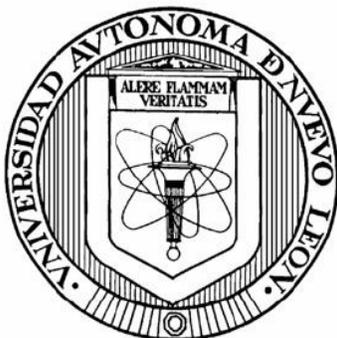


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS



ESPORULACIÓN Y BIOPELÍCULA DE *C. perfringens*:  
ACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES

POR

ALBERTO AGUAYO ACOSTA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA

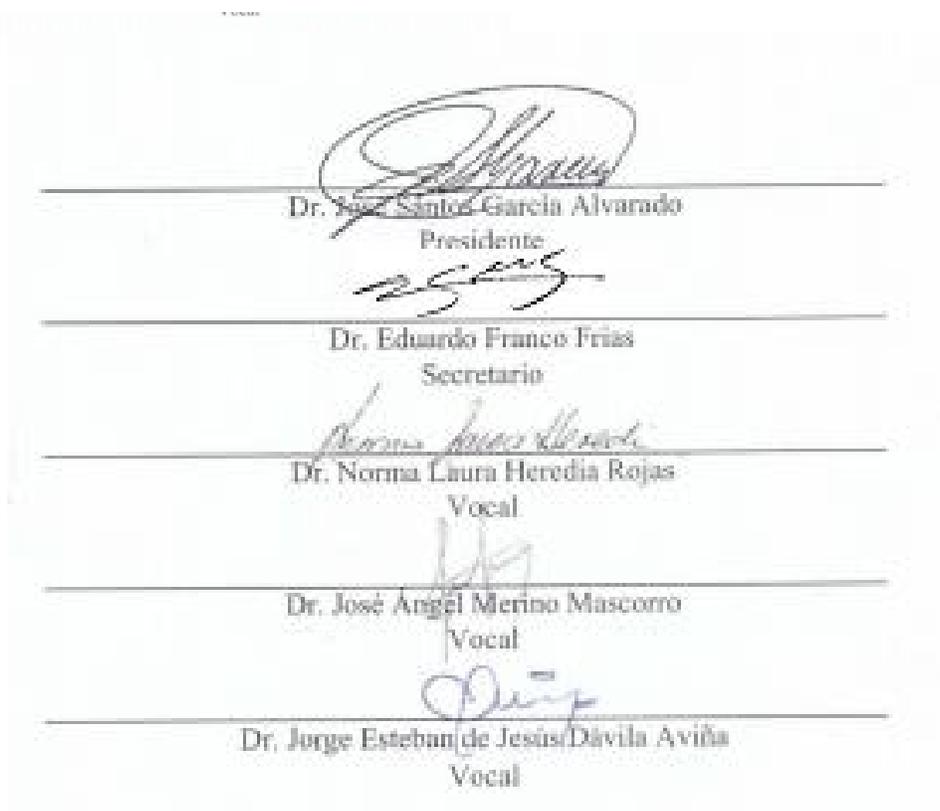
AGOSTO, 2020

**ESPORULACIÓN Y BIOPELÍCULA DE *C. perfringens*: ACCIÓN DE  
ANTIMICROBIANOS NATURALES**

**POR**

**ALBERTO AGUAYO ACOSTA**

**Comité de Tesis**



**ESPORULACIÓN Y BIOPELÍCULA DE**  
***C. perfringens*: ACCIÓN DE**  
**ANTIMICROBIANOS NATURALES**

**Dirección de Tesis**

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Director

---

Dr. Norma Laura Heredia Rojas  
CoDirector

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado, la codirección de la Dra. Norma Heredia Rojas y la asesoría del Dr. Eduardo Franco Frías, el Dr. José Ángel Merino Mascorro, el Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña. y el Dr. Jorge Vidal de la Universidad de Mississippi Medical Center, Department of Microbiology and Immunology, E.U.A

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Biológicas por su programa, y facilitar profesores, instalaciones e insumos en el desarrollo de nuestro proyecto.

A el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo monetario prestado a lo largo del desarrollo del proyecto, así como su apoyo a la generación de conocimiento científico en el país.

A mis asesores por su apoyo y soporte durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Jorge E. Vidal Graniel por su apoyo y asesoría durante el desarrollo del proyecto, así como su apoyo en permitirnos una estancia de investigación en su laboratorio de investigación en Rollings School of Public Health en Emory University durante el desarrollo de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto lo dedico a mis asesores, por todo su apoyo durante el desarrollo del trabajo de investigación. A todos mis compañeros de laboratorio por su soporte durante el desarrollo de la investigación y ánimos durante tiempos difíciles.

A mis maestros y tutores por su empeño en la realización de la investigación, así como compartir todos sus conocimientos durante mi estancia en el desarrollo del proyecto.

A mis amigos Ernesto, Dante, Laura, Ángel, Dianelys, Ana, Alondra, Alejandra, Sergio, Fabiola, David, Eduardo, Elizabeth, Fernanda y Sheila, por su apoyo durante la realización del proyecto y en tiempos difíciles.

Sobre todo, a mis padres Alfredo Aguayo y Ana María Acosta, y a mis hermanos por su cariño y fe durante la realización de la investigación y mi desarrollo profesional, pues sin su apoyo y amor no hubiera podido terminar este proyecto.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	IX
DEDICATORIA .....	X
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	XV
RESUMEN .....	
ABSTRACT .....	I
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	4
Generalidad de <i>C. perfringens</i> .....	4
Biopelículas y <i>C. perfringens</i> .....	5
Quorum sensing y regulación.....	8
QS en bacterias Gram positivas .....	10
Esporulación y enterotoxina.....	15
Estrés Térmico .....	17
Respuesta a estrés térmico.....	18
Estrategias anti-virulencia como alternativa en el control de microorganismos patógenos.....	19
Bacterias ácido lácticas y probióticos, alternativas bacterianas en las estrategias anti-virulencia.....	22
Compuestos con actividad de anti-virulencia de bacterias ácido lácticas. ....	24
Compuestos antimicrobianos derivados de plantas.....	25
Compuestos polifenólicos como agentes antimicrobianos y reguladores de factores de virulencia .....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS .....	29
General .....	29
Específicos .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	30
Identificación molecular de <i>Lactobacillus plantarum</i> (aislado de productos fermentados comerciales). ....	31

Compuestos antimicrobianos .....	31
Ensayo de actividad antimicrobiana.....	32
Ensayo de cuantificación de biopelícula.....	33
Ensayo del efecto de proteinasa K y lisozima en la actividad anti-biopelícula del sobrenadante bacteriano .....	34
Análisis de formación de esporas y formación de esporas durante el desarrollo de la biopelícula. ....	34
Ensayo de expresión de genes.....	35
RESULTADOS.....	37
Ensayo de actividad antimicrobiana de los compuestos derivados de planta y sobrenadantes bacterianos.....	37
Biopelícula formada por <i>C. perfringens</i> .....	39
Ensayo de actividad sobre biopelícula de los compuestos EG y LP-S.....	41
Ensayo de actividad contra esporulación de EG y LP-S .....	44
Efecto de la proteínasa K y Lisozima en la actividad anti biopelícula del sobrenadante bacteriano LP-S.....	46
Efecto de EG y LP-S en la expresión de genes relacionados al sistema QS CpAL y formación de biopelícula de <i>C. perfringens</i> .....	47
DISCUSIÓN .....	56
CONCLUSIÓN .....	67
PERSPECTIVAS .....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 CMB de compuestos naturales derivados de plantas .....	37
Tabla 2 Inhibición de <i>C. perfringens</i> por bacterias ácido lácticas.....	38
Tabla 3 CMB y CMI de tratamientos EG y LP-S.....	39
Tabla 4 Cinética de formación de biopelícula en <i>C. perfringens</i> FD-1041, <i>C. perfringens</i> FD-1 y <i>C. perfringens</i> H-3.....	40
Tabla 5 Valor de BFI en <i>C. perfringens</i> con los tratamientos "GE" y LP-S" .....	43
Tabla 6 Efecto del tratamiento enzimático en la actividad anti biopelícula de "LP-S" .....	46
Tabla 7 Perfil de expresión determinado para los tratamientos de EG y LP-S en <i>C. perfringens</i> .....	49
Tabla 8 Perfil de expresión de genes de <i>C. perfringens</i> observado para el tratamiento control con Benzbromarona.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Representación Quorum Sensing en Microorganismos .....	9
Fig. 2 Quorum Sensing en <i>V. fischeri</i> .....	9
Fig. 3 Quorum Sensing <i>S. aureus</i> .....	12
Fig. 4 Quorum Sensing <i>S. pneumoniae</i> .....	13
Fig. 5 Quorum Sensing <i>B. cereus</i> .....	14
Fig. 6 Quorum sensing <i>C. perfringens</i> .....	15
Fig. 7 Cinética de formación de biopelícula en <i>C. perfringens</i> .....	41
Fig. 8 Efecto del tratamiento LP-S en la esporulación de <i>C. perfringens</i> .....	45
Fig. 9 Inhibición de esporas a las 24 horas ambos tratamientos.....	46

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos o Abreviatura	Significado
±	Desviación estándar
%	Porcentaje
%(v/v)	Porcentaje volumen/volumen
°C	Grados Celsius
2X	Concentración doble
µg	Microgramos
µL	Microlitros
AB	Densidad óptica medida en 570nm (Formula para obtener valor de BFI)
Abs	Absorbancia
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
Agr	Accessory gene regulator (regulador de genes accesorio)
AHL	Acil homoserin lactona
AI	Auto inductor
AIP	Auto inductor proteico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BFI	Biofilm formation index (índice de formación de biopelícula)
BZ	Benzabromarona
cADN	ADN complementario
CMB/MCB	Concentración mínima bactericida
CMI/IMC	Concentración mínima inhibitoria
CpAL	Sistema Agr-like en <i>C. perfringens</i>
CPE	Enterotoxina de <i>C. perfringens</i>
CW	Densidad óptica del control
eADN	ADN extracelular
EG	Galato de epigallocatequina

fig	Figura
G	Densidad óptica del crecimiento microbiano a 630nm
g	Gravedades
GE	Tratamiento con galato de epigallocatequina
h	Horas
kDa	Kilo daltons
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio
LP-S	Tratamiento con sobrenadantes de <i>L. plantarum</i>
MB	Moderados formadores de biopelícula
mg	Miligramos
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Fosfato de sodio di básico pentahidratado
NB	No formadores de biopelícula
nm	Nanómetros
P2	Promotor 2
P3	Promotor 3
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate-buffered saline (solución amortiguadora de fosfato)
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	Reacción de la Polimerasa en cadena en Tiempo real
QQ	Quorum quenching

QS	Quorum sensing
rADN	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
s	Segundo
SB	Fuertes formadores de biopelícula
spp.	Cepa
subsp.	Sub cepa
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV-Vis	Ultravioleta luz visible
WB	Débiles formadores de biopelícula

## **Esporulación y Biopelícula de *Clostridium perfringens*: Acción de Antimicrobianos Naturales**

### **RESUMEN**

*C. perfringens* es un microorganismo anaerobio que puede crecer en un amplio rango de temperatura (15 a 50°C) con una óptima de 43°C y causar enfermedades como mionecrosis clostridial y enfermedades gastrointestinales en el hombre y animales. Se estima que es la segunda causa bacteriana más común de enfermedades alimentarias en humanos en varios países como desarrollados.

La formación de esporas en esta bacteria es crítica, pues le permite sobrevivir en ambientes ricos en oxígeno, soportar altas y bajas temperaturas, sequedad, la presencia de detergentes, desinfectantes, y niveles de radiación extremas. Esto favorece la transmisión de las enfermedades que la bacteria provoca. A nivel molecular, la producción de la enterotoxina está ligada a la esporulación. En ambientes naturales, las bacterias son expuestas a estreses ambientales lo que favorece la formación de acúmulos microbianos llamados biopelículas, las cuales van de la mano con la patogenicidad. El Quórum sensing (QS) es una forma de comunicación entre bacterias en respuesta a cambios en la densidad poblacional que regula muchos tipos de comportamiento bacteriano, incluyendo simbiosis, producción de antibióticos, formación de biopelícula y virulencia.

Está establecido que el sistema QS (mecanismo comprobado como regulador de factores de resistencia y patogenicidad bacteriana) regula el inicio de la esporulación en *C. perfringens* y se ha mostrado que este puede controlar la producción de toxinas codificadas tanto en plásmidos como en el cromosoma, y de mucha importancia, también controla la formación de esporas y la producción de enterotoxina. Se ha visto una relación entre el QS, la esporulación, la formación de enterotoxina, la producción de biopelícula, la temperatura y la patogénesis de *C. perfringens*. Al ser el QS un blanco ideal para bloquear los factores de virulencia que controla, el objetivo de este estudio es determinar la actividad del estrés térmico y antimicrobianos naturales en la esporulación, producción de enterotoxina y formación de biopelículas de *C. perfringens* analizando el efecto en el QS.

La hipótesis del trabajo fue: El estrés térmico y antimicrobianos naturales afectan la esporulación, la producción de enterotoxina y la formación de biopelículas de *C. perfringens* interfiriendo en el sistema QS.

Para desarrollar este trabajo se usaron compuestos con presunta actividad antimicrobiana, las cuales se comprobaron en *C. perfringens* mediante la determinación de CMB de los compuestos y finalmente la identificación los valores de CMI en los compuestos utilizados al final. Los ensayos de biopelículas se realizaron mediante microscopía confocal y mediante un ensayo espectrofotométrico. Los ensayos de expresión génica se realizaron por qPCR usando el sistema Access-Quick RT-PCR.

## **ABSTRACT**

*C. perfringens* form biofilms and spores that favor food contamination. In this study, the antibacterial activity of culture supernatants from *Lactobacillus plantarum* (LP-S), LP-S fractions, and the plant-derived compound epigallocatechin gallate (EG) was evaluated. The potential anti-biofilm activity and effects on the expression of genes involved in biofilm formation was also investigated. Both EG and the LP-S were bactericidal against all *C. perfringens* strains tested. The MBC of EG was 75 µg/ml for all strains; whereas that of LP-S ranged from 61 to 121 µg (total protein)/ml. EG produced minor effects on biofilm formation while LP-S, particularly its fractions 10 and 30kDa, significantly reduced biofilms formed by all strains. LP-S anti-biofilm activity was lost by pre-incubating with proteases, suggesting that the active molecule is of proteinaceous nature. Treatment of *C. perfringens* with either EG, or LP-S did not change transcript levels of CpAL genes, *agrB* and *agrD*, involved in the regulation of biofilms suggesting that the biofilm inhibitory activity of LP-S acted downstream CpAL signaling. In sum we demonstrated the bactericidal activity of EG and LP-S against *C. perfringens* and anti-biofilm activity of LP-S at a sub-inhibitory dose.

## INTRODUCCIÓN

El **microorganismo** *C. perfringens* es un bacilo anaerobio, Gram-positivo, formador de esporas termorresistentes, encapsulado y no móvil. Puede crecer en un rango de temperatura (15 a 50°C) con una óptima de 43°C, donde puede tener un tiempo de generación de 7 a 8 min, el cual es el más corto de cualquier bacteria reportada (Heredia y Labbé 2013).

*C. perfringens* causa mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa) y enfermedades gastrointestinales en el hombre y animales (García y Heredia 2011). Se estima que *C. perfringens* es la segunda causa bacteriana más común de enfermedades alimentarias en humanos en países como Estados Unidos de América (Grass et al 2013). En México existe información muy limitada de su papel como causante de enfermedades alimentarias. Aparte de los padecimientos en humanos, se ha establecido que causa enfermedades en animales tales como la gangrena gaseosa, la enterotoxemia de ovejas, borregos y ganado vacuno, disentería de cordero, y la enfermedad del riñón pulposo en cabras, entre otras (García y Heredia 2011). Esta serie de enfermedades se producen debido a que la bacteria produce al menos 15 toxinas diferentes, entre las cuales se encuentra una enterotoxina involucrada en la intoxicación alimentaria y diarrea infecciosa.

*C. perfringens* es quizás la bacteria patógena más ampliamente distribuida que cualquier otra bacteria, ya que se encuentra comúnmente en el suelo e intestino del hombre y animales (García y Heredia 2011).

La formación de esporas es crítica, pues le permite sobrevivir a este microorganismo anaerobio en el ambiente rico en oxígeno, soportar altas y bajas temperaturas, sequedad, la presencia de detergentes, desinfectantes, y niveles de radiación que las células vegetativas no pueden (Paredes-Sabja et al. 2008). Esto favorece la ocurrencia de la intoxicación alimentaria, la gangrena gaseosa y otras enfermedades producidas por este microbio. El proceso de esporulación en *C. perfringens* es correlacionado con un sistema regulador “Agrlike Quorum-sensing” (Ohtani et al. 2013).

La formación de biopelículas va de la mano con la patogenicidad (Ren et al. 2005). Las biopelículas bacterianas son comunidades adheridas a una superficie con una alta densidad de células (Donlan, 2001) son de gran preocupación para la industria alimentaria y salud pública (Gilbert et al. 2003). La ocurrencia de biopelículas en la industria puede conllevar a pérdidas económicas fuertes y problemas de higiene, debido a que las bacterias se encuentran protegidas a la acción de antibióticos (Hu et al. 2006) y desinfectantes (Gilbert et al. 2003).

El quorum sensing (QS) es una forma de comunicación entre bacterias en respuesta a cambios en la densidad poblacional que regulan el comportamiento bacteriano, incluyendo simbiosis, producción de antibióticos, formación de biopelícula y virulencia (Jeon et al. 2003). El QS puede ser por lo tanto un blanco ideal para bloquear la patogénesis microbiana, ya que al bloquear el QS se pueden bloquear los factores de virulencia que controla. Encontrar compuestos que inhiban el QS, puede conducir al desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Las técnicas para el control de microorganismos producen una variedad de estreses en los mismos. *C. perfringens* genera una respuesta al estrés después de una exposición a tratamientos de calor, frío o ácido entre otros (Heredia et al 2008). La aplicación de un choque térmico genera la inducción de proteínas del estrés y retrasa la producción de esporas y de enterotoxina, pero incrementa la tolerancia al calor de las células vegetativas y de las esporas formadas (Shen et al. 2019; Al-Hinai et al. 2015).

Aunque los aditivos sintéticos y antibióticos son ampliamente usados en la industria alimentaria (Verraes et al. 2013) y el ambiente médico (Donlan, 2001), existe una tendencia en la sociedad al uso de antimicrobianos naturales o estrategias alternas (Jiang et al. 2019).

