorbancia del colorante extraído de las biopelículas formadas en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación; se muestran los pozos representativos de la placa donde se formó la biopelícula.

Establecido el medio de cultivo y la temperatura de incubación apropiados, se evaluó la formación de la biopelícula en el tiempo. Se encontró que entre las 24 y 36h de incubación, hay una máxima formación de ésta, pero disminuye a las 48 h, probablemente por desprendimiento de la biopelícula (Figura 13). Las condiciones ideales fueron utilizadas para formar biopelícula en una caja Petri (Figura 14).



**Figura 13.- Formación de biopelícula a lo largo de 72h:** Valores de absorbancia obtenidos de la cuantificación del cristal violeta captado de la formación de biopelícula a través de 48 h de incubación, haciendo lecturas cada 12 horas y una a 72 h.

Las biopelículas formadas en caja de Petri en las condiciones ideales (medio TSB, 37°C, 48 h) presentan una apariencia mucóide para las tres cepas, en la figura 14 se muestran solo la biopelícula de la cepa ATCC y A8.



**Figura 14.- Biopelícula formada en caja Petri de 10 cm en medio TSB, durante 48 Horas a 37°C.** A) Cepa ATCC y B) cepa A8.

Habiendo determinado las condiciones más apropiadas de formación de biopelícula se evaluaron las condiciones consideradas de estrés en el microambiente, encontrando que la condición limitante de hierro, usando 2,2 dipiridyl (0.25mM), favorece la formación de la biopelícula en las 3 cepas, con un incremento de hasta el 25% en comparación con el control. El medio de cultivo adicionado con cloruro de calcio (25 mM) provocó una disminución de más del 50% con respecto a la cantidad de biopelícula formada por el control sin calcio. El pH (5-9), peróxido de hidrógeno (5%) y la microaerofilia no causaron algún cambio en los valores de la cantidad de la biopelícula comparada con el control. Adicionalmente para corroborar que los estímulos evaluados estuvieran afectando la biopelícula directamente y no a la cantidad de células presentes se realizó una cuenta viable de UFC, encontrando cantidades muy similares entre los controles y los tratamientos con  $7.5 \times 10^7 \pm 1.0$  UFC/ml (Figura 15).

La biopelícula de la cepa ATCC que se formó en caja Petri fue procesada para microscopía electrónica de barrido. En las imágenes se puede observar como la biopelícula se arregla de forma radicular, teniendo un relieve que le confiere grosor, en imágenes de mayor aumento de las regiones que parecen raíces principales se puede observar que la mayor parte de la matriz exopolimérica se conforma de fibras en la que se encuentran inmersas las bacterias, esas proyecciones fibrilares tienen su origen en los polos de las bacterias (Figura 16).

Una vez observada la micro estructura de la biopelícula se procedió a evidenciar que tipo de exopolímeros la conformaban, por lo cual se formaron biopelículas sobre cubre objetos que después fueron teñidas con azul Coomassie para proteínas, azul Alcian para carbohidratos y Gel Red para ácidos nucleicos, indicando que en las biopelículas de *A. seminis* están presentes proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos; de estas imágenes se puede observar que el colorante para proteínas tiñe en mayor proporción la biopelícula en comparación con los otros dos colorantes (Figura 17).

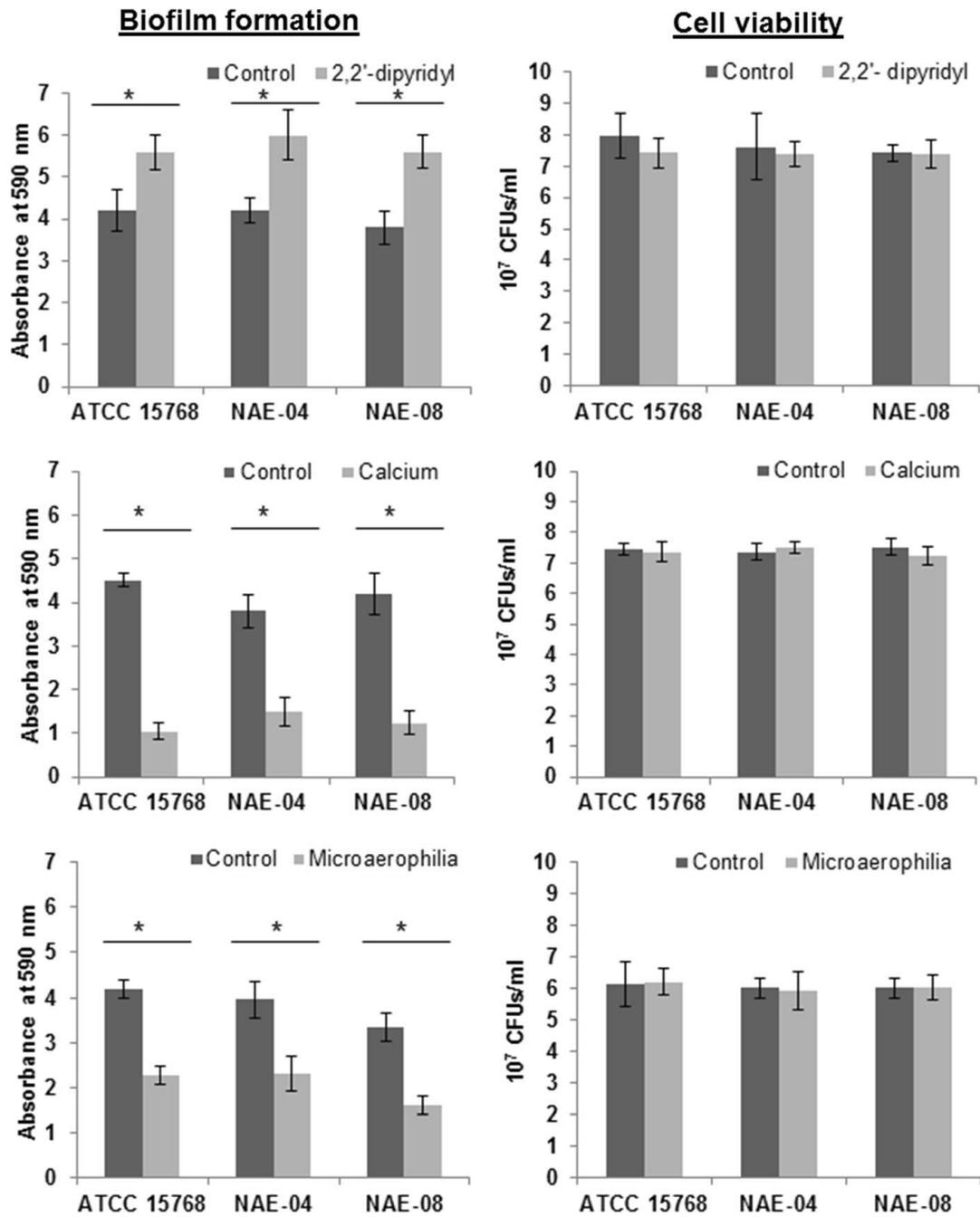
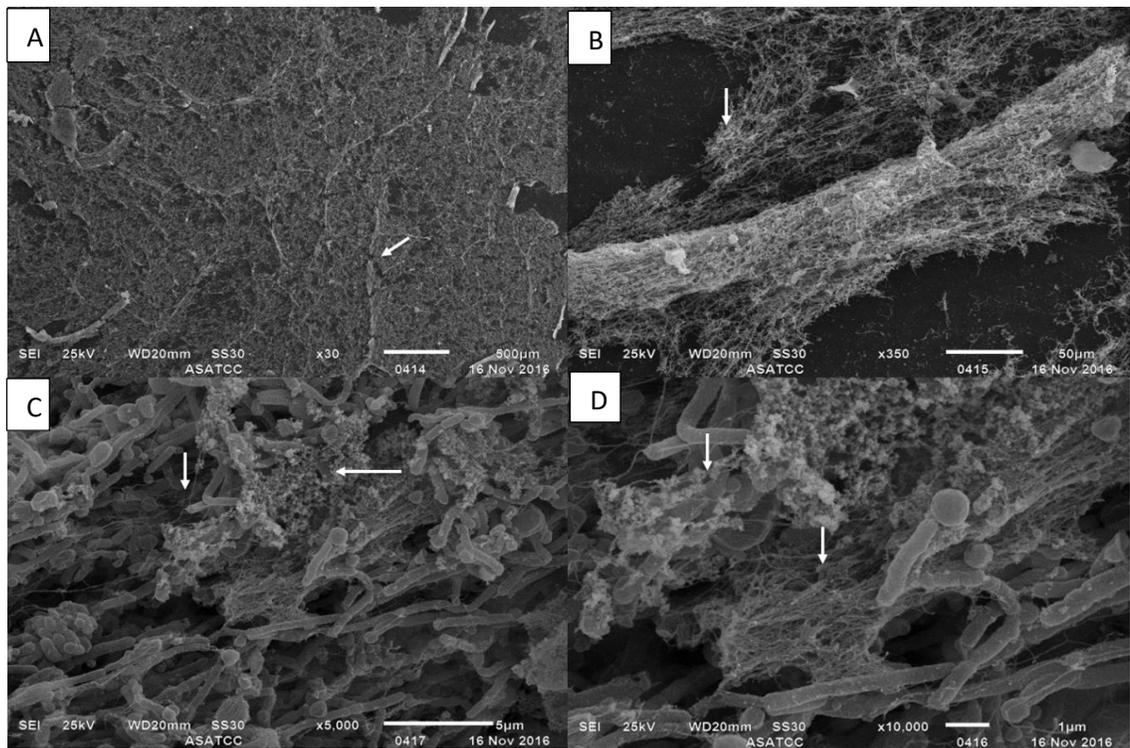
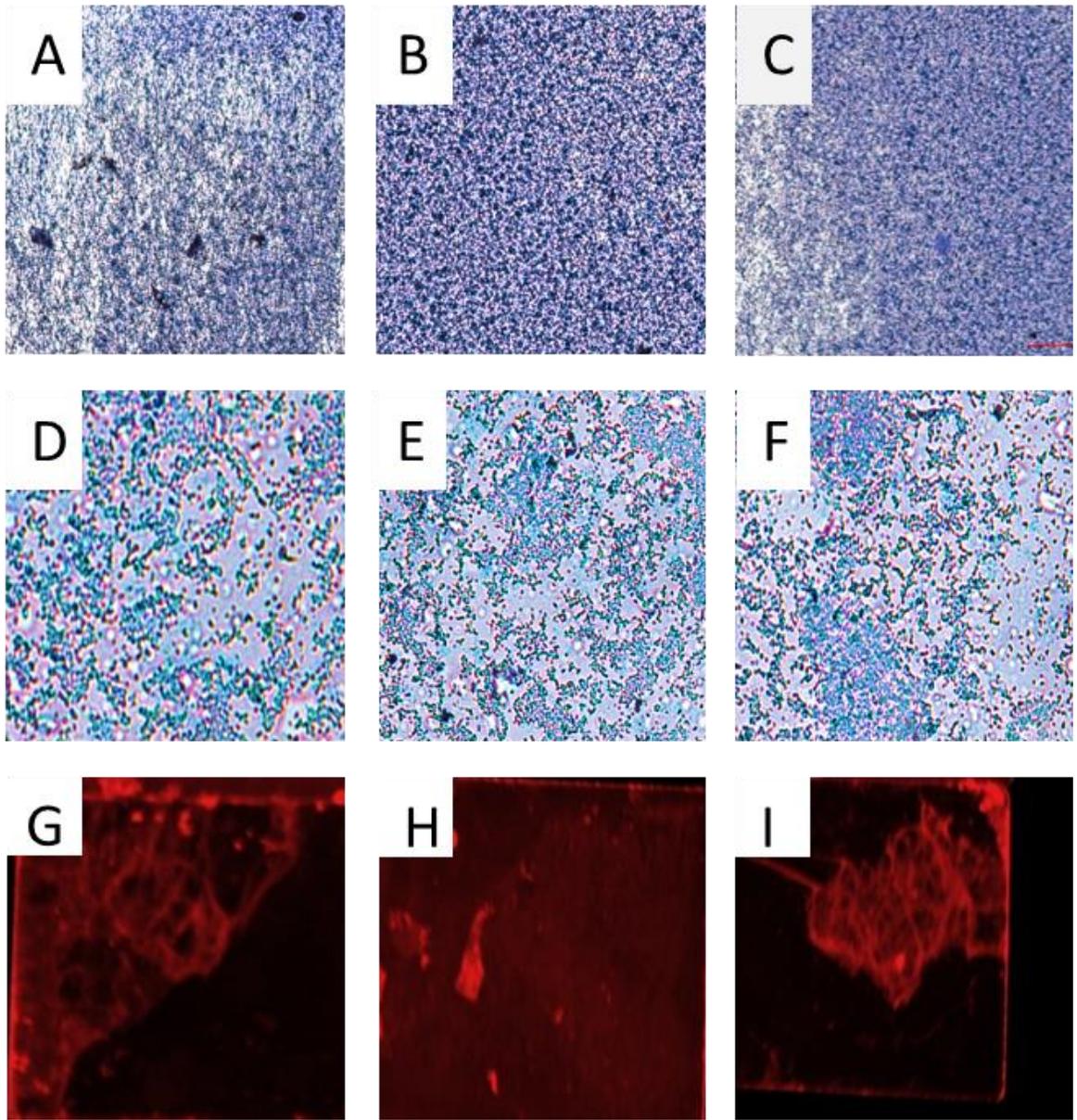