La formación de biopelícula es una de las principales características de los microorganismos que se busca combatir (Koo et al. 2017), ya que este polímero extracelular propicia las condiciones ambientales ideales para incrementar la resistencia de los microorganismos (Donlan, 2001; Flemming et al. 2016).

## JUSTIFICACIÓN

*C. perfringens* es una bacteria altamente patógena para el hombre, encontrándose aun en nuestros días como una de las causas principales de enfermedades por el consumo de alimentos contaminados. La principal razón de esto es en parte a la capacidad que tiene la bacteria para producir factores de supervivencia y virulencia (esporulación, formación de enterotoxina y otras toxinas, además la formación de biopelícula) que le ayudan a sobrevivir en ambientes hostiles y de estrés para el microorganismo. Estas condiciones pueden hacer al microorganismo tolerante a ambientes desfavorables e impedir de esta manera su adecuado control. Por lo que la búsqueda de métodos alternativos para lograr su control efectivo es una necesidad actual.

Existe un vínculo en el sistema de comunicación QS, con la esporulación, la formación de enterotoxina, la producción de biopelícula y la patogénesis de *C. perfringens*. Al ser el QS un blanco ideal para bloquear los factores de virulencia que controla, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad del estrés térmico y antimicrobianos naturales en la esporulación, producción de enterotoxina y formación de biopelículas de *C. perfringens* analizando el efecto en el QS.

## ANTECEDENTES

### Generalidad de *C. perfringens*

El género *Clostridium* está formado por un diverso grupo de bacterias anaeróbicas que cuentan con la habilidad de formar esporas resistentes al calor (García y Heredia, 2011). *C. perfringens* es una bacteria Gram-positiva, de forma bacilar, anaerobia, formadora de esporas termorresistentes, encapsulada y no móvil, son organismos del filum *firmicutes* (en el cual se encuentran las clases: *Bacilli*, *Clostridia* y *Erysipelotrichi*) clasificados en el género *Clostridium*, clase clostridiales y familia *Clostridiaceae* (Pantaleon et al. 2014). Este microorganismo se encuentra distribuido en una amplia variedad de ambientes, incluyendo el sistema gastrointestinal (Obana y Nakamura, 2011), puede crecer en un amplio rango de temperatura (15 a 50°C) con una óptima de 43°C, la cual está reportada como la más alta de cualquier bacteria de importancia médica, en donde puede tener un tiempo de generación de 7 a 8 min, el cual es el más corto de cualquier bacteria conocida (Heredia y Labbé, 2013). Todos estos factores, favorecen su sobrevivencia y distribución en el ambiente (Al-Hinai et al. 2015; Li, Paredes-Sabja et al. 2016; Charlebois et al. 2017).

La presencia o ausencia de las 6 toxinas predominantemente producidas por *C. perfringens* se utilizan para realizar la clasificación de los aislados del microorganismo dentro de siete diferentes toxotipos (A-G) la clasificación F consiste en aislados de *C. perfringens* que producen la toxina CPE, pero no producen las toxinas  $\beta, \epsilon$  o  $\iota$ , mientras que el toxotipo G se caracteriza por producir la toxina NetB (García et al. 2019)

*C. perfringens* es considerado como el agente principal responsable de diversas enfermedades tales como la gangrena gaseosa, y la enteritis necrótica (Li et al. 2011), además en el humano también puede causar otros padecimientos tales como mionecrosis clostridial. Se ha establecido que también es responsable de enfermedades en animales tales como la gangrena gaseosa, la enterotoxemia de ovejas, borregos y ganado vacuno, disentería de cordero, y la enfermedad del riñón pulposo en cabras, entre otras (García y Heredia 2011).

*C. perfringens* es quizás la bacteria patógena más ampliamente distribuida, ya que se encuentra comúnmente en el suelo e intestino del hombre y animales. Al ser un organismo fácilmente transportado por el polvo, éste puede estar contaminando cualquier superficie

expuesta a este, facilitando de esta manera, la contaminación de alimentos y la infección al hombre y animales (García y Heredia, 2011). Cuando *C. perfringens* es ingerido por el consumo de alimentos contaminados, sus células vegetativas logran llegar hasta el intestino delgado y se comienza la inducción de la esporulación y la producción de CPE (Ohtani, et al. 2013), ya que se ha establecido una estrecha relación entre estos dos procesos (Li et al. 2011).

### **Biopelículas y *C. perfringens***

La información acerca del desarrollo y características de la biopelícula formadas por el género *Clostridium* es sorpresivamente escasa, comparada con la literatura que explora esta misma característica fisiológica en otras bacterias pertenecientes al género *firmicutes*, tales como las especies *Bacillus* o *Staphylococcus* (Pantaleon et al. 2014).

*C. perfringens* es capaz de producir biopelículas haciendo de esta manera más resistentes a sus células vegetativas a condiciones desfavorables, tales como presencia a antimicrobianos y resistencia a concentraciones de oxígeno y a procesos de desinfección con choques térmicos (Obana et al. 2014). Las biopelículas son intrincadas matrices tridimensionales conformadas principalmente por polisacáridos, proteínas y en ocasiones fragmentos de material genético (Schachter, 2003).

*C. perfringens* es conocido por ser una bacteria aerotolerante capaz de sobrevivir en suelo y cuerpos de agua. Siendo la biopelícula el factor de resistencia a estas condiciones de estrés por oxígeno (Charlebois et al. 2014).

La formación de biopelícula como un sistema de repuesta a un estrés ambiental también es parte importante para dar soporte a otros microorganismos presentes en este microambiente. Estos microambientes cuentan con las condiciones propicias de crecimiento y son parte crucial en la resistencia de las condiciones adversas del ambiente (Martin et al. 2015). En *C. perfringens*, se favorece por la presencia del pili tipo IV y la concentración de glucosa (Varga et al. 2006).

*C. perfringens* forma biopelículas con diferentes estructuras en respuesta a temperaturas diferentes. Particularmente a 37°C, las células se adhieren densamente a la

superficie del sustrato formando una biopelícula adherente delgada y plana (Obana et al 2014). Sin embargo, a 25°C no se adhieren a la superficie y forman una biopelícula difusa con una matriz viscosa, gruesa. Se ha demostrado que los factores transcripcionales de esporulación Spo0A y AbrB y un regulador de toxina CtrAB se requieren para la regulación del Pili tipo IV y la producción de una matriz extracelular que contribuye a las diferentes morfologías de biopelículas en respuesta a la temperatura (Obana et al, 2014).

Estas biopelículas, actúan como barreras naturales contra antimicrobianos, ya que el microambiente proporciona a las células embebidas capacidades aislantes de estos compuestos impidiendo al antimicrobiano difundirse libremente e impidiendo llegar a su sitio de acción (Schachter, 2003). Así al incrementar la resistencia a agentes antimicrobianos, se provoca la prevalencia de los microorganismos a tratamientos de saneo (Gupta et al. 2013).

Desarrollarse en un ambiente como lo es la biopelícula, permite a los microorganismos interactuar entre sí para poder realizar actividades de manera coordinada. Estas interacciones y comunicaciones célula a célula, permiten actuar a los microorganismos como una comunidad organizada en forma estructurada de manera espacial y temporal. El incremento en la densidad celular favorece la coordinación de actividades metabólicas, esto debido a la alta concentración de moléculas señal en los microambientes que se generan en la biopelícula (Giaouris et al. 2015).

La formación de biopelícula difusa requiere del regulador maestro Spo0A y el regulador de toxina CtrAB, y su formación se incrementa en ausencia de un represor global AbrB. Esos genes reguladores transcripcionales son regulados entre ellos y por la temperatura. Por otro lado, la formación de la biopelícula adherente requiere AbrB y *pilA2*. Este último codifica un componente de pili tipo IV (TFP) cuya expresión se activa a 37°C y es regulada a través de Spo0A, AbrB, y CtrAB.

El surgimiento de resistencia mediada por biopelículas, ha provocado la necesidad de incrementar las dosis de agentes antimicrobianos utilizados, el cambio de los mismos, y la investigación de nuevos sistemas de erradicación del patógeno (Li y Tian, 2012). La ocurrencia de biopelículas en la industria no solo es un problema de higiene, sino que puede

conllevar a pérdidas económicas fuertes, ya que representan focos de infección difíciles de erradicar (Raybaudi-Massilia et al. 2009).

Al aportar una cobertura extra a la célula planctónica (no embebida en la biopelícula), se induce una modificación en la expresión genética de reguladores de respuesta a estrés, así como la expresión de genes cuyos productos son compuestos llamados “*factores de protección*”, tales como bombas de flujo capaces de expulsar antimicrobianos del citoplasma celular (Gupta et al. 2013). Además, cambios en la temperatura en que se encuentren las células pueden inducir a cambios en la composición de la biopelícula; se ha visto en *C. perfringens* la inducción de SpoOA por el incremento de temperatura, lo cual a su vez podría favorecer el riesgo de formación de esporas (Obana et al. 2014).

Las evidencias existentes reflejan la importancia de la regulación en la formación de biopelícula, ya que al eliminar o impedir su formación, se provoca un aumento en la susceptibilidad a condiciones de estrés, produciendo un mejor control de estos microorganismos. El uso de extractos de plantas ha sido sugerido como tratamientos efectivos para controlar su formación (Ramírez-Hernández et al. 2015), sin embargo se debe de tomar en cuenta la acción concreta de dichos compuestos, ya que una pequeña parte de la población bacteriana en una biopelícula puede desarrollar un estado de alta protección y resistencia, debido a cambios fisiológicos o modificaciones en los perfiles de expresión genética, dando como resultado a lo que se le denomina como población persistente, para evitarlo se deben de tomar acciones directas para el bloqueo total de los sistemas de comunicación bacteriana (Charlebois et al. 2017).

La formación de biopelícula se encuentra regulada por mecanismos dependientes del QS (Li y Tian, 2012), que a su vez regula la señalización de rutas metabólicas (relaciones simbióticas), provocando la indicción de factores de virulencia, generalmente no expresados en células planctónicas (Li y Tian, 2012). Uno de dichos procesos es la formación de esporas, la cual se encuentra regulada por autoinductores (AI) relacionados a los sistemas QS. En concreto, se visualiza una relación entre el QS, la esporulación, la formación de enterotoxina, la producción de biopelícula, la temperatura y la patogénesis de *C. perfringens*.

## **Quorum sensing y regulación.**

En ambientes naturales, los microorganismos están en constante presión de supervivencia por variaciones fisicoquímicas y nutricionales en el ambiente, cambios en las presiones osmóticas, variaciones de temperatura, fluctuaciones en las concentraciones de oxígeno, del pH (alcalinidad y acidez del medio), además del número de individuos dentro de un espacio específico, desencadenan una cascada de señalización conocido como quorum sensing “QS” (Martin et al. 2015).

El QS es un sistema de comunicación o señalización célula a célula, regulado por la segregación y censado de compuestos de bajo peso molecular conocidos como autoinductores (AIs), tales como el compuesto acil-homoserin lactona (AHL) (LaSarre y Federle, 2013), que induce a un consorcio de células a actuar como un organismo único, induciendo la respuesta coordinada a cambios ambientales, así como la expresión o regulación de operones, resultando en un cambio fisiológico completo y coordinado, provocando el disparo de procesos fisiológicos en la célula como formación de biopelícula y otros factores de resistencia (Li y Tian, 2012; Nazzaro et al. 2013), expresión de bombas de flujo para antimicrobianos o sobre-expresión de genes que derivan en la producción de compuestos citotóxicos (Gupta et al. 2013; LaSarre y Federle, 2013).

Cabe señalar que una gran diferencia que existe entre los sistemas QS de microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos es, en el caso de las bacterias Gram-negativas (fig.1) (Ng y Bassler, 2009), la capacidad del autoinductor de poder internalizarse hacia el citoplasma del microorganismo sin la necesidad de tener un transportador en la pared de la bacteria, ya que esta moléculas son difusibles por sus características químicas (Cai et al. 2017), caso contrario a los autoinductores de bacterias Gram-positivas que, debido a su naturaleza química, requieren de un transportador en la pared del microorganismo para poder internalizarse al citoplasma y poder seguir el proceso de regulación (Banerjee et al. 2017).

Fig. 1 Representación Quorum sensing en Microorganismos

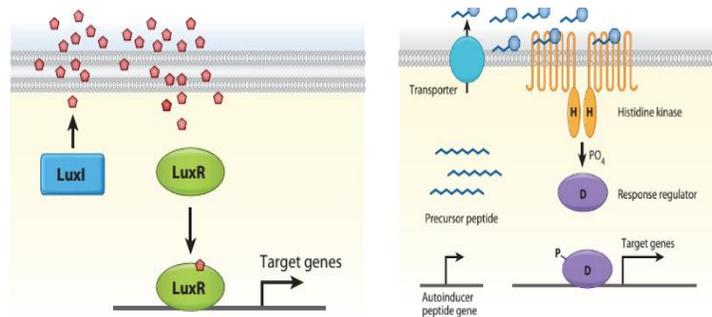


Fig. 1 Representación esquemática de los modelos ejemplificados del proceso Quorum sensing en microorganismos Gram-negativa (izquierda) y Gram-positivos (derecha); imagen tomada de Ng, 2009

El primer mecanismo de QS fue descrito en el modelo de estudio Gram-negativo *Vibrio fischeri*, su sistema QS ayuda al microorganismo a controlar y regular la reacción de bioluminiscencia; en su arquitectura básica este sistema se compone de dos proteínas; una proteína LuxI, encargada de sintetizar la molécula autoinductora (AHL) y otra proteína LuxR cuyo rol principal es el de regulador transcripcional y receptor del autoinductor AHL, para el control del fenotipo; estas dos proteínas están codificadas en los genes *luxI* y *luxR* respectivamente (von Boodman, 2008), por una parte la proteína LuxI está organizada en el operón *luxICDABE* (simultáneamente este operón también cuenta con los genes necesarios para la reacción de luminiscencia *luxAB*; mientras que la sección *luxCDE* es parte del sistema de reductasa esencial para la biosíntesis de la molécula aldehído-luciferasa) (Reuter, 2016) el procesos de regulación se detalla de manera esquemática en la siguiente figura:

Fig. 2 Quorum sensing en *V. fischeri*

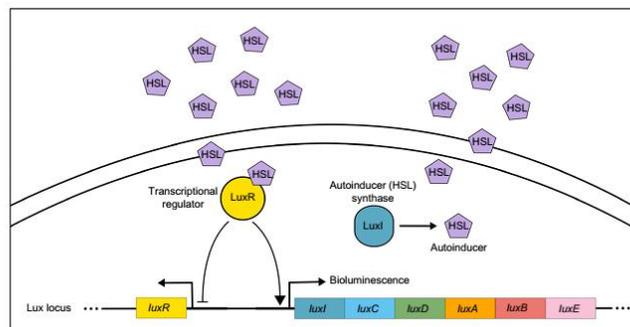


Fig. 2 Esquema del sistema de comunicación bacteriana de *V. fischeri*: en el cual se demuestra la relación el proceso de interacción entre la molécula AHL y el regular transcripcional LuxR, dando como resultado un loop

de regulación tanto del sistema propio de QS así como del operón encargado de regular la expresión del fenotipo relacionado con la bioluminiscencia (imagen tomada de Reuter, 2016).

La arquitectura de los sistemas QS en microorganismos Gram-positivos se diferencia de los QS en Gram-negativos por el autoinductor utilizado en el mecanismo de señalización (LaSarre y Federle, 2013), en sistemas QS de bacterias Gram-positivas son péptidos las moléculas empleadas como señales de comunicación. Estos péptidos (sintetizados por ribosomas) poseen una estructura química ampliamente diversa y frecuentemente estas moléculas señal presentan modificaciones pos transcripcionales antes de salir al exterior bacteriano; son llamados péptidos autoinductores (AIP) (Verbeke et al. 2017); entre algunos géneros bacterianos en que se ha estudiado y analizado este mecanismo de comunicación, y su relación con fenotipos específicos de comportamiento social, tenemos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus thuringiensis* (Lasarre, 2013), así como a *Clostridium perfringens* (Ohtani, 2009) y *Clostridium botulinum* (Cooksley, Davis et al. 2010).

### **QS en bacterias Gram-positivas**

Debido a la naturaleza proteica del autoinductor, en los sistemas QS de las bacterias Gram-positivas la presencia de un sistema de transporte del exterior al interior celular es requerido para completar el ciclo de comunicación (Ng et al. 2009); dicho esto se puede decir que en cambio a los sistemas QS de bacterias Gram-negativas, las bacterias Gram-positivas reconocen las señales de comunicación por medio de un sistema de proteínas asociadas a membrana, cuyos dominios activos son del tipo histidina quinasa, a este tipo de sistema de captación de señales se les conoce como sistemas de dos componentes, cuando existe una alta concentración de AIP en el ambiente, el péptido señal se une y activa la proteína sensora; la activación de esta proteína (histidina quinasa) induce una activación por fosforilación de la siguiente proteína en el sistema de señalización, proteína regulador-receptora (sistema de dos componentes), lo que induce los cambios en el comportamiento del microorganismo a un comportamiento social coordinado (Ivanova et al. 2015), algunos ejemplos de sistemas de comunicación bacteriana en bacterias Gram-positivas son las siguientes:

## Regulación de factores de virulencia en *S. aureus*:

En este microorganismo el principal mecanismo de regulación para factores de virulencia, se encuentra relacionado con los sistemas de comunicación bacteriana (Jenul y Horswill, 2018), el principal sistema es el llamado sistema Agr (Cheung et al. 2011). Este sistema de comunicación (el cual se ha demostrado presente en otros microorganismos Gram-positivos como *C. botulinum*) en *S. aureus* está constituido por dos unidades transcripcionales, RNA II (sistema Agr) y RNA III. RNAII cuenta con cuatro genes del sistema Agr (*agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*). Las unidades transcripcionales son transcritas en direcciones opuestas, RNA III es opuesto a RNA II en el sentido de transcripción, es decir que los genes del sistema Agr se transcriben como un único mensaje siguiendo la secuencia *agrBDCA* (Jenul y Horswill, 2018). AgrD contiene la secuencia peptídica, conocida como protopéptido (péptido señal inmaduro) que funciona como péptido precursor de la molécula señal en el sistema QS llamado “péptido autoinductor” (AIP), el cual es secretado fuera de la célula por medio del transportador AgrB. AgrB, es una proteína de exportadora asociada a membrana (Wang y Muir, 2016) la cual además de transportar al exterior el AIP del sistema QS es la encargada de hacer modificaciones postraduccionales para transformar a AgrD en un AIP maduro. Al unirse AgrD a AgrB, la proteína de membrana induce la formación del anillo tiolactonado, conformación activa del AIP uniendo un dominio conservado de cisteína (serina) en AgrD con la sección C-terminal de AgrD (Jenul y Horswill, 2018). Al sufrir estas modificaciones postraduccionales la señal activa (AIP) es liberada al espacio extracelular (Khan et al. 2015).