Figura 15.- Efecto de las condiciones de estrés micro ambiental sobre la formación de biopelícula; NAE-04 (cepa A4) y NAE-08 (cepa A8).

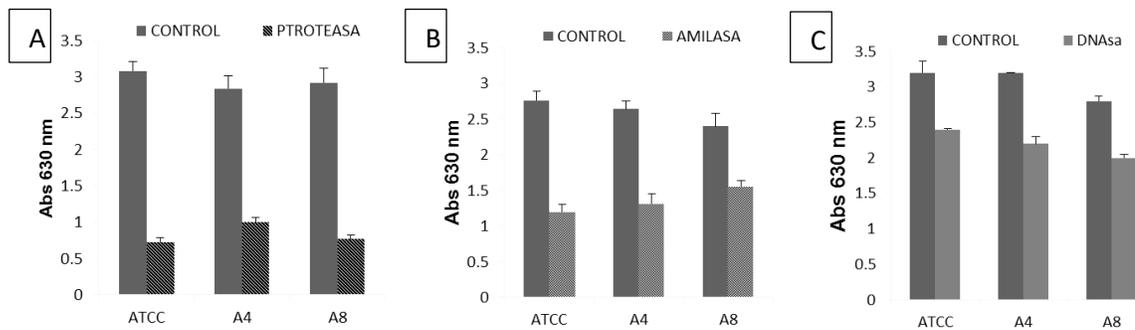


**Figura 16.- imágenes de microscopia electrónica de barrido de la biopelícula formada por *A. seminis* cepa ATCC:** A) vista general de la superficie de la biopelícula la flecha indica que tiene líneas radicales en relieve de mayor grosor, B) la flecha señala la abundante presencia de estructuras fibrilares que conforman la biopelícula, C) y D) se observan a diferentes aumentos que el origen de las estructuras exopoliméricas es en los polos de las bacterias (flechas de figuras C y D)

Para conocer las proporciones relativas de los diferentes exopolímeros presentes en la biopelícula, se planteó probar el efecto de enzimas que degradarían algún grupo de biomoléculas como la proteinasa K que redujo drásticamente la cantidad de biopelícula en las tres cepas, de manera similar al tratamiento con amilasa, y de una manera mínima con DNAsa (Figura 18).

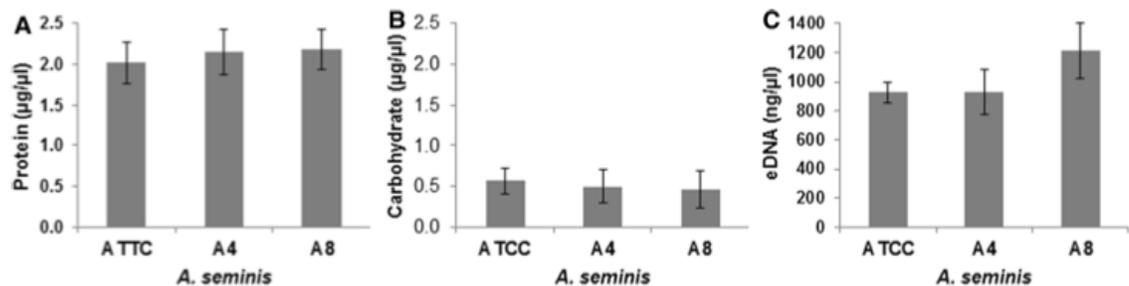


**Figura 17.- Tinción de biopelícula formada sobre cubreobjetos por *A. seminis* ATCC 15768** (A, D y G), A4 (B, E y H) y A8 (C, F e I) tinción con azul de Comassie (A - C); azul Alcian (D - E); observados en microscopio óptico a 20x o Gel Red (G - I); cubreobjetos visto en transiluminador con luz UV.



**Figura 18.- Degradación enzimática de la biopelícula de *A. seminis*:** absorbancias obtenidas de la biopelícula de *A. seminis* después de la degradación enzimática (método cristal violeta); A) digestión con proteinasa K, B) digestión con amilasa y C) digestión con DNAsa I.

Para corroborar que la biopelícula está compuesta en su mayoría por proteínas se procedió a la cuantificación de exopolímeros encontrando que de la matriz exopolimérica recuperada, aproximadamente existen  $2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  de proteína,  $0.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  de carbohidratos y  $1000 \text{ ng} / \mu\text{l}$  de ADN para cada muestra de biopelícula, sin diferencias significativas entre las tres cepas de *A. seminis* (Figura 19).

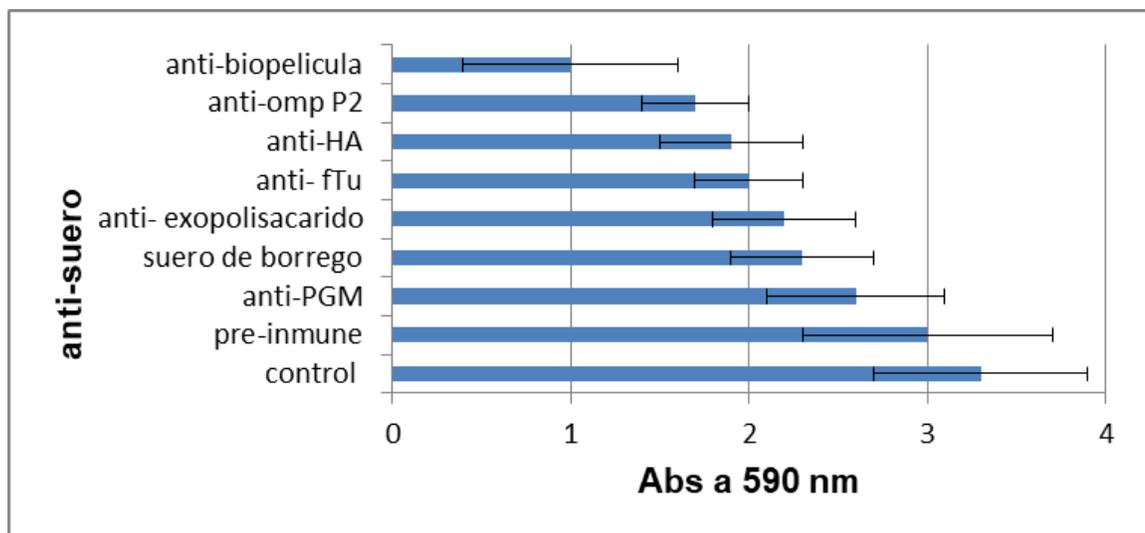


**Figura 19.- Cuantificación de los componentes bioquímicos de la biopelícula de *A. seminis*:** A) proteínas, B) azúcares reducidos y C) ADN exopolimérica

### Efecto de los anti-sueros sobre la formación de la biopelícula.

El bloqueo de la función de algunas proteínas por la presencia de anticuerpos puede afectar el correcto ensamblaje de la biopelícula. Posterior a la incubación de las bacterias en presencia de cada antisuero se encontró que el antisuero

contra la biopelícula de *A. seminis* es la que reduce la mayor cantidad de biopelícula, hasta en un 60%; el antisuero contra OmpP2 like de *M. haemolytica*, una proteína amiloidea asociada con la estructura de la biopelícula producida por este microorganismo, reduce su formación en un 35%, el anti-suero contra una hemaglutinina de *G. anatis* la redujo en un 30%; un valor similar se obtuvo con el anti-suero contra el factor Tu de *G. anatis*; proteína amiloidea presente en la biopelícula y adhesina del mismo microorganismo. Sin embargo, el suero de un ovino con epididimitis, el antisuero contra el exopolisacárido de *A. seminis* y el anti-suero contra PGM de *A. seminis*, que es una adhesina expresada por este microorganismo para adherirse a células epiteliales de riñón, mostraron valores estadísticamente similares al suero pre inmune y al control sin suero (Figura 20).

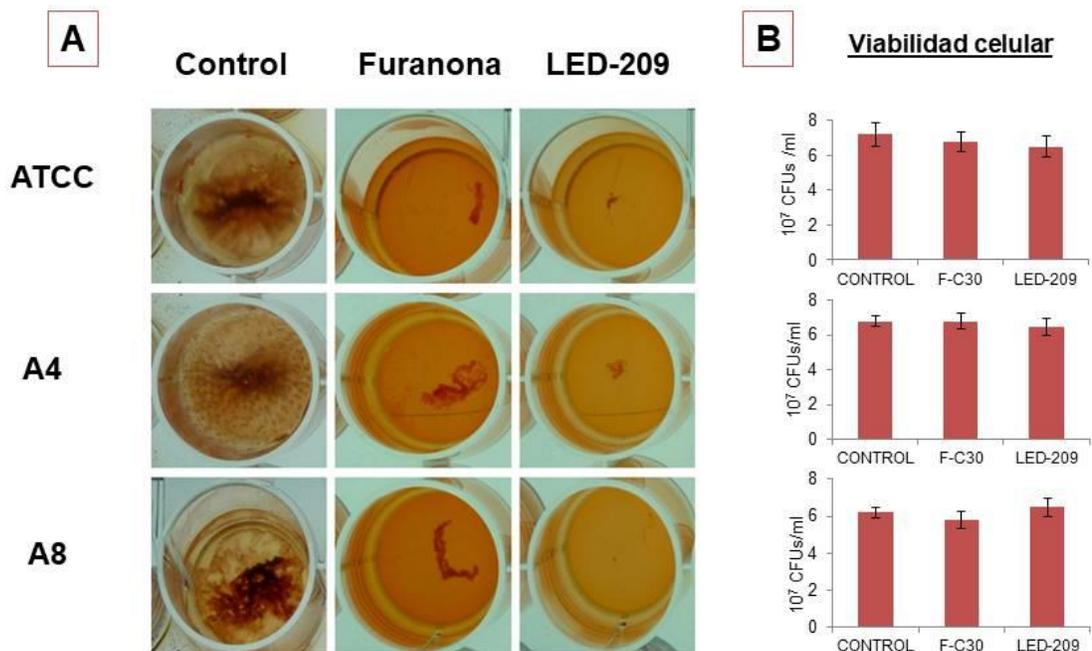


**Figura 20.- Efecto de anti-sueros sobre la formación de biopelícula:** Los datos muestran la absorción de cristal violeta de la biopelícula formada posterior a la incubación.

### Efecto de inhibidores de Quórum sensing

El Quórum sensing es un mecanismo de comunicación celular dado entre poblaciones bacterianas, el cual regula la expresión de factores de virulencia incluida la formación de biopelícula. En este experimento se pudo observar la

inhibición de la formación de la biopelícula de *A. seminis* por la presencia de LED-209 y Furanona C-30 utilizando medio TSB adicionado con rojo Congo, un colorante que se ha utilizado para evidenciar con más facilidad, la formación de biopelícula. Esta disminución no se vio afectada por la cantidad de células presentes, pues el número de éstas no vario significativamente como se puede apreciar en la Figura 21.



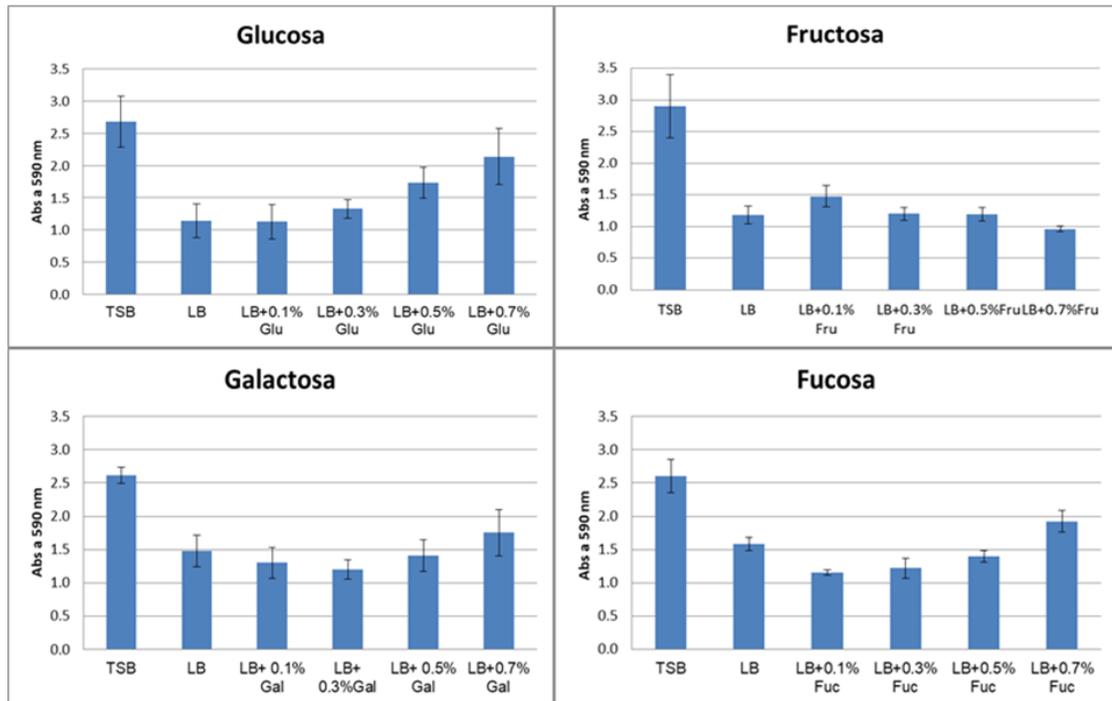
**Figura 21.- Inhibición de la formación de biopelícula por LED-209 Y Furanona C-30: A)**

Evidencia visual de la inhibición de la formación de la biopelícula en presencia de inhibidores de quórum sensing. B) UFC presentes en cada pozo con o sin inhibidor de QS.

### Efecto de carbohidratos sobre la formación de biopelícula.

La fuente de carbono es importante para la formación de una biopelícula, en este ensayo se observa que la glucosa mostro un efecto dosis dependiente siendo la concentración de 0.5% la que supera al control LB sin azucares y se acerca estadísticamente al valor del medio TSB control. Ninguno de los otros

carbohidratos evaluados, excepto fructosa a 0.1%, indujo un incremento diferencial en la cantidad de biopelícula formada (Figura 22). La glucosa a concentraciones de 0.5% induce la formación de la biopelícula en una cantidad similar a la producida en medio TSB. La fucosa a concentraciones de 0.1% disminuye la cantidad de biopelícula en 27 %

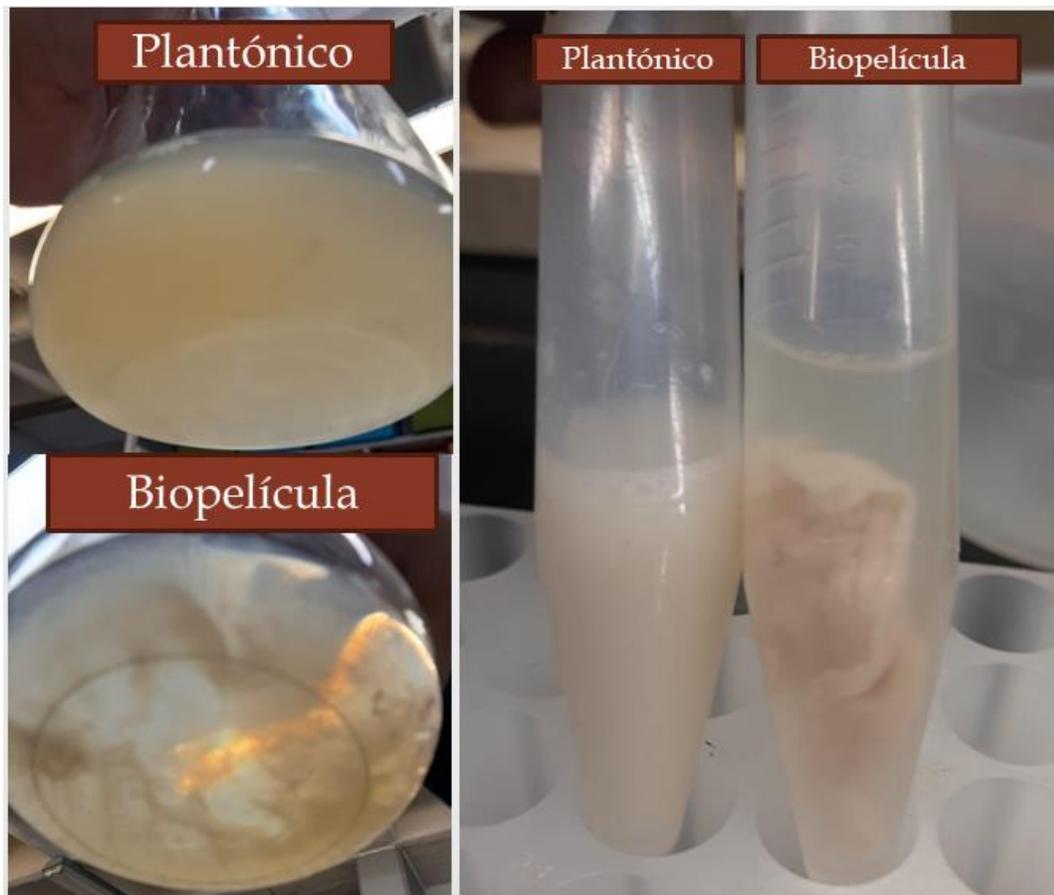


**Figura 22.- Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la formación de biopelícula de *A. seminis*:** se muestran los valores de absorbancia de cristal violeta obtenidos después de la formación de biopelícula.

### Patrón de proteínas

La biomasa de cultivos platónicos y de biopelícula muestran diferencias en la conformación y agregación de las biomásas (Figura 23); esta expresión cambia drásticamente durante la formación de biopelícula en comparación con el crecimiento platónico de *A. seminis*. Los patrones de proteínas obtenidos por los diferentes procedimientos, muestran cambios en todas las muestras analizadas de