Posterior a la liberación, y para completar el ciclo de comunicación, en este sistema también se ubica otra proteína de membrana que se encarga de censar y ser el receptor del AIP para la regulación del sistema QS; la acción de censado se lleva a cabo por el receptor de señal, una proteína histidin-cinasa asociada a membrana “AgrC” (Tan et al. 2018). AgrC al recibir la señal (en su sección N-terminal) y unirse al AIP se induce una trans-autofosforilación de AgrC, desencadenando una cascada de señalización, culminando en la activación subsecuente de la proteína AgrA (Khan et al. 2015), una vez activa la proteína AgrA esta se une a la región promotora en el ADN bacteriano (P2 para RNAII y P3 para RNAIII); al unirse a la región promotora P2 se induce un ciclo de auto activación para el

sistema Agr, perpetuando el ciclo de expresión de y secreción de AIP para continuar aumentando la concentración de AIP en el espacio extracelular (Jenul y Horswill, 2018). En el sistema de auto regulación AgrA activado tiene una mayor afinidad por el promotor P2 que al promotor P3 (RNAIII), por lo que a bajas concentraciones de AgrA activo, el sistema es propenso a reactivar el ciclo de regulación para la secreción de un mayor número de AIP; al llegar a un umbral de concentración y tener una mayor abundancia de moléculas AgrA activas ambas regiones promotoras se ven activadas por parte de AgrA (Chengoun, et al 2011). Por último, RNAIII funge como un regulador maestro para la regulación de factores de virulencia (toxinas o formación de biopelícula) en *S. aureus* (Tan et al. 2018) (fig. 3).

Como lo menciona en su estudio Chengoun, et al 2011 demuestra la relación entre el sistema Agr y la fuerte expresión de factores de virulencia, tales como toxinas y exoenzimas, además de un incremento en la facilidad de invasión de abscesos de piel en modelos animales por parte de la cepa altamente virulenta CA-MRSA de *S. aureus*.

Fig. 3 Quorum sensing *S. aureus*

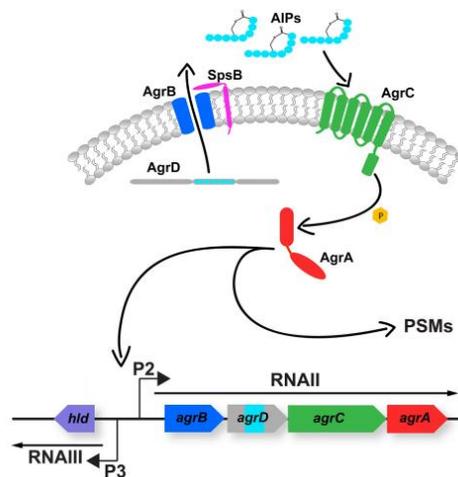


Fig. 3 Esquema estructural del sistema de comunicación Agr de *S. aureus*. En el sistema se indican la presencia de otra proteína (SpsB) que junto a AgrB ayudan a madurar a AgrD en un AIP maduro (imagen tomada de Jenul y Horswill, 2018)

Otro modelo de los sistemas de comunicación de QS en los microorganismos Gram-positivos es el sistema de competencia (Com) observado en *Streptococcus pneumoniae*; la

arquitectura de este sistema de comunicación tiene una estructura similar al (también en función) sistema de comunicación Agr de *S. aureus*.

El sistema de *S. pneumoniae* está formado por el operón ComABCDE, este sistema QS está regulado por un péptido de estímulo de competencia (CSP) el cual está codificado por el gen *comC*, el cual de la misma manera que el inductor AIP de *S. aureus* (Galante et al. 2015) sufre modificaciones transcripcionales al momento de ser exportado al espacio extracelular por un transportador dependiente de ATP “ComAB” (Luo y Morrison, 2003), de la misma manera que en el modelo de *S. aureus*, para cerrar el circuito de comunicación QS. *S. pneumoniae* cuenta con un receptor de membrana, una proteína histidina cinasa que se adhiere a CSP para internalizar la señal de comunicación por una cadena de fosforilación; la proteína encargada de censar a CSP es ComD (Weyder et al. 2018), al momento de unirse CSP causa un cambio conformacional en ComD, el cual induce su autofosforilación. Este grupo fosfato activo se traspa como señal de activación desde ComD a la proteína de unión al ADN (Slager et al. 2018), por último, ComE en su forma activa reconoce su sitio de unión específico (promotores) para la activación de los genes regulados por dichos promotores (Galante et al. 2015) (Fig. 4).

Esta ruta de comunicación en el género *Streptococcus* se encarga de la regulación de metabolitos secundarios como bacteriocinas (junto con el sistema BlpABCSRH), así como regular la formación de biopelícula por parte del microorganismo (Knutsen et al. 2004).

Fig. 4 Quorum sensing *S. pneumoniae*

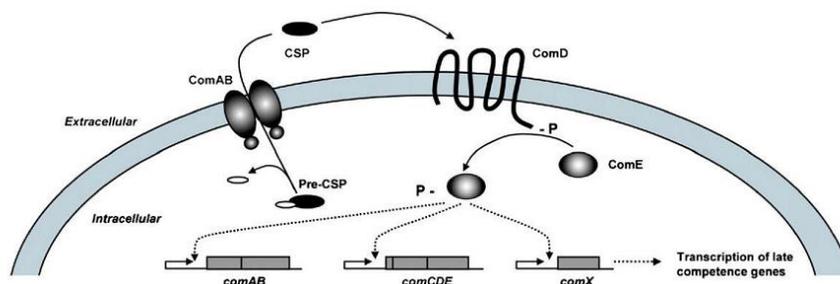


Fig. 4 Sistema de comunicación ComABCDE en *S. pneumoniae*, este esquema representa el ciclo de producción de señal y recepción de la misma tanto para perpetuar el ciclo de auto regulación así como la regulación de otros genes relacionados a dicho sistema de comunicación (imagen tomada de Galante et al. 2015)

## Sistema de regulación en *Bacillus cereus*

Este microorganismo emplea el sistema de comunicación QS relacionado a un autoinductor proteico para la regulación, producción y secreción de factores de virulencia tales como: fosfolipasas, hemolisinas y toxinas (Banerjee et al. 2017).

El sistema QS de *B. cereus* (fig. 5) se caracteriza por emplear un AIP derivado del gen PapR y un factor transcripcional PlcR. En primera instancia PapR es activado de manera extracelular por NprB (proteasa neutral B), codificada por los genes *plcR* y *nprB*, los cuales a su vez son activados por la presencia del AIP-PlcR. Después de ser modificado en el espacio extracelular el AIP es internalizado por un sistema oligopéptido permeasa (Opp) el cual está unido a PlcR, este factor transcripcional al ser activado por el ciclo anteriormente mencionado se encarga de regular una serie de factores de virulencia tales como: enterotoxinas, hemolisinas y proteasas (Haque et al. 2018).

Fig. 5 Quorum sensing *B. cereus*

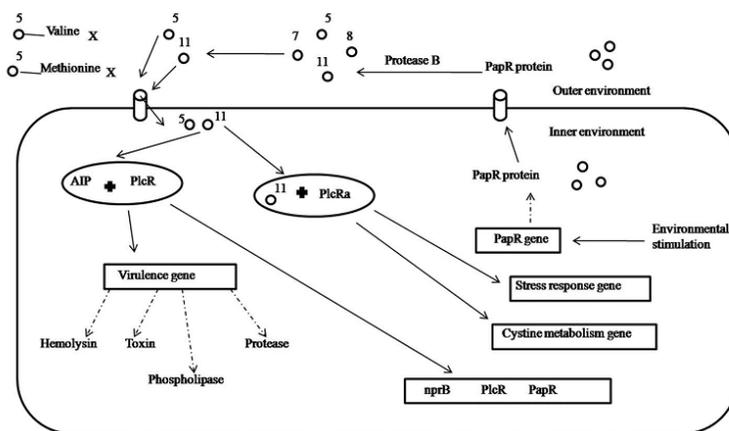


Fig. 5 Imagen que demuestra el sistema QS de *B. cereus*, este sistema de comunicación regula varios factores de virulencia por la activación y ciclo de excreción y reintroducción del AIP por la proteína PapR, imagen tomada de Banerjee et al. 2017.

Por último en el modelo de estudio de *C. perfringens* el sistema de comunicación Quorum sensing está formado por un sistema similar al de *S. aureus* llamado sistema CpAL (*Clostridium perfringens* Agr-like system), en el cual se presentan los genes *AgrBD* dentro del microorganismo que cumplen con la misma función observada en *S. aureus* (Vidal et al. 2015), sin embargo los genes faltantes del sistema Agr (*AgrAC*) son sustituidos en *C.*

*perfringens* por los genes *Vir*, o sistema de dos componentes *VirR/VirS*, de la misma manera RNAlII de *S. aureus* es sustituido en *C. perfringens* por VR-RNA, cumpliendo con las mismas funciones de regulación de factores de virulencia que se muestran del sistema Agr en *S. aureus* (Ohtani et al. 2009) (fig. 6).

Fig. 6 Quorum sensing *C. perfringens*

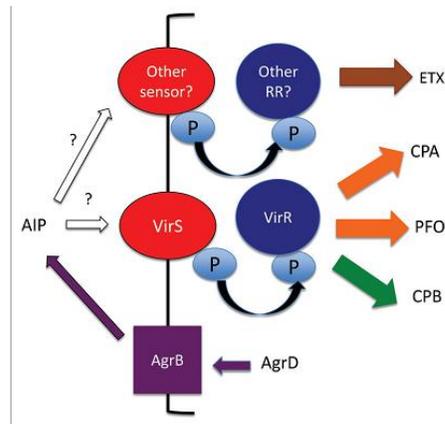


Fig. 6. Representación esquemática del ciclo de regulación del sistema quorum sensing en *C. perfringens*; en el esquema se observa la interconexión entre los sistemas VirR/VirS y el sistema CpAL donde los genes *agrB* y *agrD* cumplen las mismas funciones que en el modelo de estudio *S. aureus*. La imagen muestra la interconexión entre el sistema QS y la regulación de los factores de virulencia en *C. perfringens*. Imagen tomada de Chen et al. 2014

Se ha reportado un efecto regulador en el sistema QS por la presencia de algunos compuestos a base de extractos de plantas, lo cual abre la puerta a alternativas como inhibidores de estos mecanismos y de las rutas sintéticas o expresión de genes dependientes de dichas señalizaciones (Monte et al. 2014).

### Esporulación y enterotoxina

La capacidad de formación de esporas, producción de biopelículas, y producción de enterotoxina hacen de *C. perfringens* un microorganismo altamente peligroso y su control, una prioridad.

Se ha demostrado que existe una relación estrecha entre el proceso de esporulación y la secreción de enterotoxina (CPE) de *C. perfringens*, y entre el QS y la formación de

biopelícula (Martin et al. 2015). Las moléculas reguladoras (inductoras) de la cascada de señalización de biopelícula regulan la expresión de CPE (Vidal et al. 2012); igualmente se ha demostrado que la biopelícula es un ambiente óptimo para la esporulación (Branda et al 2001, Hamon et al 2001). En particular *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. Comparten una cascada regulatoria de la esporulación en donde el regulador maestro de la esporulación, Spo0A, se requiere para la formación eficiente de biopelícula (Steiner et al. 2011; Huang et al. 2004). Detener el proceso de señalización QS de las bacterias patógenas es una estrategia para considerar, al buscar evitar la expresión de factores de virulencia y patogenicidad (Khan et al. 2009).

Dado que los inductores del QS son altamente específicos de especies bacterianas, en *C. perfringens* la molécula inductora es conocida como Sustancia A, que es capaz de estimular la producción de toxinas a través del sistema de señalización “Agr-like QS” (Ohtani et al. 2009). También, la esporulación se ha correlacionado con este sistema regulador “Agr-like QS” (Ohtani et al. 2013). Spo0A es la proteína reguladora primaria del proceso de esporulación. Al ser fosforilado Spo0A inicia la activación de factores sigma específicos de esporulación (*sigF*, *sigE*, *sigG* y *sigK*) (Ohtani et al. 2013), además esta proteína es importante en la producción de enterotoxina (Huang et al. 2004). Defectos en los sistemas de respuesta al estrés térmico conllevan una disminución de la capacidad de resistencia de las esporas, una reducción en la expresión de los genes de esporulación *spoA* y *sigF*, que provocan defectos en el proceso de esporulación (Fimlaid et al. 2013).

Otro sistema de regulación propuesto para el control de la esporulación en *C. perfringens* es la expresión del gen *virX*, involucrado en la producción de la enterotoxina, el cual está regulado por los factores Sigma SigE y SigK, los cuales a su vez son reprimidos por *virX* (Ohtani et al. 2013). Sin embargo, se ha visto que la expresión de los factores Sigma *sigF*, *sigE*, *sigK* y *sigG*, que son inductores de la esporulación, tienen una regulación negativa sobre *virX* (Ohtani et al. 2013). Por lo que la búsqueda de mecanismos de inhibición para los factores de virulencia, uso de agentes de bloque o degradación del sistema de señalización QS, resultan alternativas atractivas para el control adecuado de estos microorganismos (Mukherji y Prabhune, 2014).

Cambios drásticos de temperatura, ausencia de nutrientes, radiación UV o cambios de presión osmótica inducen la esporulación bacteriana, como defensa ante los ambientes de riesgo (Arráez, 2002). En la industria alimentaria durante su procesamiento hay cambios constantes de las condiciones de nutrientes, capacitando a aquellas células vegetativas, que no llegan a morir a iniciar el proceso de formación de esporas (Peña et al. 2009). Para evitar este proceso, aunado a los procesos rutinarios del proceso y mecanismos de desinfección, se han propuesto procesos alternos en los que se incorporan agentes antimicrobianos que incrementan la susceptibilidad del microorganismo (Peña et al. 2009).

La sensibilización al calor de las esporas, se logra por la pérdida de enzimas encargadas de la eliminación de los radicales oxidantes (Setlow y Setlow, 1998). La incorporación de sustancias con actividad antimicrobiana como la nisina ha logrado disminuir la capacidad de resistencia de células de *B. cereus* y *A. acidoterrestis* al proceso de pasteurización de néctares y jugos comerciales (Yamazaki et al. 2000). De la misma forma se ha reportado que una combinación de nisina, junto con la exposición de la spora a altas temperaturas, pero menores a los usados en procesos tradicionales de pasterización, producen células con mayor sensibilidad al proceso de desinfección por temperatura (Komitopoulou et al. 1999).

Aunado a lo anterior, la resistencia a antimicrobianos por parte de cepas patógenas ha hecho surgir la necesidad de la aplicación de alternativas antimicrobianas novedosas, cuyo objetivo sea no solo la inhibición del patógeno sino, en caso de que no sea posible, lograr inhibir los factores de virulencia (García et al. 2002). Se ha visto que la actividad microbicida de un compuesto se puede incrementar dependiendo de las condiciones fisicoquímicas circundantes, un aumento de la temperatura en un proceso de desinfección puede lograr a que un compuesto logre su actividad con una concentración menor a la requerida en condiciones normales (Russell, 1990).

### **Estrés Térmico**

Las técnicas térmicas de preservación de alimentos producen una variedad de estreses en los microorganismos. *C. perfringens* induce una respuesta al estrés después de una exposición a tratamientos de calor, frío o ácido entre otros (Heredia et al 2008). La aplicación

de un choque térmico genera la inducción de proteínas del estrés y retrasa la producción de esporas y de enterotoxina, pero incrementa la tolerancia al calor de las células vegetativas y de las esporas formadas. La información sobre la participación del QS en la tolerancia al calor es muy escasa, solo se ha descrito que el QS participa en la regulación de genes de proteínas del estrés universales en *Burkholderia glumae*.(Goo et al. 2010) y que logran contener a cambios graduales, o extremos, a condiciones de temperatura por medio de complejos sistemas de regulación y censado del ambiente (cambios de temperatura) (Shapiro y Cowen, 2012) y que cambios graduales en esta condición fisicoquímica del ambiente, logran desencadenar una serie de respuestas fisiológicas por parte de los microorganismos (Arráiz, 2002).

En los organismos esporulantes (cepas del genero *Clostridium* como *C. perfringens*) la esporulación, acarrea la expresión de toxina (CPE) y posterior segregación en la fase de liberación de la spora (García et al., 2019).

Las bacterias logran contener a cambios graduales, o extremos, a condiciones de temperatura por medio de complejos sistemas de regulación y censado del ambiente (cambios de temperatura) (Shapiro y Cowen, 2012). Cambios graduales en esta condición fisicoquímica del ambiente, logran desencadenar una serie de respuestas fisiológicas por parte de los microorganismos (Arráiz, 2002) incrementando las proteínas estabilizadoras (Chaperonas), y proteínas de estrés oxidativo (Pinto et al. 2014), causando modificaciones en la composición de la biopelícula segregada (Obana et al. 2014). Estas entre otras son algunas respuestas de los microorganismos a cambios moderados de temperatura en el ambiente en que se desarrollan. (Pinto et al. 2014)

La aplicación de compuestos capaces de contener con estos sistemas, muestra un amplio campo de aplicación al ser combinados con otros procesos (estrés térmico) dentro de la búsqueda de la inocuidad alimentaria. Al sensibilizar al patógeno a otros procesos como cambios de temperatura (Komitopoulou et al. 1999)

### **Respuesta a estrés térmico**

Como respuesta a incremento en la temperatura ambiental *C. perfringens* induce cambios estructurales en la biopelícula, un incremento en ADN extracelular lleva a un estado

de mayor capacidad de adherencia, se determina un incremento de proteínas extracelulares como mecanismo de protección al estrés térmico (Obana et al. 2014). Así mismo se reporta un incremento de proteínas estabilizadoras (Chaperonas), y proteínas de estrés oxidativo, capaces de estabilizar a las células de *C. perfringens* (Pinto et al. 2014). Estas respuestas al estrés térmico por parte de *C. perfringens* pueden dar como efecto colateral la capacidad de resistencia a otros estreses, tales como la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana (Martin et al. 2015; Nazzaro et al. 2013).

Dentro de los sistemas de respuesta al estrés térmico de *C. perfringens* en 2008 Li y McClen determinaron la capacidad de cepas de *C. perfringens* de segregar proteínas de bajo peso molecular las cuales les proporcionan un incremento en la resistencia a la respuesta a estrés térmico.