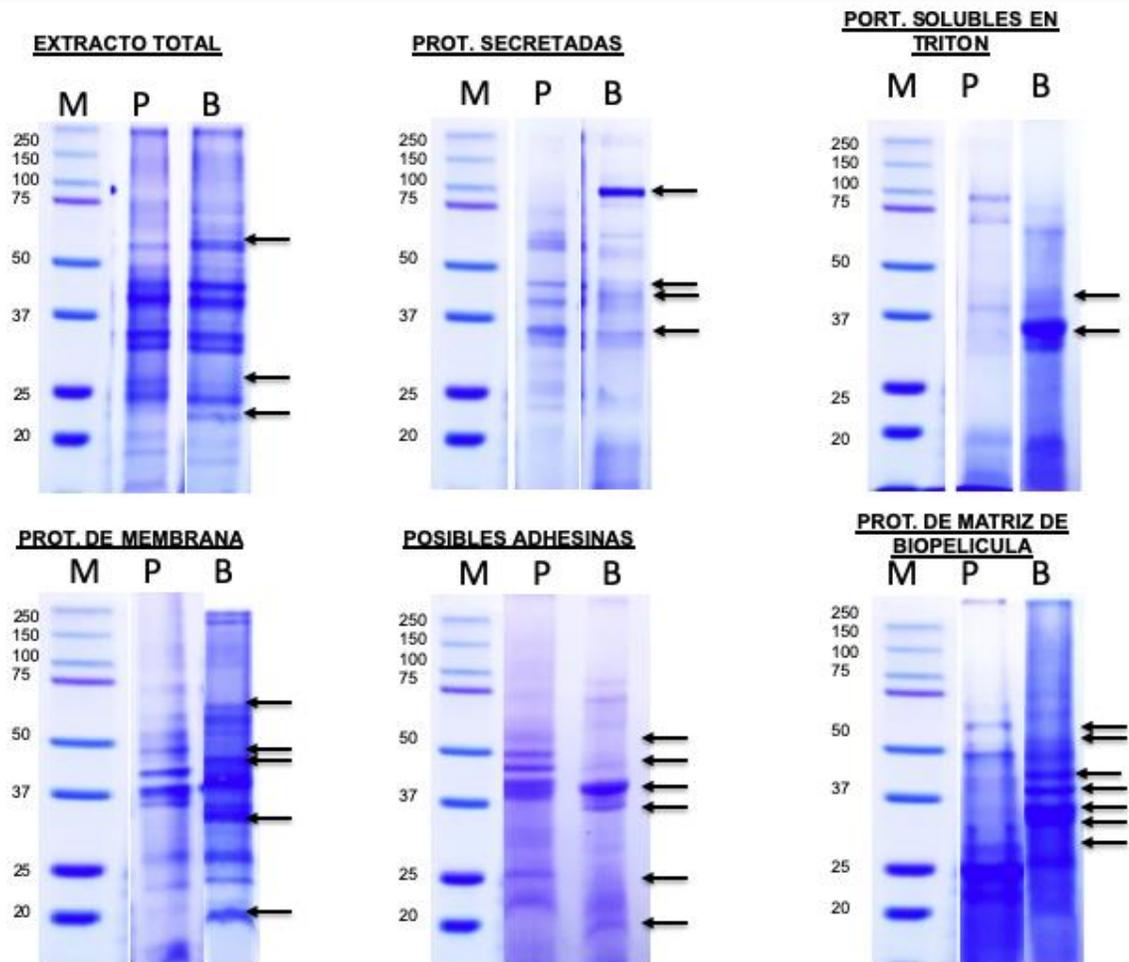
cultivos plantónicos y su comparación con la respectiva muestra de biopelícula (Figura 24). Los patrones de proteínas totales muestran la sobreexpresión de una proteína de 55 kDa en la muestra de extracto total, también se observa la ausencia de una banda de 25 kDa y la expresión de una banda de 23 kDa. En la fracción de proteínas secretadas de la biopelícula, se aprecia la presencia de una proteína de 100 kDa, ausente en la fracción soluble del cultivo planctónico



**Figura 23.- Aspecto de la biomasa de la biopelícula de *A. seminis*:** cultivos plantónicos y de biopelícula de *A. seminis* cepa ATCC cultivados en matraces de fondo plano y la biomasa recuperada en solución PBS previo a la centrifugación.

En la fracción de proteínas solubles en tritón X100 se pueden ver dos proteínas de 35 y 40 kDa en las muestras obtenidas de la biopelícula. En la fracción de Omps, se observaron 5 proteínas insolubles en tritón, y dos proteínas solubles en tritón

de 35 y 40 kDa, en la muestra de biopelícula, pero ausentes en la muestra del cultivo planctónico. En el patrón de probables adhesinas encontramos principalmente una banda de aproximadamente 40 kDa en ambas muestras, pero en la muestra del cultivo planctónico también se aprecian dos bandas de aproximadamente 45 y 50 kDa (Figura 24).



**Figura 24.-** Patrones de proteínas en Geles SDS-PAGE 10% de la biopelícula y del cultivo planctónico de *A. seminis*: Se muestra de forma comparativa los patrones de proteínas obtenidos de diferentes procesos de extracción de proteínas, las flechas señalan cambios evidentes en los patrones como ausencia, presencia o aumento en la expresión de las proteínas. M: marcador de peso molecular (kDa). P: cultivo planctónico, B: biopelícula

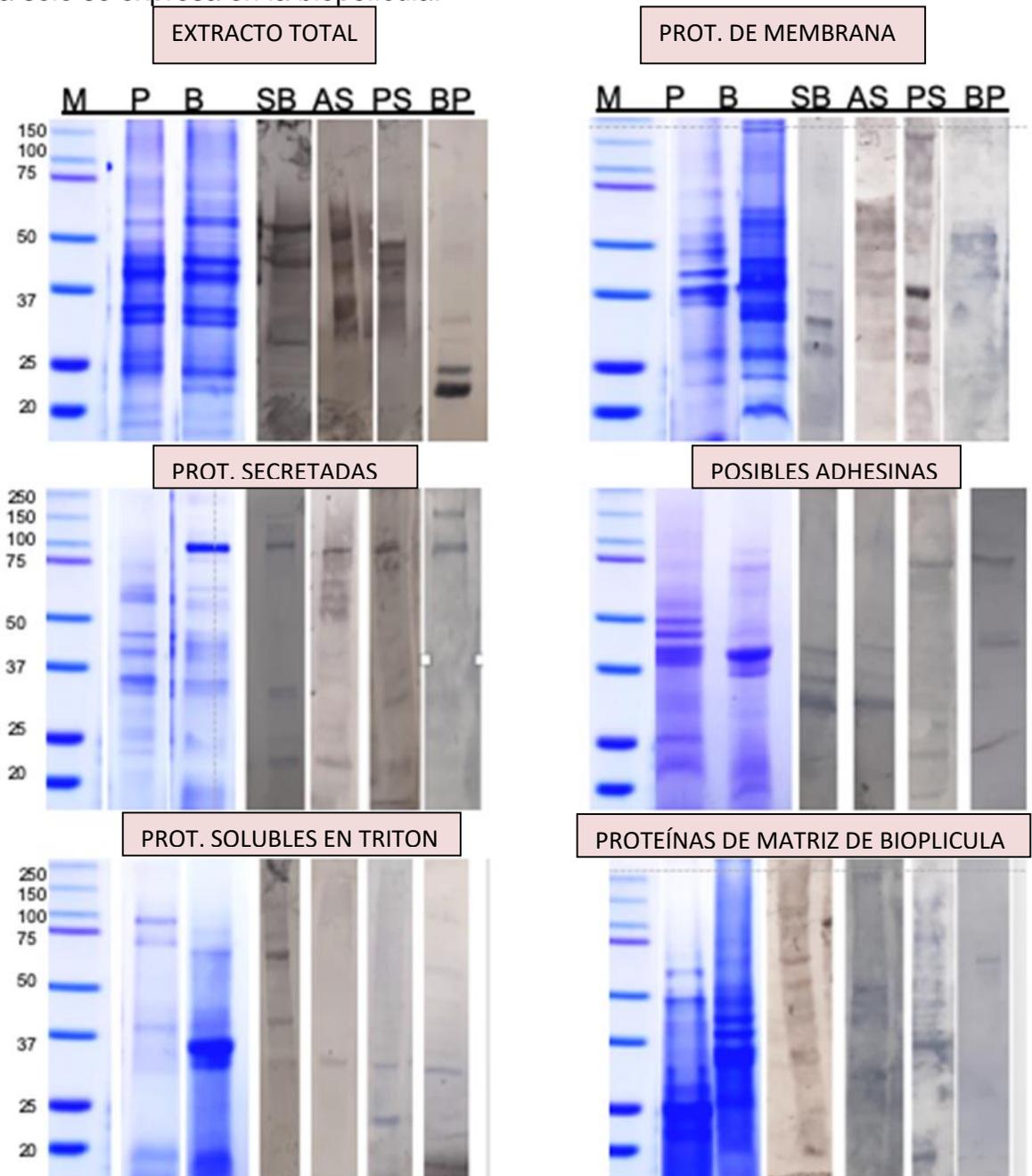
## Inmunorreconocimiento

Con el fin de determinar si las proteínas presentes en la biopelícula eran inmunogénicas, se utilizaron las diferentes fracciones obtenidas de la biopelícula y se pusieron en contacto con los diferentes antisueros. Todas las fracciones permitieron visualizar bandas de proteínas inmunogénicas. A excepción de las muestras de proteínas secretadas en que todos los sueros reconocieron una banda de aproximadamente 100 kDa y una banda de aprox. 35 kDa en la fracción soluble en tritón, los patrones de reconocimiento inmune son muy variados en todas las fracciones evaluadas. Sin embargo, es posible el observar bandas de reconocimiento únicas en muestras de biopelícula, como la banda de 35 KDa en la fracción de proteínas de membrana externa. En la fracción de extracto total se reconocen dos proteínas de bajo peso; una de ellas, menor a 25 KDa, solo se expresa en la biopelícula.

El suero de conejo anti-*A. seminis* (AS), reconoció 23 proteínas en total, la mayoría en el extracto total, proteínas de membrana externa y matriz de biopelícula, en la fracción de tritón solo reconoció una proteína de 35 KDa. El suero anti-proteínas secretadas de *A. seminis* (PS) se generó partir de muestras de cultivos plantónicos, sin embargo, reconoce proteínas secretadas de la biopelícula, en especial una proteína de 100 KDa que se expresa únicamente en biopelícula y también reconoce una proteína de 25 KDa que solo se expresa en la fracción de tritón.

El suero anti-biopelícula de *A. seminis* se realizó con toda la biomasa obtenida después del cultivo como se muestra en la figura 1, se muestra un bajo número de proteínas reconocidas en cada una de las fracciones, es interesante que las proteínas obtenidas de la matriz de la biopelícula no muestren inmunogenicidad con el suero anti-biopelícula solo en una banda de 40 KDa, la proteína secretada de 100 KDa también es reconocida por este suero y una muy marcada de 35 KDa en la fracción de proteínas de membrana externa. Por ultimo en la fracción de

extracto total se reconocen dos proteínas de bajo peso una de ella menor a 25 kDa solo se expresa en la biopelícula.



**Figura 25.- inmunorreconocimiento de las fracciones proteicas de la biopelícula de *A. seminis*:** Inmuno reconocimiento con suero de borrego con epididimitis (SB), anti- *Actinobacillus seminis* (AS), anti-proteínas secretadas de *A. seminis* (PS) y anti-biopelícula de *A. seminis* de las fracciones obtenidas de cultivo plantónico y de biopelícula (BP): se muestran las fracciones en el

mismo orden de la figura 24, los inmuno reconocimientos corresponden solo a las fracciones obtenidas de la biopelícula.

## 8.- Discusión

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *A. seminis* para producir biopelícula en tres medios de cultivo diferentes, encontrando mejores condiciones en medio TSB incubado a 37 °C durante 48 h (figura 12). La producción de la biopelícula se vio afectada por iones de calcio, hierro y microaerofilia, o por incubación previa de *A. seminis* con sueros contra adhesinas o componentes de la matriz de la biopelícula. La cantidad de biopelícula formada por un microorganismo patógeno de humanos o de animales puede ser variable pero una cantidad de biopelícula alta no está necesariamente asociada con una mayor virulencia como se ha descrito en un estudio comparativo entre las cepas avirulentas de *Haemophilus parasuis* que producen mayores cantidades de biopelícula en comparación con las cepas virulentas, lo que sugiere que las biopelículas podrían ayudar a que las cepas avirulentas persistan más tiempo en el tracto respiratorio superior de los cerdos (Bello-Ortí et al., 2014), aunque los mecanismos específicos de persistencia aún no han sido dilucidados. Por el contrario, una mayor cantidad de biopelícula producida por una cepa virulenta de *Histophilus somni* podría ser ventajosa para las cepas que causan infecciones sistémicas (Sandal et al., 2007). Se ha descrito que la formación de biopelículas en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, varía según las condiciones de crecimiento o la fuente de medio de cultivo utilizada (Labrie et al., 2010); y no está relacionada con la virulencia entre las cepas (Pereira et al., 2018). En el caso de *A. seminis* la cantidad de biopelícula es similar entre la cepa de referencia y los aislados de campo. Sin embargo, que no existan diferencias entre las cepas con respecto a la formación de biopelícula no puede ser atribuida a diferencias en su virulencia, pues esta no ha sido evaluada.

El efecto de diferentes factores de estrés, como las condiciones de hierro, en la formación de biopelículas varía según el organismo. En *Staphylococcus coagulasa* negativo, la restricción de hierro reduce la cantidad de la biopelícula formada y la desestabiliza si la quelación del hierro se combina con antibióticos (Coraça-Huber et al., 2018). Sin embargo, en *Haemophilus*, la restricción de hierro induce un aumento en la producción de biopelícula (Szelestey et al., 2013), similar a lo descrito en este estudio para *A. seminis* (figura 15).

La adición de calcio al cultivo de TSB dio como resultado una disminución de la formación de biopelícula de *A. seminis* (figura 15). La presencia de calcio en los ensayos de formación de biopelículas reportado en diferentes estudios tiene resultados contradictorios. En *S. aureus*, el calcio induce la reducción del espesor de la biopelícula; sin embargo, en *P. aeruginosa*, la presencia de calcio produce mayor masa de biopelícula, concentración de polisacáridos extracelulares y adhesión (Sarkisova et al., 2005; Sukhla y Rao 2013; Kannan et al., 2016). Curiosamente, la modificación de la producción de biopelículas de estos microorganismos parece no alterar el crecimiento bacteriano; resultados similares fueron observados con *A. seminis*, y la disminución en la formación de biopelículas no se atribuyó a la disminución del crecimiento bacteriano. En *S. aureus* se encontró que la reducción de la biopelícula no se debe a la presencia de calcio que pudiera formar complejos entre el calcio y los nutrientes esenciales o a una reducción en el crecimiento bacteriano, sino que el efecto podría deberse más bien a un proteoma alterado (Shukla y Rao 2013). Se ha descrito que las fluctuaciones de la concentración de calcio afectan la fisiología de diferentes organismos, incluidas las bacterias (Sarkisova et al., 2005). La formación de biopelículas de *A. seminis* podría verse afectada por un proceso similar al descrito para *S. aureus*.

En *Neisseria gonorrhoeae*, el oxígeno es esencial para las interacciones pilus tipo IV (Dewenter et al., 2015). En este microorganismo se ha sugerido que bajas concentraciones de oxígeno inducen una mayor producción de biopelículas en

diferentes microorganismos; sin embargo, en *A. seminis* se observó una menor producción de biopelícula con respecto al control en condiciones normales (Figura 15). En *A. seminis*, se desconocen las implicaciones del bajo nivel de oxígeno en su entorno para la formación de biopelículas, pero podría estar ocurriendo de manera similar a *N. gonorrhoeae*, ya que se han identificado genes que codifican pilus tipo IV en el genoma de *A. seminis*.

La biopelícula producida por *A. seminis* se ve afectado negativamente por los iones de hierro y calcio, las concentraciones ambientales de oxígeno, así como por la temperatura y la composición del medio de cultivo; sin embargo, su producción podría conferir ventajas clave a esta bacteria, permitiéndole persistir en los tejidos del huésped y, en condiciones apropiadas, causar enfermedades.

La ultra estructura de la biopelícula de *A. seminis*, evidenciada por microscopia electrónica de barrido, muestra una forma radicular con abundantes fibras en las que las células se encuentran embebidas y se puede apreciar a bajo aumento algunas estructuras radiculares de mayor grosor en comparación con el resto del tapete microbiano, comparando con datos de estudios similares en otros modelos microbianos como el de *P. aeruginosa* donde se describe la biopelícula con forma mucoide y de elevado espesor donde es difícil apreciar a las células bacterianas, en este modelo además se ha descrito que su composición principal es de exopolisacárido, podría considerarse que el exopolímero predominante da forma a la arquitectura de la biopelícula (Tielen et al., 2005). La forma radicular de la biopelícula, compuesta principalmente por proteínas, también fue descrita en *M. haemolytica* (Boukahil y Czuprinsky 2015).

Los exopolímeros de biopelículas se producen en diferentes proporciones dependiendo de los microorganismos involucrados. Estos exopolímeros se han visualizado sobre la biopelícula utilizando colorantes afines a las propiedades bioquímicas de cada biomolécula (figura 17). La biopelícula de *B. subtilis* comprende principalmente dos componentes: exopolisacáridos y TasA (Dragos et

al. 2018). Las biopelículas de *H. somni* contienen exopolisacáridos como componentes principales (Petruzzi e Inzana 2016). Por el contrario, las biopelículas de *M. haemolytica* parecen estar compuestas principalmente de proteínas (Boukahil y Czuprinsky 2015). Al igual que *M. haemolytica*, las proteínas parecen ser el componente principal de las biopelículas de *A. seminis* (Figura 18 y 19).

Se ha descrito que las proteínas adhesinas son importantes para que las bacterias inicien la formación de biopelículas. Estas proteínas facilitan la adhesión bacteriana, uniendo las células tanto a las superficies inertes como a las células huésped. Una vez que las células bacterianas se adhieren, podrían secretar sustancias exopoliméricas para formar la biopelícula bacteriana (Boukahil y Czuprinsky 2015). La inhibición de la formación de biopelículas de *A. seminis* por los diferentes antisueros (Figura 20) respalda la relevancia de las adhesinas para la formación de biopelículas de *A. seminis*; la digestión enzimática de los componentes de la biopelícula confirma que las proteínas son el principal componente polimérico (Figura 18). La inhibición de la formación de biopelículas con los antisueros previamente incubados podría deberse a un efecto bloqueador de las proteínas de la superficie bacteriana y no a la muerte de las células bacterianas ya que los antisueros presentaron diferentes porcentajes de inhibición de la formación de biopelículas y el suero pre inmune no afectó esta inhibición.

Además, la reactividad cruzada entre anti-EF-Tu de *G. anatis* (López-Ochoa et al., 2017) y anti-OMP2-like de *M. haemolytica* (Montes-García et al. 2018b), dos proteínas de tipo amiloide, sugiere la posible presencia de proteínas de tipo amiloide en las biopelículas de *A. seminis*. El tinte rojo Congo tiñó la biopelícula y esta es una característica utilizada para poner evidencia la presencia de las proteínas amiloides, lo que respalda la sugerencia antes mencionada. La inhibición de la formación de biopelículas por los sueros anti-adhesina de *A. seminis* (Montes-García et al. 2018a) y por anti-hemaglutinina de *G. anatis* (Montes-García et al. 2016) sugiere que las proteínas adhesinas forman parte de

la biopelícula de *A. seminis* de manera a como fue descrito en la composición de la biopelícula de *M. haemolytica* (Boukahil y Czuprynski 2015), en el que se describió la participación de OmpA, una proteína que además de ser una porina, participa en diferentes funciones, incluida la adhesión (Figuroa-Valenzuela et al., 2022) (Figura 20).

La formación de una biopelícula ha sido descrita como un proceso en el cual se requiere una comunicación celular (quorum sensing). Proceso que ha sido demostrado con el uso de inhibidores de quorum sensing (García-Contreras et al., 2020). Un ejemplo de la participación de QS en la formación de biopelícula se describe en *Streptococcus*, donde al inhibir el QS con furanona C-30 a 6  $\mu\text{M}/\text{ml}$  es posible reducir hasta en un 60% la formación de la biopelícula (He et al., 2012). En este estudio, observamos que 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$  de furanona C-30 o 5 nM LED-209 inhibían completamente la formación de biopelículas de *A. seminis* (Figura 21). La furanona interactúa con la proteína reguladora R en el sistema LuxIR, un sistema bacteriano de fosforilación de dos componentes, que participa en la respuesta bacteriana de detección de quórum a través de lactonas de homoserina, como moléculas autoinducidas (AI), así como en diversos fenotipos como bioluminiscencia, virulencia, esporulación, adhesión y formación de biopelículas (Jang et al., 2013). En el caso de LED-209, es un pro fármaco que interactúa específicamente con el receptor bacteriano QseC, una histidina quinasa unida a la membrana, que responde a las hormonas del estrés del huésped, como la epinefrina, la norepinefrina o la señal bacteriana AI-3. Muchos patógenos bacterianos aprovechan la cascada de señalización de QseC para promover la virulencia. La molécula LED-209 modifica alostéricamente las lisinas en QseC al alterar su función y evitar la activación de genes que codifican factores de virulencia (Curtis et al., 2014).

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente la presencia de un sistema LuxIR funcional y un receptor QseC dentro del genoma de *A. seminis*. Sin embargo, la búsqueda de un sistema LuxIR o receptor QseC dentro de la secuencia del

genoma de *A. seminis* no produjo un resultado positivo, lo que sugiere la presencia de otras secuencias genéticas con una función similar. Los genes *Isr* se han descrito como genes funcionales para el sistema LuxS en *S. entérica* serovar *tiphymurium* (Taga et al., 2001); Los genes *Isr* están presentes en el genoma de *A. seminis* (Negrete-Abascal et al., 2018). Por lo que un próximo proyecto podría basarse en determinar si los genes *Isr* son en realidad los responsables de controlar esta respuesta.

El efecto de LED-209 o furanona C-30 sobre la inhibición de la biopelícula de *A. seminis* es específico y no se debió a una inhibición del crecimiento del cultivo celular, como se ha descrito en otros microorganismos. La inhibición de la formación de biopelículas por LED-209 sugiere que *A. seminis* puede interactuar con su huésped a través de la detección de catecolaminas (Curtis et al., 2014; Weigel y Demuth 2016); Los inhibidores de QseC podrían considerarse como un enfoque anti virulento para patógenos gramnegativos y, en particular, para *A. seminis*.

La adhesión bacteriana a las superficies está influenciada por las propiedades fisicoquímicas del medio ambiente y la superficie de adhesión, así como por las características de la superficie celular bacteriana (Di Bonaventura et al., 2008). *A. seminis* forma biopelícula no solo sobre vidrio, también sobre plástico, una superficie hidrofílica y con carga negativa, así como sobre poliestireno, que es una superficie hidrofóbica. Esto sugiere que *A. seminis* interactúa con las superficies a través de diferentes componentes de la superficie celular, incluidas las adhesinas y las fimbrias, entre otras moléculas. En las cepas de *Salmonella*, se forma significativamente más biopelícula sobre poliestireno que sobre una superficie de vidrio, si expresan fimbrias y celulosa (Jain y Chen 2007), en comparación con las cepas que no expresan uno o ambos de estos componentes. En *A. seminis* la capacidad de formar biopelículas en ambas superficies es un indicador de la posible expresión de variadas proteínas con propiedades adherentes como se puede observar en el patrón de proteínas de la figura 24.