La modificación en la síntesis de las proteínas DacB y Spm en *C. perfringens* induce un incremento en la sensibilidad de las esporas bacterianas a tratamientos térmicos (Paredes-Sabja et al. 2008)

En 2013 Ohtani y colaboradores determinaron la relevancia de la proteína SpoOA en la regulación de los sistemas de esporulación y formación de biopelícula, mismos sistemas que son regulados por un sistema de señalización celular "Agr-Like" de QS. Alteraciones en la expresión de SpoOA llevan a una sensibilización de esporas a tratamientos térmicos, y una desestabilización de las células vegetativas de *C. perfringens* a cambios graduales de temperatura.

La acción de compuestos antimicrobianos combinados con tratamientos térmicos ha probado tener más eficacia que la aplicación del tratamiento térmico individualmente (García et al. 2002; Yamazaki et al. 2000).

### **Estrategias anti-virulencia como alternativa en el control de microorganismos patógenos.**

Algunas estrategias para el control de microorganismos en la industria, es la modificación de las condiciones ambientales que resulten letales para los microorganismos, entre las cuales podemos mencionar: modificaciones en la temperatura, del pH, salinidad

(Leistner, 2000) o presencia de compuestos antimicrobianos (Saeed et al. 2019). Sin embargo, dentro del ambiente de la salud pública la principal manera de combate en contra de microorganismos patógenos es la aplicación de compuestos antimicrobianos (Jiang et al. 2019).

Los antibióticos son utilizados comúnmente para prevenir infecciones bacterianas y enfermedades relacionadas, sin embargo, la evidencia emergente indica que los tratamientos tradicionales para la contención de patógenos se han comprometido, debido a la emergencia de patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos de uso convencional (Asfour, 2018). La mayoría de los antibióticos imponen una presión de adaptación acelerada a los microorganismo, generando una respuesta rápida, tanto genotípica como fenotípica, de los microorganismos en contra del compuesto inhibidor (Haque et al. 2018).

Debido al abrupto incremento en la resistencia a compuestos antimicrobianos, han surgido nuevas estrategias o terapias de control de microorganismos, en las que se buscan evitar la presión de selección que se ha visto en los antibióticos, con el fin de evitar la emergencia de nuevas clonas en los patógenos con resistencia aumentada (Defoirdt et al. 2018), entre las estrategias resaltan aquellas enfocadas en inhibir o reducir la patogenicidad o virulencia del microorganismo, estas estrategias se basan en estudiar las principales rutas bioquímicas que se relacionan con la virulencia del microorganismo y bloquear directamente el proceso de regulación de los factores de virulencia bacteriana, en lugar de la erradicación, así como facilitar la eliminación de patógenos por otros tratamientos (tecnología de barreras), disminuyendo la presión selectiva, al no ser letal, evadiendo la respuesta de adaptación de los microorganismos (Haque et al. 2018).

La estrategia anti Quorum sensing (anti QS, también llamada Quorum Quenching), es una de las estrategias anti-virulencia más prometedoras comparada con otras como, inactivar las toxinas o la eliminación física de la biopelícula (Krzyżek, 2019), en esencia la estrategia anti QS busca mitigar la patogenicidad de los microorganismos e inhibir los efectos secundarios de infecciones por patógenos (Chemmutgil et al. 2019), fundamentándose en la aplicación de agentes químicos para el bloqueo de los sistemas de comunicación bacteriana, bloqueando por ende los fenotipos (perjudiciales para el humano) resultantes de la interacción comunitaria bacteriana; tales como la formación de biopelícula, producción de

enzimas líticas extracelulares o secreción de toxinas (Vasavi et al. 2016). Buscar el bloqueo de las rutas de comunicación QS presentan una alternativa prometedora de tratamiento en contra de patógenos de alta importancia, inhibir los circuitos de QS reduce la presión de adaptación y por ende bloquea el desarrollo de adaptación por presión selectiva (Haque et al. 2018).

Esta estrategia al mismo tiempo se fundamenta en la premisa que relaciona el sistema QS con los factores de virulencia:

“Los sistemas de comunicación bacteriano QS, un sistema dependiente de la densidad celular, han mostrado ser los sistemas controladores de una amplia variedad de fenotipos como los son: la bioluminiscencia, secreción de toxina, formación de biopelícula, resistencia a antibióticos y movilidad bacteriana. Es por ello por lo que la inhibición del QS se relaciona con la inhibición de dichos factores, pues se han visto estrictamente bajo el control de los sistemas de comunicación QS” (Hossain et al. 2017).

Las diferentes rutas que puede seguir la estrategia anti QS son: Inhibición en la síntesis de AI, antagonismo por el receptor de membrana del AI, inhibición de sitios de unión del AI en receptores de regulación, secuestro del AI, degradación del AI, inhibición de secreción o rutas de transporte del AI (Asfour, 2018).

Uno de los primeros compuestos en ser estudiados como inhibidores del QS, fueron los compuestos derivados del alga roja *Delisea pulchra*, estos compuesto son las furanonas y sus derivados, los cuales han comprobado tener un alto potencial como agonistas de los compuesto Acil-homoserin lactonas, autoinductores empleados en los sistemas canónicos de comunicación de microorganismos Gram-negativos (Santhakumari y Ravi, 2019).

Así mismo otros compuestos como el metil galato, que se identificado como un agente inhibidor de biopelícula en *P. aeruginosa* (PAO1) (Hossain et al. 2017); algunos compuestos derivados del crecimiento de *L. reuteri* inhiben la expresión de factores de virulencia en *S. aureus* (Li, Wang et al. 2011); mientras que el diterpeno fitol reduce la formación de biopelícula, la movilidad tipo Twitching y la movilidad flagelar de *P. aeruginosa* (PAO1) (Asfour, 2018), entre otros ejemplos en donde se aplican compuestos cuyo principal objetivo

es la inhibición de factores de virulencia bloqueando el sistema de comunicación bacteriana QS.

A pesar de que las estrategias anti-virulencia, en especial anti QS, son prometedoras para reducir la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos aún quedan muchos puntos a investigar, dado que es necesario buscar el mecanismo por el cual el sistema QS es bloqueado, buscando tener la información necesaria para la correcta aplicación de dichos compuestos.

### **Bacterias ácido lácticas y probióticos, alternativas bacterianas en las estrategias anti-virulencia.**

Las bacterias ácido lácticas son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados y con la característica que en su metabolismo el producto final del mismo es el ácido láctico (Papadimitriop et al. 2016), este género de microorganismos ha sido ampliamente utilizado por su variedad de actividades biológicas que aportan un beneficio al desarrollo humano (Vieco-Saiz et al. 2019).

Desde la antigüedad han sido aplicados en la industria alimentaria como conservadores, alimentos procesados, y como aditivos alimentarios que enriquecen el valor nutricional de algunos alimentos (Gogineni et al. 2013). Dentro de la fisiología de los mamíferos, estos microorganismos aportan un amplio grupo de compuestos químicos que ayudan en la homeostasis del sistema digestivo, tales como los ácidos grasos de cadena corta “SCFA” (Surendran Nair et al. 2017), dentro del intestino delgado se ha visto que estos organismos son los responsables de mantener las condiciones ambientales necesarias para evitar la propagación de posibles microorganismos patógenos (Gogineni et al. 2013). Estos organismos que ayudan en restablecer la microbiota intestinal en animales, evitando o contrarrestando las diarreas asociadas a antibióticos, así como combatir infecciones de *C. difficile* (Gogineni et al. 2013). La principal estrategia que usan para regular a microorganismos patógenos es la posibilidad de generar ambientes estresantes para estos organismos, al secretar ácidos orgánicos al ambiente (Papadimitriou et al. 2016) o por la producción de compuestos antimicrobianos, de naturaleza proteica, denominados bacteriocinas (Goyal et al. 2018).

Observando todas las características benéficas de este género microbiano, a gran parte de los organismos pertenecientes a este grupo de microorganismos se le acuñó el término de probiótico, el cual es el término empleado para clasificar a los microorganismos vivos que, cuando son administrados en dosis adecuadas, tienen una actividad benéfica para el organismo hospedero (Galvano et al. 2015), este mismo autor menciona que entre las funciones que cumplen en el hospedero se mencionan la regulación de la microbiota intestinal por la producción de ácidos orgánicos, reducción del pH, la producción de compuestos antimicrobianos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y la estimulación del sistema inmune.

De la misma manera los probióticos inducen un efecto protector y de prevención en las personas contra enfermedades tales como: gastroenteritis viral, algunos desordenes alérgicos pediátricos, enterocolitis necrozantes, enfermedad del intestino inflamado (Vuotto et al. 2014).

Entre los microorganismos que revisen este título se encuentran: *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *B. longum* y *B. lactis*, entre otros (Galvano et al. 2015).

El agente productor de bacteriocinas *L. lactis*, es la principal fuente de conservador de alimentos nisina, agente antimicrobiano de origen bacteriano con estatus GRAS dentro del codex alimentario (Muriana et al. 1993), inclusive estos compuestos bacterianos han demostrado tener un efecto inhibitorio contra agentes patógenos Gram-positivos tales como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Mathur et al. 2018).

La nisina (Özel, Şimşek et al. 2018), junto con la pediocina (Silva, Silva et al. 2018) y la sakacina (Barbosa, Todorov et al. 2014), son bacteriocinas que han demostrado tener actividad antimicrobiana e inclusive como agentes de inhibición de factores de virulencia (Park, Yeo et al. 2014).

Se ha demostrado que la aplicación de la nisina produce un efecto inhibitor en la biopelículas de *S. aureus*, inhibiendo los factores de adherencia del microorganismo, así como tener la capacidad de penetrar en la matriz del polímero extracelular para desestabilizar la estructura de la biopelícula y afectar la pared celular de los organismo dentro del cluster bacteriano (Davison et al. 2010).

Los probióticos cuenta con un potencial biotecnológico muy amplio, pues estos organismos están relacionados con procesos indispensables en los hospederos, así como muestran tener un efecto benéfico, ya sea de protección o prevención, en contra de infecciones o padecimientos por la alteración de la microbiota intestinal (Voutto et al. 2014)

### **Compuestos con actividad de anti-virulencia de bacterias ácido lácticas.**

Se ha descrito previamente que los subproductos bacterianos, como la nisina, tienen un efecto negativo en la producción de ciertos factores de virulencia, sin embargo, las bacteriocinas no son las únicas moléculas inhibidoras de virulencia producidas por las bacterias ácido lácticas.

Estudios enfocados en la facultad de inhibir factores de virulencia por parte de bacterias ácido lácticas han determinado que estos microorganismos producen compuestos de bajo peso molecular, péptidos pequeños, que pueden inhibir el proceso de regulación del producción de biopelícula o secreción de toxinas en *S. aureus* (Marthur et al. 2018), aunque son pocos los estudios que sustentan esta característica de las bacterias ácido lácticas.

Entre los compuestos que ayudan en la inhibición de factores de virulencia de microorganismo patógenos (Roy et al. 2018) , encontramos una bacteriocina parecida a Plantaricin NC8, producida por *L. plantarum* (Kretli Winkelströter, Tulini et al. 2015), así como un dipéptido cíclico producido por *L. reuteri*, el ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (l-Tyr-L-Pro) es utilizado como un compuesto anti-virulencia, que afecta los sistema de secreción en *S. aureus* (Li, Wang et al. 2011). De la misma manera la capacidad de *L. fermentum* para inhibir la adherencia de *S. mutans* a superficies, así como *L. acidophilus* y *L. plantarum* logran inhibir la capacidad de *E. coli* enterohemorrágica de adherirse a superficies celulares (Caco-2) evitando la agregación de patógeno en biopelícula (Vuotto et al. 2014).

Entre otros estudios que demuestran la efectividad de estos organismos, en contra de factores de virulencia en organismo patógenos, es el desarrollado por Kaur y colaboradores en 2018 quienes determinaron que una serie de aislados de *Lactobacillus* sp. inhibían la capacidad de *V. cholerae* de formar biopelícula, por efecto metabolitos secundarios secretados por las cepas de *Lactobacillus*.

## **Compuestos antimicrobianos derivados de plantas**

El uso de conservadores químicos en alimentos ha traído consecuencias importantes por sus implicaciones toxicológicas, lo cual ha hecho importante la búsqueda de alternativas basadas en compuestos que no provoquen efectos colaterales en la salud del consumidor (Mohamed et al., 2013); algunos de estas alternativas están basadas en derivados de metabolismo de bacterias u hongos, o de plantas. La nisina y pediocina son compuestos de origen bacteriano catalogados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés), que son péptidos pertenecientes al grupo conocido como bacteriocinas y dadas sus características bioquímicas los hacen candidatos ideales para los procesos de conservación sin tener riesgos en la salud humana (Monroy-Dosta et al. 2009). Sin embargo, la gran desventaja que presenta su uso masivo, es su alto costo. Los aceites esenciales, también han mostrado actividad bactericida, sin embargo, también presentan la desventaja de que pueden afectar las características organolépticas del producto, así como el alto costo de su producción (Maldona et al. 2013).

Recientemente los tratamientos de control contra microorganismos patógenos han tomado un nuevo enfoque, al no únicamente buscar la inhibición directa del agente infeccioso, lo cual presentaría presión de selectividad e induciría mecanismos de resistencia, sino afectar el metabolismo del patógeno evitando con esto que ahora sea virulento. Dentro de los mecanismos fisiológicos que han sido blancos de estudio se incluye a la capacidad de adherencia, el sistema QS, y la secreción de toxinas (Cegelski, et al. 2008). Al respecto, algunos aceites esenciales de plantas ornamentales han demostrado tener capacidad de inhibición en la formación de biopelícula de *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, entre otros (Nazzaro et al, 2013). Los fitoquímicos (compuestos derivados de plantas) abarcan una amplia gama de funciones biológicas que ayudan a organismos superiores (Ciaz-Carrasco et al. 2016). Algunos de estos compuestos han mostrado especificidad elevada en los organismos que pueden ser activos, esto se debe a los tipos de compuestos o receptores en el organismo objetivo y al proceso de extracción del aceite,

Nazzaro y col (2013), realizaron un estudio sobre el efecto que tienen los aceites esenciales derivados de plantas en la regulación de QS, determinando que dicho efecto es debido al bloqueo del QS, afectando con esto, todos los procesos relacionados con él, tales

como formación de la biopelícula, síntesis de factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos.

La utilización de extractos de plantas para el control de microorganismos cumple con características tales como: 1) se han utilizado durante un lapso prolongado de tiempo, 2) muchos de ellos han sido aprobados en su uso como conservadores en la industria de alimentos, 3) pueden ser sintetizados (Raybaudi-Massilia et al. 2009). Muchos compuestos obtenidos de plantas han comprobado tener un alto potencial inhibitorio del crecimiento bacteriano, afectando procesos fisiológicos de microorganismos patógenos. Su efectividad y aplicación se debe estudiar desde el procesos de extracción hasta el modo de su aplicación para entender su actividad (Samy y Gopalakrishnakone, 2010; Mohamed et al. 2013).

Los compuestos con actividad biológica derivados de plantas resultan ser en su mayoría metabolitos secundarios, tales como terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos y alcaloides, alcoholes, cetonas, aldehídos, esterres (Deryabin et al. 2019). De entro los antes mencionados los compuestos fenólicos (polifenoles y taninos) así como aceites esenciales derivados de plantas son los compuestos con actividad antimicrobiana y anti-virulencia (Shimamura et al. 2017; Yap et al. 2014; Maldonado et a., 2013).

En 2002, García y colaboradores demostraron la capacidad de inhibición en el crecimiento, formación de esporas y enterotoxina de *C. perfringens* por extractos de plantas medicinales de uso tradicional. Un total de 14 plantas fueron estudiadas, de las cuales los extractos acuosos y etanólicos de *Euphorbia postrata* Aiton., *Haematoxylon brasiletto* Karst., *Psidium guajava* L., y *Rhizophora mangle* L. fueron efectivos en la inhibición de crecimiento. Además, *Euphorbia postrata* Aiton. (en solución acuosa y etanólica), y *Psidium guajava* L. inhibieron la esporulación en la bacteria. Sin embargo, los estudios son reducidos, por lo que se requieren ampliar, para elucidar la actividad de estos compuestos, así como el mecanismo por el que llevan a cabo dicha actividad.

En general se ha observado que una dieta alta en compuestos derivados de plantas, como taninos y otros polifenoles, ayuda en el control de microorganismos patógenos como *C. perfringens* (Diaz-Carrascto et al. 2016).

## **Compuestos polifenólicos como agentes antimicrobianos y reguladores de factores de virulencia**

Los polifenoles son estructuras químicas caracterizadas por contener anillos aromáticos unidos a un grupo oxidrilo (-OH), y son parte de un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de plantas, estas moléculas representan un grupo diversificado de estructuras químicas con variadas actividades biológicas, siendo el mayor grupo de los flavonoides, como más de 10 000 estructuras identificadas (Figueira et al. 2017).

Estas moléculas han sido utilizadas como agentes de inhibición en contra del sistema de comunicación bacteriana en microorganismos Gram-negativo. Compuestos como el galato de epigallocatequina y el ácido tánico, han demostrado tener un efecto de anti QS, posiblemente esta actividad sea realizada a través de un mecanismo de inhibición similar a las furanonas, mediante bloqueando el sistema QS que utiliza AHL como molécula autoinductora (Roy et al. 2018). Compuestos tales como el pirogalol, compuesto químico parecido al metil galato en estructura, cuya estructura centra el similar al metil galato, tiene la capacidad de inhibir el sistema QS de *Vibrio harveyi* que emplea AHL como autoinductor (Hossain et al. 2017).

Los reportes indican una amplia gama de estudios que analizan el efecto en contra de microorganismos patógenos, desafortunadamente los modelos de estudio con que se han estudiado los polifenoles hasta el momento son Gram-negativos en su mayoría, por una parte tenemos a los compuestos curcumina, quercentina y el pirogalol, tienen efecto anti QS en contra del *P. aeruginosa* PAO1, reduciendo la capacidad de producir biopelícula sin embargo el mecanismo molecular de acción de los fotoquímicos no se ha determinado con detalle, los rangos de concentraciones aplicados van desde los 46.87 a los 750µg/ml (Bali., 2019).

De la misma manera la aplicación de extractos etanólico crudos, siendo los compuestos mayoritarios los polifenoles, han demostrado también tener actividad en contra del Sistema QS de *C. violaceum* y *P. aeruginosa* siendo los compuestos mayoritarios identificados la quercentina, este compuesto dependiendo de la cepa que se utilizara, las concentraciones con actividad anti QS que se emplean variaban entre los rangos de 100 a 400 µg/ml (Vasavi et al. 2016).