*S. mutans* es una bacteria presente en la microbiota de la placa dental, en condiciones de excesiva proliferación de este microorganismo en forma de biopelícula, esta contribuye a la desmineralización de los dientes en humanos, dando lugar al desarrollo de caries, se ha descrito que la fuente de carbono, mientras pueda ser metabolizada, ayuda a *S. mutans* a formar una biopelícula robusta y con exceso de dextrano y provoca la acidificación del microambiente por la fermentación de las fuentes de carbono (Paulino et al., 2004), para *A. seminis*, se probó el efecto de cuatro fuentes de carbono (glucosa, lactosa, fructosa y Fucosa), estas moléculas se encuentran presentes en el líquido seminal del rumiante siendo la fructosa la que se encuentra en concentraciones altas en comparación con la glucosa (Oliveira et al., 2015).

Bajo la idea de que la fructosa podría ser un factor de inducción de biopelícula se comparó con la glucosa que está presente en los medios de cultivos probados, encontrando que contrario a lo que se esperaba, la presencia de fructosa no favorece la formación de la biopelícula como se aprecia en la gráfica donde las diferencias no son estadísticamente significativas, aunque se muestre un ligero aumento en la concentración de 0.1% de fucosa (figura 22), en *S. aureus* se tiene evidencia que la fructosa favorece la unión de la biopelícula a superficies nano rugosas inertes (Durmus et al., 2012). Con respecto a esto en *A. seminis*, al tener predilección por colonizar el aparato reproductor de machos en especial la región del epidídimo, órgano encargado de formar el líquido seminal donde se embeberán los espermatozoides para madurar, es sabido que el líquido seminal contiene fructosa que utiliza el esperma para obtener energía para mantener el vigor de la movilidad, la posibilidad de que en este microambiente *A. seminis* podría utilizar esta fuente de carbono para formar biopelícula, sin embargo no fue así, siendo la glucosa la fuente de carbono que favorece la formación de biopelícula, resultados similares se vieron en *P. aeruginosa* donde la formación de biopelícula fue dosis dependiente al aumento de glucosa en el medio, esto está relacionado con la sobreexpresión de exopolisacáridos, que además favorecían la

resistencia contra antibióticos de amplio espectro (She et al., 2019), es posible que la presencia de glucosa en concentraciones más altas que el medio TSB, cambien la composición de la biopelícula de *A. seminis*, sería interesante abordado más a fondo este efecto.

Las bacterias se organizan en una variedad de estados colectivos, en el que se sabe que existe una diversificación fenotípica en una película mono especie, al formar una biopelícula, las propiedades fisicoquímicas cambian su estructura y su comportamiento mostrando en la mayoría de bacterias un cambio de hidrofobicidad (Worlitzer et al., 2022), en *A. seminis*, la biopelícula muestra agregados altamente densos y con propiedades hidrofóbicas al ser concentradas en PBS, donde se observa la dificultad de disolver la biopelícula y esta se mantiene en forma de una nata densa (figura 23).

Una biopelícula se puede definir como una comunidad sésil de células bacterianas que están incrustadas en una matriz de sustancia polimérica extracelular. Aunque los exopolisacáridos son componentes esenciales de la matriz de la biopelícula, estudios recientes revelaron que las proteínas expuestas en la superficie bacteriana probablemente desempeñen un papel importante en el desarrollo de la biopelícula. (Cucarella et al., 2001).

En *S. aureus* los cambios en proteínas expresadas durante la formación la biopelícula, en comparación con las expresadas durante el crecimiento plantónico, fueron identificadas y agrupadas en proteínas asociadas a metabolismo, a adhesión a superficies y a degradación de la biopelícula (Cincarova et al., 2016), este estudio deja en evidencia la importancia del estudio de las proteínas que forman parte de una biopelícula.

En el análisis de la composición proteica de la biopelícula elaborada por *A. seminis* se encontraron cambios en los patrones de proteínas en las diferentes fracciones obtenidas de la biopelícula (figura 24). Estos resultados nos hablan de una complejidad, en la composición de la biopelícula de *A. seminis*, semejante a la

descrita para *S. aureus* (Cincarova et al., 2016). Los cambios más abundantes en el patrón de proteínas de la biopelícula y el crecimiento planctónico de *A. seminis* se evidencian mejor en la fracción de la matriz de la biopelícula, seguida de la fracción de Omps, como puede observarse en la figura 24. Aunque cabe decir que en todas las fracciones hubo diferencias, las implicaciones que esto tenga en relación a la formación de la biopelícula o incluso su relación con la virulencia no es clara, un abordaje más profundo al estudio de las proteínas de la biopelícula arrojará luz a la comprensión de esta forma de vida en *A. seminis*.

Wang y colaboradores, en 2012, analizaron las diferencias en las expresiones de proteínas de células enteras de *Streptococcus suis* cultivadas en condiciones de biopelícula o planctónicas. Ellos identificaron trece proteínas, que mostraron expresión diferencial en condiciones de crecimiento planctónico respecto a las de biopelículas. De las 13 proteínas, seis proteínas estaban reguladas al alza y siete proteínas estaban reguladas a la baja en el proteoma de la biopelícula. Estudios similares se han realizado en diferentes modelos microbianos formadores de biopelículas como: *Acinetobacter baumannii* (Shin et al., 2009), *Bacillus cereus* (Oosthuizen et al., 2002), *Campylobacter jejuni* (Kalmokoff et al., 2006), y *Streptococcus mutans* (Svensater et al., 2001) en estos trabajos se menciona que la identidad de las proteínas estaba relacionada con flagelos y adhesinas fimbriales y no fimbriales, así como proteínas amiloides, no exceptuando a proteínas relacionadas con la dispersión de la biopelícula, como las proteasas en la biopelícula de *Vibrio cholerae* (Jemielita et al., 2021). A la fecha no existe un estudio de proteínas inmunogénicas expresadas por *A. seminis*, excepto las adhesinas no fimbriales (Montes-García et al., 2018) y una proteína GroEL identificada como hemaglutinina, reportadas por nuestro grupo de investigación (Montes-García et al., 2019). Previamente, se reportó la presencia de algunas proteínas inmunogénicas en vesículas de membrana liberadas por *A. seminis*, pero sin haber llegado a ser identificadas (Núñez-del Arco et al., 2006).

Los resultados muestran el reconocimiento de proteínas inmunogénicas en las diferentes fracciones de la biopelícula (figura 25), siendo las reconocidas por suero de borrego con signos de epididimitis por *A. seminis* las que podrían estar estrechamente relacionadas con la patogenicidad, debido a que si son reconocidas por este suero es porque en el proceso de enfermedad despertaron una respuesta inmune en el animal. Fueron en total 15 proteínas reconocidas por el suero anti-biopelícula, lo que sugiere que son proteínas posiblemente presentes en la superficie de la biopelícula o en la matriz exopolimérica, recordando que el primer paso de la formación de la biopelícula es la adhesión es probable que también se encuentren posibles adhesinas.

El reconocimiento inmune de diferentes proteínas observado con el uso de diferentes antisueros abre una nueva línea de investigación para continuar estudiando los componentes de la biopelícula de *A. seminis*. Ésta podría permitir identificar alguna(s) moléculas que permitieran controlar la epididimitis causada por *A. seminis*, a través de una vacuna o establecer una herramienta diagnóstica, hasta ahora inexistente.

La forma de vida en biopelícula de *A. seminis* descrita en este trabajo muestra las propiedades que puede adquirir una bacteria de acuerdo a las condiciones micro medio ambiental y da información consistente de su formación y composición, con esta información es posible plantear preguntas de investigación futuras que contribuyan al entendimiento de la biopelícula de *A. seminis*.

## 9.- Conclusiones

- 1.- *Actinobacillus seminis* forma una biopelícula robusta *in vitro* en medio TSB a 37°C a partir de las 12 h de cultivo.
- 2.- Se favorece la formación de biopelícula en presencia de 2´2´dipyridyl y el calcio la disminuye.
- 3.- Las proteínas son su principal componente.
- 4.- El suero anti-biopelícula reduce considerablemente la formación de la biopelícula.
- 5.- LED-209 y la furanona inhiben la formación de biopelícula.
- 6.- La fructosa disminuye la formación de biopelícula y la glucosa la aumenta.
- 7.- Los patrones de proteínas son diferentes entre el cultivo plantónico y la biopelícula en las fracciones que se obtuvieron.
- 8.- Algunas proteínas son reconocidas en cada una de las fracciones por los distintos sueros utilizados en este trabajo, dos proteínas que se expresan únicamente en biopelícula una de 23 kDa en biomasa y una de 100kDa en secretadas, estas no son reconocidas por el suero control.

## 10.- Perspectivas

- 1.- Caracterizar el efecto de la fucosa sobre la formación de la biopelícula
- 2.- Caracterizar el efecto de la glucosa sobre la formación de la biopelícula
- 3.- Comparar la actividad proteolítica entre los cultivos plantónicos y la biopelícula con el fin de identificar alguna proteasa presente en biopelícula.
- 4.- Obtener patrones de proteínas por geles SDS-PAGE 2D para corroborar las diferencias en los patrones de proteínas obtenidas en este trabajo
- 5.- Identificar las proteínas inmunogénicas presentes en la biopelícula de *A. seminis*.

## 11.- Referencias

Acosta Dibarrat, Jorge Pablo. (2001). "Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.

Acosta Dibarrat JP, Díaz Aparicio E., Arellano Reynoso B., Tenorio Gutiérrez VR, Tórtora Pérez J. (2006) Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. Rev. Tec. Pec. México 44: 257-267.

Adhikary S, Bisgaard M, Nicklas W, Christensen H. (2018) Reclassification of Bisgaard's taxon 5 as *Caviibacterium pharyngocola* gen. nov., sp. nov. and Bisgaard taxon 7 as *Conservatibacter flavescens* gen. nov. sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol; 68: 643– 650

Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol. Microbiol. 59:1114–1128.

Al-Katib W. y Dennis S. (2009). Ovine genital actinobacillosis: a review. New Zealand Vet. J., 57(6), 352–358.

Banerjee P, Singh M, Sharma V (2015) Biofilm formation: a comprehensive review. Int J Pharm. Res. Health. Sci. 3:556–560

Baynes ID, Simmons GC. (1960). Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. Australian Vet. J. 36, 454–459.

Bello-Ortí B, Deslandes V, Tremblay YDN, Labrie J, Howell KJ, Tucker AW, Maskell DJ, Aragon V, Jacques M (2014) Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*. Vet. Res. 45:104.

Betancourth M., Botero J. E.; Rivera S. P. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia Méd. 35(3 Supl. 1), 34-39.

Bielen K, Jongers B, Boddaert J, Raju TK, Lammens C, Malhotra-Kumar S, Jorens PG, Goossens H, Kumar-Singh S. (2017). Biofilm-Induced Type 2 Innate Immunity in a Cystic Fibrosis Model of *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 21; 7:274.