## **HIPÓTESIS**

Algunos compuestos naturales derivados de plantas o de microorganismos pueden inhibir factores de virulencia de *C. perfringens*, afectando la expresión de los genes relacionados a sistemas QS.

## OBJETIVOS

### General

Determinar la acción de los antimicrobianos naturales en el sistema quorum sensing “Agr-like” de *Clostridium perfringens*; interfiriendo en la esporulación, la producción de enterotoxina y la formación de biopelículas.

### Específicos

1. Determinar la actividad de antimicrobianos naturales en *C. perfringens*.
2. Determinar la actividad de antimicrobianos naturales en la esporulación, producción de enterotoxina y biopelícula.
3. Analizar el efecto de antimicrobianos naturales en el sistema QS de *C. perfringens* y su relación en la formación de biopelícula y esporulación/producción de enterotoxina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos y condiciones de crecimiento

Para el desarrollo del estudio se utilizaron dos cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina (cepas H-3 y FD-1041), además de una cepa no productora de enterotoxina (FD-1). *C. perfringens* FD-1041 fue donada por Stanley Harmon de US-FDA, Washington, D. C. y *C. perfringens* H-3 (NCTC8239 y FD-1 fueron donadas por Ronald Labbé de la Universidad de Massachusetts, Amherst, MA. Las cepas de *C. perfringens* fueron mantenidas en medio carne cocida (Oxoid, Cheshire, UK) a -20°C.

Los cultivos de trabajo fueron hechos a partir del cultivo en carne cocida, transfiriendo 100µL del cultivo en carne cocida a un volumen de 10ml del medio fluido tioglicolato (FTG) (Difco, Detroit, MI), posterior a la inoculación de hacia un choque térmico para activar las esporas de *C. perfringens* (75 °C / 15 min) y después incubaba durante 16 a 18 h a 37°C.

*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, aislados de productos fermentados comerciales y *Lactobacillus reuteri* DSM17938 fue aislado de ProTectis Biogaia (Eslóv, SE). Todas cepas fueron incubadas en 10mL de medio MRS (Oxoid, UK) en condiciones de anaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>, balanceado con Nitrógeno) durante 24 h a una temperatura de 37°C, este cultivo se denominó medio fresco de crecimiento.

Los cultivos de trabajo fueron elaborados a través de cultivar 500 µL del cultivo de fresco en 50 ml de medio MRS con las mismas condiciones de crecimiento del medio de cultivo fresco.

Todas las cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus* fueron conservadas en medio MRS con glicerol 50% a -80°C.

## **Identificación molecular de *Lactobacillus plantarum* (aislado de productos fermentados comerciales).**

Se realizó una identificación molecular de la cepa *L. plantarum* para confirmar el género bacteriano de la cepa, para ello se realizó la detección del gen 16S rADN de la cepa. Se utilizaron los primers *Lactobacillus* 16S rADN primers [LactoForward (5'-GGAGGCAGCAGTAGGGAATC-3') and LactoReverse (5'-AACTCTCATGGTGTGACGGG-3')]. El fragmento obtenido (1075pb) fue purificado con el Kit Relaiprep™ DNA Cleanup and Concentration System (Promega, WI, USA). El producto fue secuenciado en el laboratorio LANGEBIO-CINVESTAV (Guanajuato, México).

### **Compuestos antimicrobianos**

De los compuestos derivados de planta se utilizaron un total de 11 compuestos, los cuales fueron: quercentina, ácido tánico, galato de epigalocatequina (Sigma-Aldrich Mexico), naringenina, catequina, metil galato, ácido gálico, vainillina, hesperitina y brazilina. Se prepararon soluciones stock a una concentración de 2mg/ml de cada compuesto disuelto en etanol al 35%(v/v), la concentración final de alcohol presente en los ensayos es del 17%(v/v). De la solución stock se prepararon soluciones de trabajo a diversas concentraciones utilizando agua destilada como solvente y se guardaron a -20°C durante un periodo máximo de 60 días.

Como control positivo de inhibición de biopelícula se utilizó el compuesto benzbromarona (MI, USA). Para diluirlo se utilizó el mismo solvente que los compuestos derivados de planta a una concentración stock de 4mg/ml, de esta solución se elaboraron soluciones de trabajo (50 y 25mg/ml) se prepararon con agua destila y se almacenaron bajo las mismas condiciones.

Se utilizaron sobrenadantes bacterianos de las distintas cepas ácido lácticas, todos los sobrenadantes llevaron el mismo tratamiento: fueron centrifugados a 2,161 x g por 30 min a 4°C (centrifuga Eppendorf 5810, Hamburgo, DE). El sobrenadante bacteriano fue recolectado y esterilizado por filtración, utilizando filtros de nitro celulosa de 0.45µm de poro (Satorius-Stedim Biotech, Göttingen, DE). Posterior a la esterilización se llevó acabo la

neutralización de pH con NaOH 1N. Alícuotas de sobrenadantes neutralizados (50ml) fueron liofilizadas (FreeZone plus 4.5, Labconco, Kansas City, MO), y después se resuspendieron utilizando tris-buffer (Sigma-Aldrich, México) a pH 7 para su uso posterior.

El sobrenadante de *L. plantarum* fue fraccionado usando unidad de centrifugación de poro variable de Centricon (Millipore, Burlington, MA) a 2161 x g, a una temperatura de 4°C, durante 30min. Las fracciones obtenidas fueron utilizadas en ensayos posteriores.

### **Ensayo de actividad antimicrobiana**

Todos los compuestos anteriormente mencionados fueron utilizados para el ensayo de actividad antimicrobiana, se llevó a cabo una revisión preliminar de la actividad antimicrobiana utilizando el método de análisis por difusión en placa, aquellos compuestos que fueron elegidos para la siguiente ronda de ensayos fueron sometidos a la determinación de concentración mínima bactericida utilizando el método de microdilución en placa (García-Heredia, et al. 2016) ajustando el método para cada compuesto.

Para ensayos preliminares en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas se realizó el método de ensayo en pozo en medio sólido, este ensayo solo fue aplicado como ensayo preliminar para determinar los tratamientos utilizados al final, se inoculó a *C. perfringens* en medio agar infusión cerebro corazón, se realizaron pozos en los medios sólidos y en dichos pozos se colocaron (25µL) de los sobrenadantes bacterianos. Posteriormente se realizó la medición del diámetro de inhibición.

Diferentes concentraciones de los compuestos a probar (122.5 µL) fueron añadidos a una microplaca de poliestireno de 96 pozos (BD Falcon) que contenía un volumen de 122.5 µL de medio líquido infusión cerebro corazón BHI, (BD East Rutherford, NJ). Cultivos frescos de *C. perfringens* (2.5 µl of  $1 \times 10^6$  UFC/ml) fueron inoculados en cada uno de los pozos, una placa fue adicionada con agua destilada en lugar de compuesto como control negativo y un pozo sin inocular fue utilizado como control de esterilidad, el contenido de cada pozo, con excepción del control de esterilidad fueron inoculados en agar infusión cerebro corazón, incubados a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. La concentración mínima bactericida fue definida como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano ( $Abs_{630nm}$ , Bio-Tek Epoch multi-volume

spectrophotometer, Winooski, VT). Las concentraciones donde se observó crecimiento fueron cultivadas en agar infusión cerebro corazón.

### **Ensayo de cuantificación de biopelícula.**

Microplacas de poliestireno de 96 pozos (Costar, NY, US) fueron abastecidas con 125µL del compuesto a probar (con varias concentraciones subinhibitorias) y 122.5 µl de medio TGY [3% de proteosa peptona (Difco, NJ, US), 1% extracto de levadura (BD, NJ, US), 1% dextrosa (BD, NJ, US) y 0.1% de tioglicolato de sodio (Sigma-Aldrich, México)] 2X de concentración, e inoculados con 2.5 µL de cultivo fresco de *C. perfringens* ( $1 \times 10^6$  UFC/ml), se realizaron dos ensayos preliminares para la selección del compuesto final a utilizar, el primer ensayo se realizó con un tiempo de incubación de 24h. El ensayo final se realizó con los compuestos: galato de epigallocatequina, sobrenadantes bacterianos de *L. plantarum* y el control positivos benzbromarona, realizando las mediciones de biopelícula en las horas 4, 8, 16 y 24 horas de incubación, todas las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en a 630nm en Bio-Tek Epoch multi-volume spectrophotometer, Winooski, VT, para cada pozo, el cultivo ya crecido fue removido y el pozo se lavó con agua destilada y se dejó secar durante 24 h.

Posterior al secado, cada pozo fue teñido con una solución al 0.1% de cristal violeta (Sigma-Aldrich, México) durante 3 min, posterior a la tinción el pozo fue lavado con agua destilada, y después de ser lavado y secado nuevamente, se añadieron 200µL de etanol al 95% y se midió la absorbancia a 570nm, como control positivo de inhibición se utilizó el compuesto benzbromarona (Gordon, Williams et al. 2013).

La formación de biopelícula fue cuantificada mediante del BFI (biofilm formation index), aplicando la fórmula:  $BFI = (AB - CW) / G$ , donde AB es la densidad óptica medida a 570nm de las células bacterianas adheridas, CW es la densidad óptica del control sin crecimiento y G es la densidad óptica del crecimiento microbiano tomada a 630nm.

De acuerdo con los valores de BFI, la capacidad de formar biopelícula de *C. perfringens* se puede categorizar en: biopelícula fuerte ( $BFI > 1.10$ ), moderado ( $BFI = 0.70 - 1.09$ ), débil ( $0.35 - 0.69$ ) y como no formador de biopelícula ( $< 0.35$ ) (García-Heredia, García et al. 2016).

Los valores de BFI fueron normalizados para el primer tamizaje de valores aplicando una normalización del valor BFI, tomando como valor control el BFI de *C. perfringens* no tratado (Xu, Zhang et al. 2016).

### **Ensayo del efecto de proteinasa K y lisozima en la actividad anti-biopelícula del sobrenadante bacteriano**

Se realizó el ensayo de sensibilidad de los sobrenadantes bacterianos para determinar la posible naturaleza del compuesto anti-biopelícula. Este ensayo se llevó a cabo tratando el sobrenadante bacteriano de *L. plantarum* con proteinasa K (Invitrogen Waltham, MA, US) y lisozima (Sigma-Aldrich) la concentración de ambas enzimas fue de 1, 0.5 y 0.1mg/ml respectivamente. Se incubó el sobrenadante con la enzima durante 1 hora a 37°C (Goyal et al. 2018), sobrenadante bacteriano sin tratar y PBS se utilizaron como tratamientos control, de la misma manera se utilizaron las proteasas solas como control de tratamiento.

Posterior al tratamiento con proteasas, se procedió a utilizar el sobrenadante tratado y todos los controles antes mencionados en ensayos de formación de biopelícula, utilizando a *C. perfringens* H-3 con un tiempo de incubación de 24h.

### **Análisis de formación de esporas y formación de esporas durante el desarrollo de la biopelícula.**

De los compuestos seleccionados con el ensayo de biopelícula, se realizó un ensayo en medio Duncan Strong en un volumen de 1.5ml (Proteosa peptona 1.5%, extracto de levadura 0.4%, tioglicolato de sodio 0.01%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1% y rafinosa 0.4%, como fuente de carbono) y se utilizó 1.5ml de los compuestos incubados a distintas horas (2,4,6,8,10,12,14,18,20,22,24), posterior al tiempo de incubación se realizó un choque térmico (75°C/15min) para obtener esporas, posterior al choque térmico, se realizó la incubación en agar infusión cerebro corazón para el recuento de colonias.

Para determinar la formación de esporas bajo las condiciones de formación de biopelícula, se usaron microplacas de 12 pozos de poliestireno (Costar, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MD) fueron abastecidas con 1.5ml de compuestos a probar (LP-S, 10LP-S, 30LP-S y Galato de epigallocatequina) a varias concentraciones y 1.2ml de caldo

TGY 2X. Los pozos fueron inoculados 30µL de cultivo de *C. perfringens* (1X10<sup>6</sup> UFC/ml), las microplacas fueron incubadas durante 24h en condiciones de anaerobiosos a 37°C. Posterior al periodo de crecimiento se eliminó el medio de cultivo, se colecto el resto del crecimiento (biopelícula y células planctónicas) con 150µL de agua destilada estéril, las células fueron recolectadas por centrifugación (accuSpin Micro 17R Fisher Scientific, UK) a 15,000 x g por 5min a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con una solución de buffer fosfato (PBS) pH 7.4 (138 mM NaCl [Fermont, México], 3 mM KCl [Sigma-Aldrich, México], 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Sigma-Aldrich, México] and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [Jalmek, México]).

Las células recolectadas fueron sometidas a un choque térmico (75°C / 15min), se realizaron diluciones seriadas con PBS e incubadas en agar infusión cerebro corazón, las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 24h. Posterior al periodo de incubación se contaron el crecimiento de *C. perfringens*.

### **Ensayo de expresión de genes**

Para realizar los ensayos de expresión de genes, las cepas de *C. perfringens* fueron incubadas (16-18h) en medio fluido tioglicolato. Una alícuota del cultivo (20µL) se colocó en una microplaca de 12 pozos con 2ml de caldo TGY y el tratamiento a las concentraciones sub inhibitorias determinadas con anterioridad, la microplaca se incubó en condiciones anareóbicas por 4, 8, 16 y 24 a 37°C.

Posterior a cada periodo de incubación se procedió a hacer extracción con TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) y se realizó el protocolo TRIzol-cloroformo siguiendo las instrucciones del proveedor (MRC Inc., Cincinnati, OH). La integridad del RNA fue determinada utilizando el equipo UV-Vis Spectrophotometer (A<sub>260/280nm</sub>, NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific).

Del ARN obtenido se procedió a realizar la síntesis de cADN utilizando el kit de síntesis iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA), posterior a la obtención del cADN se procedió a realizar la PCR en tiempo real (real-time PCR) utilizando el software PikoReal™ 2.2 y equipo Real Time-PCR System (PikoReal 96 Thermo Scientific, México) utilizando el cromóforo Q SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, México).

Las condiciones del ciclo de PCR fueron: 95°C por 5 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s, 56°C por 30s y 72°C por 30s, los primers utilizados están descrito en anexo A tabla 1. Como gen normalizador “housekeeping” se utilizó el gen rRNA 16S de *C. perfringens*, se realizó la identificación de variaciones en la expresión de genes con respecto a un control sin tratamiento y utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen 2001), Ver primers anexo A tabla 1.

## RESULTADOS

### Ensayo de actividad antimicrobiana de los compuestos derivados de planta y sobrenadantes bacterianos.

Se determinó que los compuestos: ácido gálico, vainillina, hesperitina, naringenina, catequina y quercetina no presentan actividad antimicrobiana en las concentraciones máximas estudiadas (1mg/ml).

Por otra parte los compuestos ácido cafeico, ácido tánico, galato de epigallocatequina y metil galato presentaron actividad antimicrobiana, determinando sus concentraciones mínimas bactericidas (CMB) Tabla 1.

Tabla 1 CMB de compuestos naturales derivados de plantas

Compuesto	CMB
Ácido cafeico	125±0.1 µg/ml
Ácido Gálico	>1mg/ml
Ácido Tánico	25±0.3 µg/ml
Catequina	>1mg/ml
Galato de epigallocatequina	75 µg/ml
Hesperitina	>1mg/ml
Metil Galato	125±0.5 µg/ml
Naringenina	>1mg/ml
Quercetina	>1mg/ml

Tabla 1. Valores determinados de CMB para los compuestos derivados de plantas, “CMB>1mg/ml” representa un valor de CMB no determinado para dicho compuesto por estar por encima de la concentración máxima estudiada. “±” representa la desviación estándar del valor.

Por otra parte, los sobrenadantes derivados de bacterias ácido lácticas todos presentaban actividad antimicrobiana, para estos ensayos se utilizaron los sobrenadantes totales sin diluciones previas (Tabla 2).

Tabla 2 Inhibición de *C. perfringens* por bacterias ácido lácticas

<i>C. perfringens</i> cepa	Bacteria ácido lácticas (cepas)	Radio de inhibición (cm)
FD-1041	<i>L. lactis</i>	0.53±0.05
	<i>L. paracasei</i>	0.88±0.13
	<i>L. casei shirota</i>	0.57±0.30
	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	0.98±0.05
	<i>L. plantarum</i>	1.15±0.06
FD-1	<i>L. lactis</i>	0.52±0.04
	<i>L. paracasei</i>	0.78±0.27
	<i>L. casei shirota</i>	0.57±0.19
	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	1.15±0.10
	<i>L. plantarum</i>	0.97±0.21

Tabla 2. Radios de inhibición por tratamientos de bacterias ácido lácticas, todos los tratamientos anteriores se realizaron en condiciones de anaerobiosis, se determinó que todas las cepas utilizadas en el estudio tuvieron un efecto inhibitorio contra *C. perfringens*. Los sobrenadantes bacterianos se encuentran suspendidos en buffer amortiguador de pH, “±” representa la desviación estándar del valor.

De los ensayos anteriores se eligieron los compuestos Galato de epigallocatequina “EG”, como parte de los compuestos derivados de plantas, con fundamento de la actividad anti QS ya reportada (Nazzaro et al. 2013; Elizondo et al. 2010; Kusuda et al. 2006; Yoda et al. 2004) y el sobrenadante bacteriano derivado de *L. plantarum* (LP-S), este fue elegido con fundamento en la actividad anti QS reportada para cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anti biopelícula, sin embargo *L. plantarum* fue el que presentó mejor actividad anti biopelícula (Roy et al. 2018; Gorbach et al. 2017; Li et al. 2011) lo que lo hacían el mejor candidato para los siguientes ensayos. Puesto ambos compuestos presentaron una mejor actividad anti-biopelícula y antimicrobiana contra de *C. perfringens*, fueron los compuestos elegidos para estudios más a fondo (Tabla 3).

Previo a los ensayos de inhibición, formación de biopelícula y expresión de genes, se realizó la confirmación mediante secuenciación de la bacteria ácido láctica elegida. Al realizar un BLAST en la base de datos del NCBI (NCBI, 2019) del fragmento (1075pb), identificando a la cepa como una bacteria *Lactobacillus plantarum*.