Billings N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S. & Ribbeck, K. (2015), Material properties of biofilms a review of methods for understanding permeability and mechanics. Rep. Prog. Phys. 78, 036601.

Bisgaard M, Christensen H. (2012). Classification of avian haemolytic *Actinobacillus-like* organisms (Bisgaard taxon 26) associated with anseriforme

birds as *Actinobacillus anseriformium* sp. nov. Int J Syst. Evol. Microbiol; 62:352–358

Boukahil I., Czuprynski CJ. (2015) Characterization of *Mannheimia haemolytica* biofilm formation *in vitro*. Vet. Microbiol. 175(1):114-22.

Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. (2018) Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. Trends Microbiol; 26(3):229-242.

Bulgin MS. (1990) Epididymitis in rams and lambs. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 6(3):683-90.

Burgui S, Gil C, Solano C, Lasa I, Valle J. (2018) A Systematic Evaluation of the Two-Component Systems Network Reveals That ArlRS Is a Key Regulator of Catheter Colonization by *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol. 7; 9:342.

Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Moser C, Kirketerp-Møller K, Johansen HK, Høiby N, Jensen PØ, Sørensen SJ, Bjarnsholt T. (2010). Biofilms in chronic infections a matter of opportunity monospecies biofilms in multispecies infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 59(3):324-36.

Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y.(2015) A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. Microb. Biotechnol. 2015 May; 8(3):392-403.

Christensen H, Bisgaard M. (2004) Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. Vet Microbiol, 99:13–30

Christensen H. and Bisgaard M. (2018) Classification of genera of Pasteurellaceae using conserved predicted protein sequences, Int J Syst Evol Microbiol;68:2692–2696

Christensen H , Kuhnert P , Nørskov-Lauritsen N , Planet PJ , Bisgaard M et al. (2014) Family Pasteurellaceae . In Stackebrandt E , Rosenberg E , DeLong E , Lory S , Thompson F et al. (editors). The Prokaryotes, 4<sup>a</sup> ed. vol. 9 Nueva York: Springer; pages. 535– 564

Christensen H, Nicklas W, Bisgaard M. (2014) *Mesocricetibacter intestinalis* gen. nov., sp. nov. y *Cricetibacter osteomyelitidis* gen. nov., sp. nov. Sistema Int J Evol Microbiol; 64: 3636– 3643

Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME. (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol.; 68(1):461-466.

Cincarova L, Polansky O, Babak V, Kulich P, Kralik P.(2016) Changes in the Expression of Biofilm-Associated Surface Proteins in *Staphylococcus aureus* Food-Environmental Isolates Subjected to Sublethal Concentrations of Disinfectants. *Biomed Res Int.*; 2016: 4034517, 12 pages

Coraça-Huber DC, Dichtl S, Steixner S, Nogler M, and Weiss G. (2018) Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics against coagulase-negative *Staphylococci*. *Pathog. Dis.*1; 76(5).

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* 238 (1), 86 – 95.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg E. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.

Cucarella C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, Í. Lasa, and J. R. Penadés,(2001) “Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation,” *J. of Bact.*183(9), 2888–2896.

Curtis MM, Russell R, Moreira CG, Adebessin AM, Wang C, Williams NS, Taussig R, Stewart D, Zimmern P, Lu B, Prasad RN, Zhu C, Rasko DA, Huntley JF, Falck JR, Sperandio V. (2014) QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. *mBio* 5(6): e02165.

Cruz Montoya, Aldo Hugo de la, (2015) Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D’Orio V, Vergara A, Conter M, Ianieri A (2008) Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria Monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol* 104:1552–1561.

Durmus NG, Taylor EN, Inci F, Kummer KM, Tarquinio KM, Webster TJ. (2012) Fructose-enhanced reduction of bacterial growth on Nano rough surfaces. *Int J Nanomedicine.*7:537-45.

Elderbrook M, Schumaker B, Cornish T, Peck D, Sondgeroth K. (2019) Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. *BMC Vet Res.* (1):246.

Erasmus JA. (1983) The usefulness of the API 20 E classification systems in the identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus seminis* and *Pasteurella haemolytica*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*50, 97–9.

Erskine E, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. (2018) Functional Amyloid and Other Protein Fibers in the Biofilm Matrix. *J Mol Biol*; 430(20):3642-3656.

Evans LV (2003) *Biofilms: recent advances in their study and control*, 1st edn. CRC Press.

Ferreirinha P, Pérez-Cabezas B, Correia A, Miyazawa B, França A, Carvalhais V, Faustino A, Cordeiro-da-Silva A, Teixeira L, Pier GB, Cerca N, Vilanova M. (2016) Poly-N-Acetylglucosamine Production by *Staphylococcus epidermidis* Cells Increases Their In Vivo Proinflammatory Effect. *Infect Immun.* 19; 84(10):2933-43.

Flemming, H. C. & Wuertz, S. (2019) Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260.

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 11; 14(9):563-75.

Flemming HC, Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* ; 8(9):623-33.

Flemming HC, Wingender J, Griebe T, Mayer C (2000) Physico-chemical properties of biofilms. *Biofilms: recent advances in their study and control*, CRC press, 19–34.

Figuroa-Valenzuela C, Montes-García JF, Vazquez-Cruz C, Zenteno E, Pereyra MA, Negrete-Abascal E. (2022) *Mannheimia haemolytica* OmpH binds fibrinogen and fibronectin and participates in biofilm formation. *Microb Pathog.*; 172:105788.

Fong JN, Yildiz FH (2015) Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 3

Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182, 3593–3596.

Dewenter L, Volkmann TE, Maier B (2015) Oxygen governs gonococcal microcolony stability by enhancing the interaction force between type IV pili. *Integr Biol (Camb)* 7:1161–1170.

Dragoš A, Kovács ÁT. (2017) The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix. *Trends Microbiol*; 25(4):257-266.

García-Contreras R, Pérez-Eretza B, Jasso-Chávez R, Lira-Silva E, Roldán-Sánchez JA, González-Valdez A, Soberón-Chávez G, Coria-Jiménez R, Martínez-Vázquez M, Alcaraz LD, Maeda T, Wood TK. (2015) High variability in quorum quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Pathog Dis.*; 73(6):ftv040.

García-Contreras R, Loarca D. (2020) The bright side of social cheaters: potential beneficial roles of "social cheaters" in microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 30; 97(1):fiaa239.

Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretrø T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas GJ, Kačániová M, Czaczyk K, Ölmez H, Simões M. (2015) Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 20; 6:841.

Gkentzis A, Lee L. (2014) The etiology and current management of prepubertal epididymitis. *Ann R Coll Surg Engl.*; 96(3):181-3.

Graevenitz AV, Zbinden R, Muters R. (2007) *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, *Pasteurella* and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MH, Tenover FC, Tenover FC et al. (editors) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington, DC: ASM Press pp. 621–635

Gupta P, Subhasis Sarkar S, Bannhi Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol* 198:1–15

Haggag W (2010). The role of biofilm exopolysaccharides on biocontrol of plant diseases. *Biopolymers*. Intech Open, pp. 271–284

Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S (2010) Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 76:2271–2279.

Hathroubi S, Loera-Muro A, Guerrero-Barrera AL, Tremblay YDN, Jacques M. (2018) *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms: Role in pathogenicity and potential impact for vaccination development. *Anim Health Res Rev.*; 19(1):17-30.

Hawver, L. A., Jung, S. A., Ng, W. L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 738–752.

He Z, Wang Q, Hu Y, Liang J, Jiang Y, Ma R, Tang Z, Huang Z (2012) Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. *Int J Antimicrob Agents* 40:30–35.

Hunt B, Bidewell C, Koylass MS, Whatmore AM. (2013) A novel taxon within the genus *Actinobacillus* isolated from alpaca (*Vicugna pacos*) in the United Kingdom. *Vet. Microbiol.* 163:383–387.

Huang, Hung-Jen, Wei-Yu Chen, Jer-Horng Wu. (2014). Total Protein Extraction for Metaproteomics Analysis of Methane Producing Biofilm: The Effects of Detergents. *Int J Mol Sci.* 15, no. 6: 10169-10184.

Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. (2017) *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus spp.* Front Cell Infect Microbiol. 3; 7:106.

Ibáñez de Aldecoa AL, Zafra O, González-Pastor JE (2017) Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. Front Microbiol 8:1390.

Inzana T., Edward Swords, Indra Sandal y Shivakumara Siddaramappaet (2008). Lipopolysaccharides, Biofilms and Quorum Sensing in *Pasteurellaceae*. In Kuhnert P, Christensen H, editors. *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp 177-196.

Jang YJ, Choi YJ, Lee SH, Jun HK, Choi BK (2013) Autoinducer 2 of *Fusobacterium nucleatum* as a target molecule to inhibit biofilm formation of periodonto pathogens. Arch Oral Biol 58:17–27.

Jemielita M, Mashruwala AA, Valastyan JS, Wingreen NS, Bassler BL. (2021) Secreted Proteases Control the Timing of Aggregative Community Formation in *Vibrio cholerae*. mBio. 12(6):e0151821.

Jiménez-Pacheco A., Núñez-del Arco A., Salas-Téllez E. (2008) Microvesicles of *Actinobacillus seminis* show proteolytic activity. J. Animal. Vet. Adv. 7: 616-619.

Jiménez Suárez, César Octavio (2022) Purificación parcial de una proteasa secretada por *Actinobacillus seminis*, (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997) Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4164–4170.

Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay TL, Foss M, Lau PC, Sanders G, Austin J, Kelly J, Szymanski CM. (2006) Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. J Bacteriol.;188(12):4312-20.

Kannan A, Karumanchi SL, Ramalingam S, Gautam P (2016) Quantitative study on the effect of calcium and magnesium palmitate on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J Microbiol Immunol Infect 49:988–991.

Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous  $\beta$ -hexosaminidase activity. J Bacteriol 185:4693–4698.

Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. (2020) Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 28(8):668-681.

Kjelleberg S, Givskov M (2007) The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations, first ed. Horizon Scientific Press.

Koo H, Yamada KM. (2016) Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Curr Opin Cell Biol.*; 42:102-112.

Körstgens V., Flemming H. C., Wingender, J., Borchard, W. (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Water Science Technology* 43, 49–57.

Kragh KN, Hutchison JB, Melaugh G, Rodesney C, Roberts AE, Irie Y, Jensen PØ, Diggle SP, Allen RJ, Gordon V, Bjarnsholt T. (2016) Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *mBio.* 22; 7(2):e00237.

Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, Ramjeet M, Auger E, Nash JH, Jacques M (2010) Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res.* 41(1):3.

Lee KW, Periasamy S, Mukherjee M, Xie C, Kjelleberg S, Rice SA. (2014) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J.*;8(4):894-907.

Lembre, P., Lorentz, C. and Di Martino, P. (2012) Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. In: Karunaratne, D.N., Ed., *The Complex World of Polysaccharides*, InTech, 371-392.

Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ (2015) Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol. Spectr.*

López-Ochoa J, Montes-García JF, Vázquez C, Sánchez-Alonso P, Pérez-Márquez VM, Blackall PJ, Vaca S, and Negrete-Abascal E. (2017) *Gallibacterium* elongation factor-Tu possesses amyloid-like protein characteristics, participates in cell adhesion, and is present in biofilms. *J Microbiol.* ; 55(9):745-752.

López D, Vlamakis H, Kolter R. (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 2(7):a000398.

Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* 4:e5822.

Martí M, Trotonda MP, Tormo-Más MÁ, Vergara-Irigaray M, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR (2010) Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 12:55–64.

McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10:39

McIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M. & Pukazki, S. (2010) The *Vibrio cholera* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 19520–19524.

Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, Arciola CR (2011) Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 34:824–831.

Montes-García, JF; Chincoya Martínez, DA ; Vaca Pacheco, S .; Vázquez Cruz, C .; Sánchez Alonso, P .; Xicohténcatl Cortés, J. ; Trujillo-Ruiz, H. ; Negrete-Abascal, E. (2018) Identification of two adhesins of *Actinobacillus seminis*, *Small Rum R*;167, 100-103.

Montes-García JF, Vaca S, Delgado NL, Uribe-García A, Vázquez C, Sánchez Alonso P, Xicohténcatl Cortes J, Cruz Cordoba A, Negrete Abascal E.(2018) *Mannheimia haemolytica* OmpP2-like is an amyloid-like protein, forms filaments, takes part in cell adhesion and is part of biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 111(12):2311-2321.

Montes-García JF, Delgado-Tapia WA, Vazquez-Cruz C, Vaca S, Cruz-Córdova A, Negrete-Abascal E. (2019) *Actinobacillus seminis* GroEL-homologous protein agglutinates sheep erythrocytes. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 112(11):1655-1662.

Montes-García JF, Vaca S, Vázquez-Cruz C, Soriano-Vargas E, Aguilar-Romero F, Blackall PJ, Negrete-Abascal E. (2016) Identification of a Hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Curr Microbiol*; 72(4):450-6.

Moustacas VS, Xavier MN, Carvalho-Júnior CA, Costa EA, Henry M, Santos RL. (2010) Effect of extender supplementation with various antimicrobial agents on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen. *Theriogenology*. 74(8):1476-81.

Moustacas VS, Silva TM, Costa LF, Carvalho Júnior CA, Santos RL, Paixão TA. (2014) Clinical and pathological changes in rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *Scientific World Journal*. 27; 2014:241452.

Murmullos R, Mannhein W, Bisgaard M. (1989) Taxonomía del grupo. En Adlam C, Rutter JM. (Editores) *Pasteurella y Pasteurellosis* Londres, Reino Unido: Academic Press; págs. 3–34

Neu TR, Poralla K (1988) An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. FEMS Microbiol Lett 49:389–392.

Nicklas W, Bisgaard M, Aalbæk B, Kuhnert P, Christensen H. (2015) Reclassification of *Actinobacillus muris* as *Muribacter muris* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol; 65:3344–3351

Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010) Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. PLoS ONE 5:e15668.

Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. (2006) Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol; 56:2135–2146

Negrete-Abascal E, Montes-Garcia F, Vaca-Pacheco S, Leyto-Gil AM, Fragoso-Garcia E, Carvente-Garcia R, Perez-Agueros S, Castelan-Sanchez HG, Garcia-Molina A, Villamar TE, Sánchez-Alonso P, Vazquez-Cruz C.(2018) Genome Sequence of *Actinobacillus seminis* Strain ATCC 15768, a Reference Strain of Ovine Pathogens That Causes Infections in Reproductive Organs. Genome Announc.11;6(2):e01453-17

Nicklas W, Bisgaard M, Aalbæk B, Kuhnert P, Christensen H. (2015) Reclassification of *Actinobacillus muris* as *Muribacter muris* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol; 65: 3344– 3351

Núñez-del Arco A, Salas-Téllez E, de la Garza M, Díaz-Aparicio E, and Tenorio-Gutiérrez V. (2006) Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. Can J Vet Res.;70(1):43-9.

Oliveira CH, Silva AM, Silva LM, van Tilburg MF, Fernandes CC, Velho AL, Moura AA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Lima IM, Rondina D. (2015) Growth, testis size, spermatogenesis, semen parameters and seminal plasma and sperm membrane protein profile during the reproductive development of male goats supplemented with de-oiled castor cake. Reprod Toxicol. 53:152-61.

Okshevsky M, Meyer RL (2015) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit Rev Microbiol 41:341–352.

Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, Cosette P, Lindsay D, Von Holy A, Brözel VS.(2002) Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. Appl Environ Microbiol;68(6):2770-80.

Otto M (2013) Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* 64:175–188.

Paul, D., Gopal, J., Kumar, M., and Manikandan, M. (2018). Nature to the natural rescue: silencing microbial chats. *Chem. Biol. Interact.* 280, 86–98.

Paul W. Snyder (2017) Chapter 5 - Diseases of Immunity, Editor(s): James F. Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)*, Mosby, Pages 242-285.e5, ISBN 9780323357753

Paulino TP, Andrade RO, Bruschi-Thedei GC, Thedei G Jr, Ciancaglini P. (2004) The effect of carbon source and fluoride concentrations in the *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Biochem Mol Biol Educ.*; 32(5):331-5.

Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. (2019) Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol*; 10:1100.

Pereira MF, Rossi CC, Seide LE, Martins Filho S, Dolinski CM, vBazzolli DMS (2018) Antimicrobial resistance, biofilm formation and virulence reveal *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains' pathogenicity complexity. *Res Vet Sci* 118:498–501

Petruzzi B, Inzana TJ (2016) Exopolysaccharide production and biofilm formation by *Histophilus somni*. *Curr Top Microbiol Immunol* 396:149–160.

Petruzzi B, Dickerman A, Lahmers K, Scarratt WK, Inzana TJ. Polymicrobial (2020) Biofilm Interaction between *Histophilus somni* and *Pasteurella multocida*. *Front Microbiol.*10; 11:1561.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim H (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem* 7:493–512.

Rainey K, Michalek SM, Wen ZT, Wu H.(2019) Glycosyltransferase-Mediated Biofilm Matrix Dynamics and Virulence of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.*; 85(5):e02247-18.

Rather, M.A., Gupta, K. & Mandal, M.(2021) Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol* 52, 1701–1718.

Rea Hernández, Pablo Alejandro (2022) Efecto de la norepinefrina y epinefrina sobre la expresión de factores de virulencia de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM

Relucenti M, Familiari G, Donfrancesco O, Taurino M, Li X, Chen R, Artini M, Papa R, Selan L. (2021) Microscopy Methods for Biofilm Imaging: Focus on SEM and VP-SEM Pros and Cons. *Biology (Basel)*. 12; 10 (1):51.

Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol* 8:578.

Rendueles, O. & Ghigo, J.-M. (2015) Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiol. Spectr.* 3, MB-0009-2014.

Robert A. Foster (2017) Chapter 19 - Male Reproductive System, Editor(s): James F. Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)*, Mosby, Pages 1194-1222.e1, ISBN 9780323357753,

Ron EZ, Rosenberg E (2001) Natural roles of biosurfactants. *Appl Environ Microbiol* 3:229–236.

Sager M, Benten WP, Engelhardt E, Gougoula C, Benga L. (2015) Characterization of Biofilm Formation in [*Pasteurella*] *pneumotropica* and [*Actinobacillus*] *muris* Isolates of Mouse Origin. *PLoS One*. 2; 10(10):e0138778.

Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R. & Briand, J.-F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893.

Sandal I, Hong W, Swords WE, Inzana TJ (2007) Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. *J Bacteriol* 189:8179–8185

Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ (2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187:4327–4337.

Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, and Stewart PS, Bjarnsholt T. (2022) The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.*; 20(10):608-620.

Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. (2000) Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Vet Microbiol.* 12;74(4):365-76

She P, Wang Y, Liu Y, Tan F, Chen L, Luo Z, Wu Y.(2019) Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Mic. open*; 8(12):e933.

Shin JH, Lee HW, Kim SM, Kim J (2009) Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode. *J Microbiol* 47: 728–735

- Shukla SK, Rao TS. (2013) Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study. *Colloids Surf B Biointerfaces*.1;103:448-54.
- Singh N, Bhalla N. (2020) Moonlighting Proteins. *Annu Rev Genet*. 23; 54:265-285.
- Solano C, Echeverez M, Lasa I. (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.*; 18:96-104.
- Soto Ramírez Rene (2006) identificación de la proteína TomB de *Actinobacillus seminis* como un candidato a inmunogéno. (Tesis de Licenciatura) IPIB. IPN. Mexico.
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227.
- Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR (2001) Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 205: 139–146.
- Szelestey BR, Heimlich DR, Raffel FK, Justice SS, Mason KM (2013) *Haemophilus* responses to nutritional immunity: epigenetic and morphological contribution to biofilm architecture, invasion, persistence and disease severity. *PLoS Pathog* 9(10):e1003709.
- Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 42:777–793
- Tielen, P., Strathmann, M., Jaeger, K. E., Flemming, H.-C. Wingender, J. (2005) Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* 160, 165–176.
- Tursi, S.A., Tukel, C. (2018) Curli-containing enteric biofilms inside and out: matrix composition, immune recognition, and disease implications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82, e00028-18
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N (2016) Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:7–12.
- Vaca S., E. Monroy , L. Rojas, C. Vázquez, P. Sánchez, E. Soriano Vargas, A. Miki Bojesen y E. Negrete Abascal (2011) Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J. Anim. Vet. Adv.* 13: 1688-1693
- von Ohle C, Gieseke A, Nistico L, Decker EM, DeBeer D, Stoodley P. (2010) Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental

biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol.* 76(7):2326-34.

Vorkapic D, Pressler K, Schild S (2016) Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Curr Genet* 62:71–79.

Wang Y, Yi L, Wu Z, Shao J, Liu G, Fan H, Zhang W, Lu C. Comparative proteomic analysis of *Streptococcus suis* biofilms and planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins. *PLoS One.* 2012; 7(4):e33371.

Warrier A, Satyamoorthy K, Murali TS.(2021) Quorum-sensing regulation of virulence factors in bacterial biofilm. *Future Microbiol.* 16:1003-1021.

Weigel WA, Demuth DR (2016) QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. *Mol Oral Microbiol* 31:379–97.

Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S (2016) Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:544–553

Worlitzer VM, Jose A, Grinberg I, Bär M, Heidenreich S, Eldar A, Ariel G, Be'er A. (2022) Biophysical aspects underlying the swarm to biofilm transition. *Sci Adv.* 17; 8(24):eabn8152.

Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR.(2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24; 100(13):7907-12.

Yang Y, Mao M, Lei L, Li M, Yin J, Ma X, Tao X, Yang Y, Hu T. (2019) Regulation of water-soluble glucan synthesis by the *Streptococcus mutans* dexA gene effects biofilm aggregation and cariogenic pathogenicity. *Mol Oral Microbiol.*; 34(2):51-63.

Zelezniak A, Andrejev S, Ponomarova O, Mende DR, Bork P, Patil KR.(2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19; 112(20):6449-54.

Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7:36670–36683.