Tabla 3 CMB y CMI de tratamientos EG y LP-S

<i>C. perfringens</i> cepa	EG ( $\mu\text{g/ml}$ )		LP-S ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	CMI	CMB	CMI	CMB
FD-1041	$37.5 \pm 0.2$	$75 \pm 0.5$	$48 \pm 0.7$	$61 \pm 0.1$
FD-1	$37.5 \pm 0.8$	$75 \pm 0.9$	$61 \pm 0.5$	$121 \pm 0.2$
H-3	$37.5 \pm 0.2$	$75 \pm 0.5$	$48 \pm 0.7$	$61 \pm 0.2$

Tabla 2 Valores de CMI “concentración mínima inhibitoria” y CMB “concentración mínima bactericida de Galato de epigalocatequina (EG) y sobrenadantes derivados de *L. plantarum* (LP-S), tratamientos elegidos para los siguientes pasos de actividad anti QS. “ $\pm$ ” representa la desviación estándar del valor

Teniendo los compuestos y las concentraciones a utilizar de ambos tratamientos se realizaron las cinéticas de formación de biopelícula bajo los tratamientos, así como los perfiles de expresión de genes en ambos tratamientos, las fracciones 30LP-S y 10LP-S solo fueron probadas en concentraciones de trabajo de 16 y  $24\mu\text{g/ml}$  en busca de actividad antimicrobiana, sin embargo, bajo estas condiciones ninguna de las fracciones presentó actividad antimicrobiana.

### **Biopelícula formada por *C. perfringens***

Las tres cepas de *C. perfringens* estudiadas presentan un valor de BFI, a las 24h de crecimiento, mayor a 1.09 lo que las categoriza como cepas formadoras de Biopelícula fuerte, tal como se indica en la tabla 3 y la figura 7, donde se observa que la cepa con un valor más alto de BFI es *C. perfringens* FD-1, seguida de *C. perfringens* H-3 y finalmente *C. perfringens* FD-1041, no se encontró diferencia significativa entre los valores de BFI entre *C. perfringens* FD-1 y *C. perfringens* H-3, sin embargo existe una diferencia significativa entre los valores de BFI de *C. perfringens* FD-1 y *C. perfringens* FD-1041.

Tabla 4 Cinética de formación de biopelícula en *C. perfringens* FD-1041, *C. perfringens* FD-1 y *C. perfringens* H-3.

Cepa de <i>C. perfringens</i>	Tiempo	Valor BFI
FD-1041	4	0.02±0.00
	8	0.31±0.01
	16	0.96±0.06
	24	1.35±0.11
H-3	4	0.05±0.00
	8	1.55±0.07
	16	1.07±0.05
	24	1.54±0.09
FD-1	4	0.02±0.00
	8	0.83±0.04
	16	1.56±0.06
	24	1.68±0.09

Tabla 3. En la tabla el tiempo está dado en unidades de hora y el símbolo “±” representa la desviación estándar del valor de BFI.

Fig. 7 Cinética de formación de biopelícula en *C. perfringens*

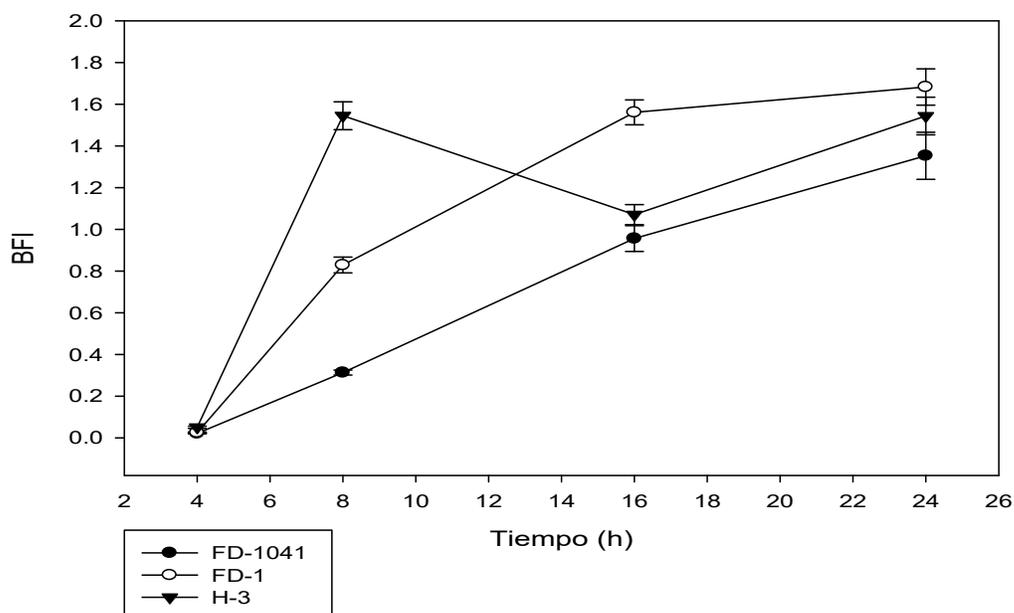


Fig. 7 Cinética de formación de biopelícula, en la imagen se observa los resultados de formación de biopelícula sin tratamiento, datos usados como base de comparación de la biopelícula formada por las tres cepas de *C. perfringens*, se aprecia un comportamiento diferente en la cinética de *C. perfringens* H-3, con una reducción del valor de BFI a las 16h, comparado con su valor a las 8h, para posteriormente tener un repunte a las 24h de crecimiento.

### Ensayo de actividad sobre biopelícula de los compuestos EG y LP-S

Ambos tratamientos tuvieron un efecto de reducción en la formación de biopelícula de *C. perfringens*. El tratamiento con “EG” produce un menor efecto cuando se compara con el tratamiento control y con el tratamiento con “LP-S” a una concentración de 24 $\mu$ g/ml. La mayor reducción en todos los casos donde fue observable se determina a las 24h del tiempo de incubación, aquí se denota con mayor claridad las diferencias en el valor de BFI del control con respecto a los valores de BFI obtenidos en los tratamientos (Tabla 4).

El tratamiento control de inhibición con benzbromarona “BZ”, se confirma su efecto en las tres cepas al ser capaz de reducir el BFI de todas las cepas, obteniendo valores de BFI por debajo del valor de ambos tratamientos tanto LP-S y GE.

Por otra parte, las fracciones de LP-S (10LP-S y 30LP-S) tienen un efecto de mayor reducción del valor BFI que el observado en el tratamiento con LP-S. Esto se observa en casi todas las cepas y todos los tiempos, solo se observó un efecto de incremento al tiempo de 4h en la cepa *C. perfringens* con la fracción 30LP-S. Por otra parte, al comparar ambas fracciones se observó una mayor reducción del valor BFI por parte de la fracción 10LP-S (Tabla 4). Por la actividad observada después del fraccionamiento de LP-S se puede sugerir que el/los compuestos con actividad anti-biopelícula de LP-S se tratan de compuestos de bajo peso molecular, menor a 10 kDa.

Los tratamientos experimentales fueron comparados con un tratamiento probado de bloqueo del sistema QS en microorganismos Gram-positivos, la benzbromarona “BZ” es un compuesto ya probado en *S. aureus* con actividad anti QS en el sistema Agr del microorganismo (Gordon Williams et al. 2013) por tal motivo fue elegido como tratamiento de comparación para el control de biopelícula, este compuesto presento una reducción en la biopelícula de *C. perfringens*, se obtuvieron valores de reducción similares observados a los tratamientos con las fracciones de LP-S (Tabla 4).

Los efectos de la benzbromarona se mantuvieron durante 24 horas de incubación en todas las cepas de *C. perfringens* probadas.

En algunos puntos de la cinética se observa un efecto de estimulación y posterior reducción de los tratamientos en la biopelícula de *C. perfringens*. En el caso particular de LP-S, se observa que el tratamiento estimula la formación de biopelícula a las 8 horas de tratamiento, sin embargo, terminado un tiempo de incoación de 16 horas se observa un efecto de reducción de la biopelícula en *C. perfringens* H-3.

En el caso de la formación de biopelícula se observa que el tratamiento con LP-S fue el tratamiento con un patrón de reducción de biopelícula similar al observado con la benzbromarona en las tres cepas de *C. perfringens*.

Tabla 5 Valor de BFI en *C. perfringens* con los tratamientos "GE" y LP-S"

Cepa de <i>C. perfringens</i>	Control * valor de BFI	Tiempo (h)	Índice de formación de biopelícula (BFI)									
			GE		LP-S		LP-S10		LP-S30		BZ	
			(Tipo de biopelícula formada)									
			6 µg/ml	25 µg/ml	16 µg/ml	24 µg/ml	16 µg/ml	24 µg/ml	16 µg/ml	24 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
FD-1041	0.022 ± 0.00	4	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
	(NB)		(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)
	0.31 ± 0.01	8	0.28 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>a</sup>
	(NB)		(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)
	0.96 ± 0.06	16	0.62 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.46 <sup>c</sup>	0.84 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.26 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.57 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.20 <sup>ab</sup>	0.46 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.14 <sup>b</sup>
	(MB)		(WB)	(SB)	(MB)	(MB)	(NB)	(MB)	(WB)	(WB)	(WB)	(WB)
1.35 ± 0.11	24	1.28 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.22 <sup>ab</sup>	1.05 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.77 ± 0.41 <sup>ab</sup>	0.22 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.31 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>c</sup>	
(SB)		(MB)	(MB)	(MB)	(MB)	(WB)	(NB)	(MB)	(NB)	(NB)	(NB)	
H-3	0.05 ± 0.01	4	0.07 ± 0.02 <sup>ac</sup>	0.10 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>
	(NB)		(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)
	1.54 ± 0.07	8	0.89 ± 0.26 <sup>bc</sup>	0.65 ± 0.39 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.37 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.54 ± 0.12 <sup>b</sup>
	(SB)		(MB)	(WB)	(MB)	(SB)	(SB)	(SB)	(MB)	(SB)	(NB)	(WB)
	1.07 ± 0.00	16	1.25 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.32 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.37 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.07 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.12 <sup>a</sup>
	(MB)		(SB)	(WB)	(WB)	(WB)	(NB)	(WB)	(WB)	(WB)	(MB)	(MB)
1.54 ± 0.09	24	1.26 ± 0.46 <sup>ab</sup>	1.09 ± 0.59 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.54 <sup>ab</sup>	0.42 ± 0.39 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>c</sup>	

	(SB)	(SB)	(MB)	(MB)	(MB)	(NB)	(NB)	(MB)	(WB)	(WB)	(WB)
FD-1	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.01 ±0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>
	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)	(NB)
	0.83 ± 0.04	0.38 ±0.23 <sup>b</sup>	0.27 ±0.1 <sup>b</sup>	0.29 ±0.12 <sup>b</sup>	0.65 ±0.09 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.12 ±0.02 <sup>c</sup>	0.58 ±0.15 <sup>b</sup>
	(MB)	(WB)	(NB)	(WB)	(WB)	(WB)	(MB)	(WB)	(MB)	(NB)	(WB)
	1.57 ± 0.06	0.88 ±0.16 <sup>b</sup>	0.93 ±0.36 <sup>b</sup>	1.15 ±0.25 <sup>b</sup>	0.94 ±0.22 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.06 <sup>bc</sup>	1.96 ± 0.55 <sup>ac</sup>	1.51 ±0.14 <sup>ab</sup>
	(SB)	(MB)	(MB)	(SB)	(MB)	(NB)	(NB)	(MB)	(NB)	(SB)	(SB)
1.68 ± 0.09	2.67 ±0.97 <sup>c</sup>	2.27 ±0.42 <sup>ac</sup>	0.92 ±0.08 <sup>b</sup>	0.97 ±0.10 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.35 ±0.05 <sup>b</sup>	0.24 ±0.03 <sup>b</sup>	
(SB)	(SB)	(SB)	(MB)	(MB)	(WB)	(NB)	(NB)	(NB)	(WB)	(NB)	

<sup>a, b</sup>: Diferentes letras indica diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ). La comparación de los valores fue realizada entre las concentraciones subinhibitorias y los valores control (cepas de *C. perfringens* sin tratamiento) por cada cepa de *C. perfringens* independiente, de la misma manera se realizaron los análisis independientes para cada compuesto o sobrenadante.

NB: no formador de biopelícula, WB: formación de biopelícula débil MB: formación de biopelícula moderada, SB: formación de biopelícula fuerte.

±: Desviación estándar.

### Ensayo de actividad contra esporulación de GE y LP-S

Se observó que ambos tratamientos carecían de actividad en contra del proceso de esporulación en *C. perfringens*, no teniendo un efecto estadísticamente significativo en la producción de esporas, de los datos finales se determina que el tratamiento GE reduce en 1 log los valores de las esporas producidas en *C. perfringens* H-3, aunque no se logró un valor importante de reducción, además de ello el efecto es cepa dependiente, el número de esporas no se reduce de manera significativa en *C. perfringens* FD-1041 (Fig. 9).

Por otra parte el tratamiento con LP-S, un efecto que se observó fue el retraso en la producción de esporas en dos horas comparado con el control sin tratamiento en la cepa *C. perfringens* FD-1041, durante las primeras horas del tratamiento, además de ello se observó

una ligera reducción en el número de esporas a las 24 horas en *C. perfringens* H-3, sin tener una reducción significativa para el tratamiento LP-S 16 ( $P = 0.765$ ), mientras que para el tratamiento LP-S 24 si se observa una reducción significativa ( $P \leq 0.05$ ), el número de esporas continua siendo elevado, resultados similares se obtuvieron para *C. perfringens* FD-1041, donde el tratamiento LP-S 16 no presenta una reducción significativa de esporas ( $P = 0.165$ ) y el tratamiento muestra una reducción mínima en la cantidad de esporas ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 8), los tratamientos no se realizaron en la cepa *C. perfringens* FD-1 al no ser observado ningún efecto en las otras dos cepas estudiadas.

Fig. 8 Efecto del tratamiento LP-S en la esporulación de *C. perfringens*

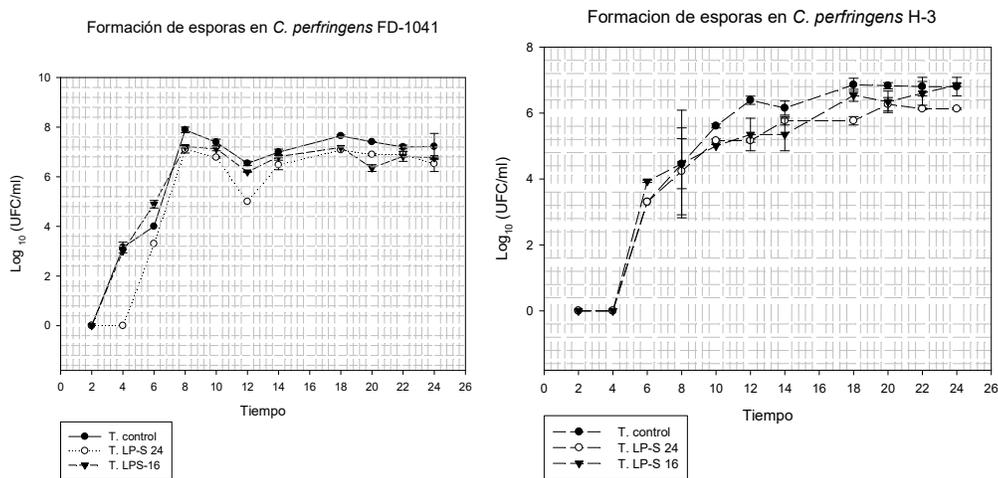


Fig. 8 Efecto del tratamiento LP-S sobre la cinética de esporulación en *C. perfringens* FD-1041 y H-3, el tratamiento no tiene un efecto significativo en la reducción de esporas de ambas cepas.

Fig. 9 Inhibición de esporas a las 24 horas ambos tratamientos

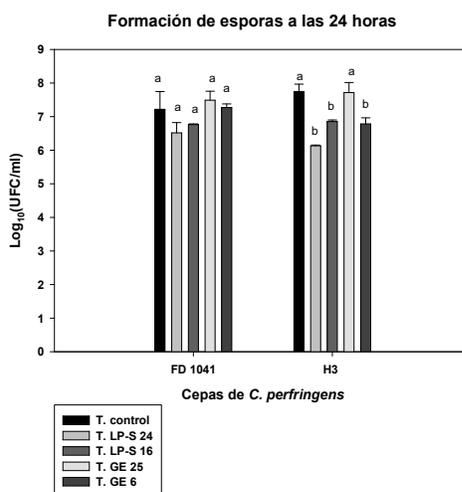


Fig. 9 Cuadro comparativo entre tratamientos, se observa una reducción en la formación de esporas en *C. perfringens* H-3, solo se observa una reducción en esta cepa y hora particular (a, significa que no hay diferencias estadística y b significa una diferencia estadística con respecto al control).

### Efecto de la proteínasa K y Lisozima en la actividad anti-biopelícula del sobrenadante bacteriano LP-S

Ambas enzimas probas tienen un efecto concentración dependiente de reducir la actividad del sobrenadante bacteriano LP-S en su actividad anti-biopelícula; se realizó el ensayo utilizando a la cepa *C. perfringens* H-3 como modelo de estudio en la activada de ambas enzimas.

Las concentraciones de 1mg/ml y 0.5mg/ml de enzima, aplicando ambas enzimas de manera independiente, reducen la actividad que tiene el tratamiento LP-S sobre la biopelícula de *C. perfringens* H-3 (Tabla 5), por otro lado, la concentración menor a la que fue sometido LP-S de 0.1mg/ml no tuvo efectos en la actividad anti-biopelícula del tratamientos LP-S.

Estos resultados sugieren que el compuesto actividad anti-biopelícula dentro de LP-S es un compuesto de naturaleza proteica con enlaces glucosídicos, esto es sugerido por la naturaleza y sitio de acción de las enzimas utilizadas.

Tabla 6 Efecto del tratamiento enzimático en la actividad anti-biopelícula de "LP-S"

Tratamientos	Concentración de enzima (mg/ml)	Valor de BFI
--------------	---------------------------------	--------------

Control	0	1.54±0.08 <sup>a</sup>
Tratamiento con LP-S	0	0.74±0.02 <sup>b</sup>
Proteínasa K	1	1.62±0.15 <sup>a</sup>
	0.5	2.17±0.17 <sup>a</sup>
	0.1	0.85±0.06 <sup>b</sup>
Lisozima	1	3.43±0.45 <sup>c</sup>
	0.5	2.94±0.45 <sup>c</sup>
	0.1	0.79±0.05 <sup>b</sup>

±: Desviación estándar <sup>b, c</sup>: Diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento control ( $P \leq 0.05$ ), para realizar la comparación en actividad anti-biopelícula se empleó el tratamiento LP-S sin ser sometido a ningún tratamiento enzimático. Todos los ensayos fueron realizados utilizando a *C. perfringens* H-3 como modelo.

### **Efecto de GE y LP-S en la expresión de genes relacionados al sistema QS CpAL y formación de biopelícula de *C. perfringens***

Para determinar el efecto de estos tratamientos se tomó como control el efecto que induce la benzbromarona en el sistema Agr, e inhibidor de la formación de biopelícula.

Como se muestra en la tabla 6. ambos tratamientos (GE y LP-S) muestran un efecto de reducción en la expresión de los genes estudiados durante las primeras horas de tratamiento (4 y 8 horas), sin embargo en posteriores tiempos de incubación (16 y 24 horas) los perfiles de expresión no presentan un parámetro definido, con algunos genes como Spo0A teniendo un incremento en la expresión basal durante las 24 horas de tratamiento, el patrón indica que una regulación en las primeras fases de la formación de la biopelícula presenta una reducción de la misma en tiempos prolongados.

Sin embargo, al analizar el tratamiento control con benzbromarona, se observa un patrón de comportamiento más estable con respecto a ambos tratamientos EG y LP-S, observándose una reducción de la expresión de los genes relacionadas al sistema Agr posterior a 24 horas de tratamiento, lo cual concuerda con la reducción observada en la formación de biopelícula.

Los genes asociados a la esporulación “HCPE” tampoco se observan alterados por los tratamientos, lo que se puede correlacionar con la ausencia de actividad anti esporas de ambos tratamientos, así como la ausencia de esporas en el medio TGY durante los ensayos de biopelícula.

Los análisis fenotípicos y de perfil de expresión de genes indican que el tratamiento EG no induce un patrón definido que correlacione la reducción de la biopelícula y la reducción en los niveles de expresión de los genes relacionados a los sistemas QS.

El tratamiento LP-S presentan un patrón similar al observado por el tratamiento GE, indicando la ausencia de una relación entre las modificaciones en los perfiles de expresión y la reducción en la formación de biopelícula por parte de las tres cepas de *C. perfringens*,

El gen *cpe*, relacionado con la producción de enterotoxina y esporulación en *C. perfringens* no pudo ser detectado durante los ensayos de formación de biopelícula, este comportamiento se mantuvo tanto en tratamientos como en controles. El resultado nos indica la ausencia de esporas en la biopelícula formada bajo condiciones en el laboratorio, pues se ha determinado que la enterotoxina de *C. perfringens* solo se produce durante el proceso de esporulación (Shen et al. 2019) a pesar de las variaciones en los niveles de expresión en *spo0A* observados en los tratamientos.

El gen *HCPE*, al igual que los genes relacionados con *CpAL agrB* y *agrD*, no presenta un patrón definido o dependiente de tiempo o concentración, en este caso ambos tratamientos EGy LP-S presentaban el mismo comportamiento.

Tabla 7 Perfil de expresión determinado para los tratamientos de EG y LP-S en *C. perfringens*

Cepa <i>C. perfringens</i>	Gene	Tiempo (h)	GE (µg/ml)		LP-S (µg/ml)	
			Valor de expresión del gen de virulencia elegido			
			6	25	16	24
FD-1041	<i>spo0A</i>	4	0.003 ± 0.58 <sup>a</sup>	-1.96 ± 0.11 <sup>b</sup>	-0.04 ± 0.51 <sup>a</sup>	-0.49 ± 0.16 <sup>a</sup>
		8	-0.9 ± 0.03 <sup>ab</sup>	-0.78 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.62 <sup>a</sup>	-0.84 ± 0.13 <sup>b</sup>
		16	-6.64 ± 2.25 <sup>b</sup>	8.08 ± 0.91 <sup>b</sup>	8.35 ± 0.71 <sup>b</sup>	4.18 ± 1.54 <sup>b</sup>
		24	7.39 ± 1.07 <sup>b</sup>	98.4 ± 37.00 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.44 <sup>a</sup>	14.58 ± 6.06 <sup>a</sup>
	<i>HCPE</i>	4	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.60 ± 1.25 <sup>a</sup>	-1.35 ± 0.06 <sup>b</sup>
		8	-0.98 ± 0.00 <sup>a</sup>	-1 ± 0.0 <sup>a</sup>	7.57 ± 5.77 <sup>a</sup>	-5.70 ± 0.07 <sup>b</sup>
		16	-1 ± 0.00 <sup>a</sup>	6.27 ± 3.45 <sup>a</sup>	5.01 ± 2.28 <sup>ab</sup>	1.68 ± 1.15 <sup>a</sup>
		24	1702 ± 251.4 <sup>b</sup>	-30.188 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.48 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.58 <sup>a</sup>
	<i>agrD</i>	4	14.02 ± 6.35 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
		8	-1.87 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.70 ± 1.1 <sup>b</sup>	-0.93 ± 0.02 <sup>b</sup>	-0.80 ± 0.13 <sup>a</sup>
		16	-0.90 ± 0.18 <sup>ab</sup>	-0.88 ± 0.00 <sup>b</sup>	-0.18 ± 0.124 <sup>a</sup>	-0.43 ± 0.11 <sup>ab</sup>
		24	483.1 ± 41.30 <sup>b</sup>	32.10 ± 5.83 <sup>b</sup>	-1.14 ± 0.00 <sup>b</sup>	8.76 ± 4.74 <sup>a</sup>

H-3	<i>agrB</i>	4	$-1.23 \pm 0.00^b$	$-1.06 \pm 0.07^b$	$0.57 \pm 0.02^b$	$-0.53 \pm 0.05^{ab}$
		8	$-0.77 \pm 0.25^a$	$4.44 \pm 1.11^a$	$1.74 \pm 0.11^b$	$-0.37 \pm 0.22^a$
		16	$-0.08 \pm 0.26^a$	$0.32 \pm 0.44^a$	$0.20 \pm 0.05^a$	$-0.20 \pm 0.00^a$
		24	$18.77 \pm 9.99^a$	$-0.47 \pm 0.28^a$	$30.27 \pm 1.04^b$	$5.65 \pm 2.78^a$
	<i>spo0A</i>	4	$-3.60 \pm 0.25^b$	$-3.84 \pm 0.19^b$	$20.50 \pm 10.74^a$	$0.85 \pm 0.28^{ab}$
		8	$3.40 \pm 3.18^a$	$4.62 \pm 2.72^a$	$1.20 \pm 0.00^{ab}$	$4.58 \pm 0.27^b$
		16	$-2.21 \pm 0.00^b$	$-2.12 \pm 0.01^b$	$0.60 \pm 0.29^{ab}$	$0.47 \pm 0.87^a$
		24	$-0.26 \pm 0.84^a$	$865.80 \pm 404^b$	$-1.27 \pm 0.25^{ab}$	$9.91 \pm 4.57^a$
	<i>HCPE</i>	4	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$
		8	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$
		16	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$
		24	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$	$1.00 \pm 0.00^a$
	<i>agrD</i>	4	$-1.44 \pm 0.00^{ab}$	$-1.24 \pm 0.08^{ab}$	$14.50 \pm 8.41^{ab}$	$42.73 \pm 12.1^{ab}$
		8	$-0.34 \pm 0.00^{ab}$	$1.55 \pm 2.04^a$	$-1.22 \pm 0.01^b$	$9.05 \pm 2.22^{ab}$
		16	$-13.56 \pm 0.02^b$	$-13.15 \pm 0.02^b$	$-1.45 \pm 0.13^b$	$-1.27 \pm 0.00^b$
		24	$-1.30 \pm 0.01^{ab}$	$0.33 \pm 0.99^a$	$-0.34 \pm 0.18^{ab}$	$14.36 \pm 3.47^{ab}$

FD-1	<i>agrB</i>	4	$-1.00 \pm 0.00^{ab}$	$-0.60 \pm 0.11^{ab}$	$-1.00 \pm 0.00^{ab}$	$-0.99 \pm 0.00^b$
		8	$0.21 \pm 0.00^a$	$3.01 \pm 2.04^a$	$0.00 \pm 0.00^a$	$8.82 \pm 0.00^b$
		16	$-2.13 \pm 0.00^b$	$2.00 \pm 1.07^a$	$15.47 \pm 5.90^{ab}$	$30.85 \pm 6.25^{ab}$
		24	$-1.23 \pm 0.00^b$	$-0.91 \pm 0.03^b$	$-1.00 \pm 0.00^b$	$19.00 \pm 4.36^{ab}$
	<i>spo0A</i>	4	$3.16 \pm 1.30^{ab}$	$8.35 \pm 0.71^b$	$-1.30 \pm 0.10^a$	$-1.70 \pm 0.00^b$
		8	$1.70 \pm 1.32^a$	$1.72 \pm 0.27^a$	$17.85 \pm 2.50^b$	$0.66 \pm 0.27^a$
		16	$8.40 \pm 3.02^a$	$-0.13 \pm 0.41^a$	$-0.19 \pm 0.47^a$	$5.94 \pm 3.90^a$
		24	$6.074 \pm 3.30^a$	$13.00 \pm 6.00^a$	$0.14 \pm 0.44^a$	$3.00 \pm 0.88^{ac}$
	<i>HCPE</i>	4	$3.15 \pm 1.71^b$	$8.10 \pm 3.40^{ab}$	$0.39 \pm 0.50^{ab}$	$-0.95 \pm 0.03^{ab}$
		8	$31.70 \pm 0.00^b$	$-1.00 \pm 0.00^{ab}$	$38.37 \pm 15.10^b$	$-0.63 \pm 0.04^{ab}$
		16	$-0.33 \pm 0.60^{ab}$	$1.11 \pm 0.30^a$	$1.14 \pm 0.30^a$	$-0.85 \pm 0.06^b$
		24	$-2.05 \pm 0.51^{ab}$	$-3.47 \pm 0.02^b$	$0.60 \pm 0.44^a$	$56.19 \pm 10.1^{ab}$
	<i>agrD</i>	4	$-0.53 \pm 0.06^{ab}$	$-0.16 \pm 0.12^b$	$-0.30 \pm 0.13^c$	$-0.57 \pm 0.10^{ab}$
		8	$-0.96 \pm 0.01^a$	$-0.58 \pm 0.23^{ab}$	$40.10 \pm 16.00^b$	$-0.94 \pm 0.01^a$
		16	$-0.71 \pm 0.02^c$	$11.34 \pm 2.49^b$	$6.80 \pm 1.90^b$	$-0.90 \pm 0.00^c$
		24	$16.00 \pm 6.60^a$	$30.55 \pm 11.00^{ab}$	$2.92 \pm 2.26^a$	$585.00 \pm 97.05^a$

	4	-0.41 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.20 <sup>a</sup>	-0.52 ± 0.14 <sup>b</sup>
<i>agrB</i>	8	-0.73 ± 0.06 <sup>c</sup>	-0.20 ± 0.05 <sup>b</sup>	-0.87 ± 0.04 <sup>d</sup>	-0.93 ± 0.01 <sup>d</sup>
	16	-1.10 ± 0.05 <sup>bc</sup>	-0.98 ± 0.03 <sup>b</sup>	-1.04 ± 0.01 <sup>bc</sup>	-1.17 ± 0.01 <sup>c</sup>
	24	-0.45 ± 0.00 <sup>b</sup>	-0.63 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.56 <sup>a</sup>	519.38 ± 238.00 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>: Diferentes letras indica diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ). La comparación de los valores fue realizada entre las concentraciones subinhibitorias y los valores control (cepas de *C. perfringens* sin tratamiento) por cada cepa de *C. perfringens* independiente, de la misma manera se realizaron los análisis independientes para cada compuesto o sobrenadante.

±: Desviación estándar.

Tabla 8 Perfil de expresión de genes de *C. perfringens* observado para el tratamiento control con Benzbromarona

Cepa <i>C.</i> <i>perfringens</i>	Gen	Tiempo (h)	BZ (µg/ml)	
			Valor de expresión del gen de virulencia elegido	
			25	50
FD-1041	<i>spo0A</i>	4	-3.60±0.25 <sup>b</sup>	-3.84±0.20 <sup>b</sup>
		8	3.40±3.18 <sup>a</sup>	4.62±2.72 <sup>a</sup>
		16	-2.12±0.00 <sup>c</sup>	-2.12±0.00 <sup>c</sup>
		24	-0.26±0.0.84 <sup>a</sup>	865.76±404 <sup>b</sup>
	<i>HCPE</i>	4	-1.71±0.02 <sup>ab</sup>	1.85±1.92 <sup>a</sup>

		8	-0.58±0.0.17 <sup>ab</sup>	0.85±0.35 <sup>a</sup>
		16	9.60±2.30 <sup>d</sup>	3.35±2.47 <sup>a</sup>
		24	-0.73±0.05 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
		4	-1.44±0.00 <sup>c</sup>	-1.24±0.00 <sup>b</sup>
	<i>agrD</i>	8	-0.34±0.00 <sup>b</sup>	1.56±2.04 <sup>a</sup>
		16	-13.56±0.02 <sup>b</sup>	-13.15±0.02 <sup>c</sup>
		24	-1.30±0.01 <sup>b</sup>	-0.61±0.13 <sup>b</sup>
		4	-1.00±0.00 <sup>c</sup>	-0.60±0.11 <sup>b</sup>
	<i>agrB</i>	8	0.21±0.00 <sup>a</sup>	3.01±2.04 <sup>a</sup>
		16	-2.13±0.00 <sup>b</sup>	2.00±1.1 <sup>a</sup>
		24	-1.23 ±0.00 <sup>b</sup>	-0.91±0.00 <sup>c</sup>
		4	18.61 ± 7.01 <sup>d</sup>	-2.77 ± 0.01 <sup>ad</sup>
	<i>spo0A</i>	8	-0.60 ± 0.53 <sup>a</sup>	5.36 ± 3.90 <sup>d</sup>
H-3		16	9.40 ±4.75 <sup>d</sup>	41.71 ± 10.34 <sup>d</sup>
		24	7.50 ±1.37 <sup>d</sup>	1.44 ± 1.12 <sup>a</sup>
	<i>HCPE</i>	4	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>

		8	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
		16	-2.31 ± 0.00 <sup>c</sup>	-2.31 ± 0.00 <sup>b</sup>
		24	24.1± 0.00 <sup>d</sup>	56.12 ± 0.00 <sup>d</sup>
		4	-1.00± 0.00 <sup>ad</sup>	1.15 ± 1.14 <sup>a</sup>
	<i>agrD</i>	8	-5.34 ± 0.00 <sup>c</sup>	-5.34 ± 0.00 <sup>c</sup>
		16	-0.50 ± 0.05 <sup>b</sup>	-0.25 ± 0.04 <sup>b</sup>
		24	-0.91 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.40 ± 0.26 <sup>d</sup>
		4	-1.50 ± 0.00 <sup>b</sup>	-1.50 ± 0.00 <sup>b</sup>
	<i>agrB</i>	8	-1.11 ± 0.00 <sup>c</sup>	-1.02 ± 0.00 <sup>d</sup>
		16	0.90± 1.23 <sup>a</sup>	6.00 ± 2.83 <sup>d</sup>
		24	-1.44 ± 0.17 <sup>b</sup>	-1.25 ± 0.20 <sup>b</sup>
		4	4.20± 0.30 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.37 <sup>ad</sup>
FD-1	<i>spo0A</i>	8	0.47 ± 0.38 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.95 <sup>a</sup>
		16	6934.26 ± 780.60 <sup>d</sup>	65.30 ± 19.05 <sup>d</sup>
		24	-1.05 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.71 ± 0.14 <sup>d</sup>
	<i>HCPE</i>	4	0.60 ± 0.40 <sup>a</sup>	-0.37 ± 0.16 <sup>ad</sup>

	8	-0.16 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.20 <sup>b</sup>
	16	1656.14 ± 673.40 <sup>d</sup>	18.10 ± 5.33 <sup>a</sup>
	24	-0.92 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.00 ± 4.00 <sup>a</sup>
	4	-1.42 ± 0.09 <sup>c</sup>	2.00 ± 0.83 <sup>a</sup>
<i>agrD</i>	8	7.23 ± 3.34 <sup>a</sup>	27.36 ± 10.51 <sup>d</sup>
	16	42.80 ± 6.52 <sup>d</sup>	-0.43 ± 0.12 <sup>ad</sup>
	24	-1.00 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.55 ± 0.05 <sup>d</sup>
	4	97.1 ± 3.00 <sup>d</sup>	2.44 ± 2.43 <sup>a</sup>
<i>agrB</i>	8	-1.12 ± 0.40 <sup>b</sup>	16.40 ± 9.00 <sup>d</sup>
	16	30.57 ± 16.50 <sup>d</sup>	-0.90 ± 0.01 <sup>b</sup>
	24	-1.70 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.74 ± 0.75 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>: Diferentes letras indica diferencia significativa (P≤0.05). La comparación de los valores fue realizada entre la concentraciones subinhibitorias y los valores control (cepas de *C. perfringens* sin tratamiento) por cada cepa de *C. perfringens* independiente, de la misma manera se realizaron los análisis independientes para cada compuesto o sobrenadante.

±: Desviación estándar.

## DISCUSIÓN

Las estrategias anti-virulencia emplean compuestos naturales, derivados de plantas u otros microorganismos, para el control de factores de virulencia o supervivencia del microorganismo de interés. Una de estas estrategias se fundamenta en la función que compuestos con actividad anti QS en contra de microorganismos patógenos o contaminantes, dichos compuestos surgen de varias fuentes, entre las cuales destacan los compuestos derivados de plantas (Díaz-Carrasco et al. 2016), y las moléculas producidas por otros microorganismos que pueden cumplir con esta función (Roy et al. 2018).

De entre los compuestos sugeridos en la bibliografía tenemos a los polifenoles, los cuales son estructuras químicas caracterizadas por contener anillos aromáticos unidos a un grupo oxidrilo (-OH), y son parte de un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de plantas (Figueira et al, 2017) Estos compuestos químicos cuentan con una variedad de actividades biológicas caracterizadas, entre las que se encuentra la actividad anti QS (Tang et al. 2014) en contra principalmente de bacterias Gram-negativas (Hossain et al. 2017), sin embargo estos compuestos derivados de plantas han mostrado también tener actividad en contra de algunos modelos Gram-positivo como *S. aureus* (Shukla y Bhathena, 2016) o *S. mutans* (Hossain et al. 2017; Shao et al. 2015). Entre las moléculas que se clasifican como polifenoles con actividad anti QS tenemos, al metil galato (Hossain et al. 2017), ácido gálico (Bali et al. 2019; Shao et al. 2015) y el galato de epigallocatequina (un compuesto derivado del té verde) (Nor Mohammadi et al. 2018).

En la primera fase del estudio se reiteró lo que algunos autores aseveran, la actividad de compuesto depende de la dosis aplicada y del modelo de estudio que se emplea y no todos los compuestos afectaran de la misma manera a *C. perfringens* (Li et al. 2011; García et al. 2002). Es por ello, que se realizó la determinación de la actividad anti biopelícula de los distintos compuestos derivados de plantas buscando que el mismo compuesto tuviera un efecto de reducción, o de mantenimiento en concentraciones bajas en la formación de biopelícula, los cuales en primera instancia nos arrojaron a dos candidatos de esta categoría de compuestos; el ácido tánico y el galato de epigallocatequina, siendo estos dos compuestos los elegidos para continuar con ensayos posteriores, de la misma manera estos dos

compuestos son los que necesitaron de una cantidad menor de compuesto para poder tener actividad anti biopelícula (y antimicrobiana) siendo otra razón por la cual fueron elegidos.

Los resultados finales arrojan dos tratamientos con efectos prometedores para el control de factores de virulencia de *C. perfringens*, así como también se demuestra su efectividad antimicrobiana de los compuestos. Cabe resaltar que las concentraciones utilizadas son comparables con antibióticos tipo cefalosporinas (cefotetan y cefoperazona) utilizados para el control de infecciones con *C. perfringens* en el ámbito de la clínica, especialmente en infecciones que desarrollan gangrena gaseosa asociada a traumas, estos antibióticos se utilizan particularmente con las cepas resistentes contra antibióticos del tipo beta-lactámicos (Control and Laboratory Standard Institute, M11 Standard for antimicrobial susceptibility testing for anaerobic bacteria, 2019). *C. perfringens* tiene un amplio rango de índices de formación de biopelícula, esto depende de la cepa que se está estudiando puede variar desde una cepa un valor de BFI que nos indique no ser formadora de biopelícula, hasta una cepa con un BFI que la ubique como una fuerte productora de biopelícula (Charlebois, Jacques et al. 2014). En los casos de las tres cepas de estudio, podemos ubicarlas como formadores fuertes de biopelícula, ya que las tres cepas tienen un alto valor de BFI (BFI > 1.09), cabe resaltar que las dinámicas de las tres cepas varían con respecto a la curva que representa su cinética de formación de biopelícula. Siendo observado que en la cepa *C. perfringens* H-3 existen dos puntos de valor máximo de formación de biopelícula, uno a las 8 horas y otro a las 24 horas, caso contrario a *C. perfringens* FD-1041 y *C. perfringens* FD-1, en los cuales la formación de biopelícula sugiere un incremento del valor de BFI conforme aumenta el tiempo de crecimiento, sin notarse el pico de producción observado en *C. perfringens* H-3.

La formación de biopelícula es un mecanismo que ayuda a las células bacterianas a sobrevivir en ambientes hostiles o estresantes, como los observados en la industria de procesamiento de alimentos (Charlebois, Jacques et al. 2017). Este mecanismo de defensa toma un papel protagónico en cuestión de la manera en que se abordan las contaminaciones e infecciones bacteriana, surgiendo por las estrategias anti-virulencia o anti QS como alternativas al control de microorganismos patógenos (Dong et al. 2007). En base a este surgimiento de estrategias y la prevalencia de microorganismos con resistencia contra

antibióticos, los resultados han sugerido que tanto los tratamientos de galato de epigallocatequina (GE) como la aplicación de sobrenadantes bacterianos derivados de *L. plantarum* (LP-S) surgen como nuevas estrategias de control para el procesamiento de alimentos, empleando principalmente su función de inhibición de biopelícula.

El galato de epigallocatequina y el sobrenadante de *L. plantarum* fueron analizados a profundidad para determinar su capacidad antimicrobiana y anti-biopelícula en contra de las tres cepas de *C. perfringens*. Los resultados indican que ambos compuestos tienen una actividad bactericida significativa en contra de esta bacteria, sin embargo, se observa que en particular la cepa de *C. perfringens* FD-1 resulta tener la mayor resistencia a los compuestos seleccionados, pues sus concentraciones tanto bactericidas como inhibitorias son mayores a las necesarias para obtener un efecto antimicrobiana similar en sus contra partes FD-1041 y H-3, esto se debe en gran medida a lo comentado anteriormente, los compuestos ejercen una actividad antimicrobiana dependiente de cepa, así como se puede observar que otros factores como la biopelícula, también varían dependiendo de la cepa (Charlebois, Jacques et al. 2014).

Por otra parte los ensayos de actividad anti biopelícula nos muestran que de los dos tratamientos aplicados, el tratamiento GE muestra una variabilidad considerable en los distintos tiempos de incubación, teniendo una inhibición de biopelícula estadísticamente significativa contra la cepa *C. perfringens* FD-1041 a las 24 horas de tratamiento, mientras que las cepas *C. perfringens* H-3 y *C. perfringens* FD-1, a pesar que muestran una reducción, no muestran una reducción tan pronunciada a la observada en *C. perfringens* FD-1041. Observando comportamientos relacionados en otros modelos de estudio tenemos que las concentraciones subletales de metil galato en las que se observaba una reducción mayor de factores de virulencia como formación de biopelícula rondan entre los 64 a 256 µg/ml, siendo mayores a las concentraciones que se aplicaron de galato de epigallocatequina. Es importante mencionar que en bajas dosis del compuesto (metil galato) parece estimular la producción de biopelícula en *P. aeruginosa* (PAO1) (Hossain et al. 2017), similar a lo observado con el tratamiento EG en *C. perfringens*.

Durante la formación de la biopelícula de *C. perfringens*, un cambio en la dinámica de formación, con respecto al control de cada cepa, los tratamientos indujeron un comportamiento diferente en *C. perfringens* H-3, denominado exodus, el cual es un

desprendimiento en fase temprana de biomasa inducida por factores externos, ocasionando una reducción de la biomasa y del valor BFI en fases tempranas de los tratamientos (Varga, Therit et al. 2018), esta fase se caracteriza por cumplir una función similar a la fase de dispersión en la maduración de la biopelícula, que es diseminar a los microorganismos por la superficie o ambiente donde se encuentren desarrollando la biopelícula (Moormeier, Bose et al. 2014).

Los sistemas QS, como el sistema Agr en las bacterias Gram-positivas, son mecanismos de comunicación célula a célula que regulan rutas bioquímicas importantes de los microorganismos (Maldonado-Barragán, Caballero-Guerrero et al. 2016). Estas van desde factores de supervivencia en ambientes peligrosos o la regulación de factores de virulencia de microorganismos patógenos (Banerjee et al. 2017). Durante el desarrollo de esta investigación, se confirmaron por PCR dos genes homólogos del sistema Agr de *S. aureus*, *agrB* y *agrD* (Vidal, Ma et al. 2012) en las tres cepas de *C. perfringens* analizadas. La presencia de estos genes también ha sido confirmada en otras cepas aisladas de *C. perfringens* (Vidal, Shak et al. 2015), así como en *C. sporogenes* y *C. botulinum* (Cooksley, Davis et al. 2010). En estas especies de *Clostridium*, el sistema Agr ha sido asociado en la regulación de fenotipos como la producción de biopelícula, la regulación de producción de toxinas, y el control de fases iniciales durante el proceso de esporulación (Ohtani, Hirakawa et al. 2013). Un ejemplo claro de este vínculo está reflejado en la inactivación del gen *agrB* en la cepa 13 de *C. perfringens* tipo A y la cepa CN3685 de *C. perfringens* tipo C, cuyo resultado de la inactivación del gen es la supresión de la capacidad de producción de biopelícula (Vidal, Shak et al. 2015). De la misma manera se puede comprobar en los ensayos que la inhibición de los genes Agr en las cepas de *C. perfringens* por parte del tratamiento control Benzbromarona, capaz de regular principalmente los genes *agrB* y *agrD*, se relacionó con las disminuciones en la producción de biopelícula en *C. perfringens*.

La actividad anti-biopelícula de los sobrenadantes de *L. plantarum* fue confirmada con los ensayos de BFI en *C. perfringens*, esta actividad fue retirada de los sobrenadantes al ser tratados con ambas enzimas tanto como proteínasa K como lisozima, sugiriendo que la molécula con actividad anti-biopelícula se trata de una molécula tipo proteica con posibles enlaces glucosídicos. Muchas bacterias ácido lácticas, especialmente las pertenecientes a los

géneros *Lactobacillus* o *Lactococcus* producen un amplio rango de compuestos con funciones biológicas variadas, tales como los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) (Gray, Hall et al. 2013). Las bacteriocinas (en particular la nisina) también se han logrado confirmar como agentes anti-biopelícula en contra de microorganismos patógenos tales como *L. monocytogenes*, aunque sin confirmarle un efecto a nivel genético. Algunos ejemplos de los efectos en la inhibición de factores de virulencia por compuestos proteicos, particularmente bacteriocinas, de bacterias ácido lácticas tenemos que: la nisina tiene la capacidad de inhibir o alterar la estructura y arquitectura de la biopelícula de *L. monocytogenes* (Bolocan et al. 2017) y en *S. epidermidis* (Bolocan et al. 2017; Davison et al. 2010). Así mismo, la Nukasin ISK-1, y la Lactasin Q han demostrado tener un efecto de penetración en la biopelícula, así como de inhibición de cepas MRSA de *S. aureus* (Mathur et al. 2018).

Por otra parte, otros compuestos proteicos derivados de *Lactobacillus* han demostrado tener un efecto anti-virulencia (Gou, Lui et al. 2017) que afecten la señalización en la comunicación QS en modelos de estudio tales como *E. coli* O157:H7 (Park, Yoe et al. 2014). Además, se ha demostrado que cepas de *L. reuteri* pueden bloquear o reducir factores de virulencia en *S. aureus* por el bloqueo del sistema de comunicación Agr, que es un sistema de comunicación encargado en la regulación de muchos factores de virulencia en *S. aureus* (Li, Wang et al. 2011). Con esto se comprueba que proteínas de bajo peso molecular secretadas por *L. reuteri* disminuían la secreción de toxinas en *S. aureus* por inhibición o bloqueo del sistema Agr-QS. Otros estudios confirman la actividad anti QS, tanto en Gram-positivos como Gram-negativos, por parte de otros géneros de bacterias ácido lácticas como *L. acidophilus* (Park, Yeo et al. 2014), reduciendo la producción de biopelícula en *S. aureus* e inhibiendo las producción de toxinas (Guo, Liu et al. 2017).

Cabe señalar que son pocos los estudios que relacionen los compuestos derivados de plantas con respecto a inhibición de los sistemas QS en modelos de estudio en Gram-positivos, contrastando con la cantidad de información que encontramos en modelos de estudio Gram-negativos (LaSarre y Federle, 2013). Se conoce que el metil galato inhibe la ruta de regulación en los sistemas de QS que utilizan AHL como autoinductor, al bloquear la señal de producción, reduce la capacidad de *C. violaceum* de producir violaceína.

De la misma manera el metil galato tiene la capacidad de reducir la expresión de los genes *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* y *pqsA* en *P. aeruginosa* spp.PAO1 (Hossain et al. 2017). La curcumina, quercentina y el pirogalol, tienen efecto anti QS en contra del *P. aeruginosa* PAO1, reduciendo la capacidad del organismo de producir biopelícula. Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de los polifenoles no se ha determinado con detalle, los rangos de concentraciones aplicados van desde los 46.87 a los 750µg/ml (Bali, 2019), entre otros estudios.

Sin embargo, hay compuesto polifenólicos con capacidad anti QS en Gram-positivas tal como la hamamelitanino, capaz de ejercer una actividad anti QS en cepas de *S. aureus*. Este compuesto, regula el proceso de expresión en el gen RNAlII (Hossain et al. 2017), así como se ha determinado que la quercentina afecta el sistema QS de *S. aureus* (Roy et al. 2018). Aun así, poco se conoce del efecto del galato de epigallocatequina en el sistema QS de *C. perfringens*, se ha determinado particularmente que este compuesto tiene un efecto principal en *C. perfringens* que es en la alteración de las proteínas formadoras del septum, alteraciones en la segregación del ADN bacteriano y por ultimo alteraciones en el ciclo de división celular (Moham Adi et al. 2018), en nuestro estudio se confirma la capacidad antimicrobiana y anti biopelícula del compuesto en *C. perfringens*, sin embargo no se ha vinculado este efecto con una sub expresión de genes relacionados a los sistemas QS como los observados en otros compuesto polifenólicos con el modelo de estudio *S. aureus* (Hossain et al. 2017; Roy et al. 2018).

Los polifenoles (como el galato de epigallocatequina y el ácido tánico) posiblemente sigan un mecanismo de inhibición similar a las furanonas, estos compuestos actúan como agentes de imitación de las moléculas AHL, bloqueando el Sistema QS que utiliza AHL como molécula autoinductora, por interferencia al bloquear los sitios de censado en proteinas reguladoras del sistema QS (Roy et al. 2018).

Ambos tratamientos LP-S y GE tienen actividad antimicrobiana contra células plantónicas, esta actividad ya descrita se mantiene en los rangos de concentraciones necesarias para tener un efecto inhibitor, el cual se estipula con un rango por debajo de 1mg/ml, pues se menciona que la actividad de los extractos derivados de plantas varía entre los rangos de 100-1000µg/ml (Carrasco-Diaz et al. 2016), como se observa en los resultados

los rangos de concentraciones de los compuestos con actividad antimicrobiana se manejan entre las concentraciones propuestas, siendo los más efectivos en el estudio ácido tánico y galato de epigallocatequina (Elizondo et al. 2010; Sully, 2011).

Por otra parte, nuestro estudio de expresión génica demuestra que ninguno de los compuestos tiene un efecto significativo en los genes relacionados al sistema Agr-QS, *agrB* y *agrD* durante la formación de biopelícula, así como la ausencia de un patrón constante de inhibición en la expresión de genes reguladores de la esporulación *cpe* y *spo0A*. El hecho que el tratamiento con proteasas que inhibe la actividad anti-biopelícula en LP-S nos indica una posibilidad de que la molécula(s) involucrada en la inhibición de la biopelícula tiene una acción más relacionada a inhibir la adherencia bacteriana. Posiblemente bloqueando efectores requeridos para la producción de biopelícula, o inclusive atacando directamente la arquitectura de la misma biopelícula (Bolocan et al. 2017; Davison et al. 2010). Sin embargo, no se cuentan con evidencias contundentes que demuestren que la actividad antimicrobiana y la actividad anti-biopelícula sean causada por una misma molécula, esto va en acorde con la actividad tanto anti QS de las moléculas derivadas de bacterias ácido lácticas (Li, Wang et al. 2011). Se demuestra un efecto similar del tratamiento con LP-S al efecto inhibitorio y de reducción de biopelícula que tienen las bacteriocinas, pero que no interfieren en los sistemas QS, que se ha determinado en otros ensayos (Bolocan et al. 2017).

Otros organismos perteneciente al género *Clostridia* como *C. botulinum* y *C. sporogenes* tienen más de un sistema QS (específico de Gram-positivas), cada uno de los cuales regulan un factor de virulencia único, siendo Agr-1 el sistema encargado de regular en parte el proceso de esporulación y Agr-2 el encargado de la regulación del proceso de producción de neuro toxinas (Cooksley, Davis et al. 2010). *S. aureus* es otro microorganismo con más de un sistema Agr, o que tiene diversos autoinductores y receptores, que responden a un autoinductor particular. *S. aureus* cuenta con 4 diferentes autoinductores (AIP) responsables de activar el sistema Agr, cada AIP responde en la producción de la misma toxina pero en diferentes cepas de *S. aureus*. Por otro lado, se ha observado que en una misma cepa de *S. aureus* dos AIP diferentes regulan fases diferentes en la ruta metabólica de producción de una misma toxina (Hansen, Peng et al. 2018). El proceso de reducción en la regulación de factores de virulencia por un mismo mecanismo inhibitorio es más complejo de

explicar. En base a lo anterior y tomando en cuenta los resultados obtenidos, se desarrolló la conjetura de la posibilidad de que exista más de un sistema QS (Agr) coordinando la regulación de biopelícula en las cepas de *C. perfringens*, con motivo de explicar la ausencia de relación entre la reducción del valor BFI y la falta de reducción en la expresión de los genes Agr.

*spo0A* también conocido como “regulador maestro” en *C. perfringens* y *B. subtilis* (Steiner, Dago et al. 2011; Huang et al. 2004), éste es un gen encargado en la codificación de la proteína, Spo0A, la cual es la proteína encargada de la regulación del proceso de esporulación (Li, Paredes-Sabja et al. 2016; Freed, Shrestha et al. 2016), también esta proteína se ha relacionado con la formación de biopelícula (Obana, Nakamura et al. 2014). Comparando esta función, con los niveles de expresión obtenidos en los resultados del estudio, tenemos que los niveles de *spo0A* a las 24 horas es mucho mayor con los tratamiento que en el control del tratamiento en todas las cepas de *C. perfringens*, esta sobreexpresión del gene no se correlaciona con un incremento en la formación de biopelícula o el incremento en la esporulación, ya que con respecto a la biopelícula se observa una reducción en la misma y en el procesos de esporulación no se observa ningún tipo de efecto estadísticamente significativo. La sobre expresión del gen *spo0A* está relacionado con la inducción temprana de la esporulación en *C. perfringens* (Freedman, Shrestha et al. 2016).

Varios reportes indican que la formación de biopelícula estimula el proceso de esporulación, la biopelícula presenta microambientes, dentro de la matriz polimérica, que activan los sistemas de respuesta al estrés por ausencia de nutrientes, o la presencia de compuestos recalcitrantes (Al-Hinai et a., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que *C. perfringens* no esporula, en las condiciones de producción de biopelícula, a pesar de tener valores de sobre expresión en *spo0A*, en las condiciones de crecimiento, igualmente tampoco se observó esporulación en los tratamientos utilizados en la formación de biopelícula. Así mismo se demostró que en un medio de cultivo ideal para esporulación, Duncan Strong, los dos tratamientos carecen de efecto en el proceso de esporulación. La ausencia de esporas en el medio para biopelícula, inclusive teniendo una sobre expresión de *spo0A*, puede estar relacionada a la presencia de glucosa en el medio de cultivo TGY, pues se ha confirmado que la presencia del carbohidrato reprime la esporulación (Li, Paredes-

Sabja et al. 2016). *B. subtilis* puede inducir la formación de esporas dentro de una biopelícula (Veening, Kuipers, et al. 2006), sin embargo, al comparar nuestros resultados en *C. perfringens* no se encontró esta capacidad de formación de esporas y tampoco se vinculó la sobre expresión de *spo0A* con el proceso de esporulación en medio TGY.

CPE es una de las toxinas principales secretadas por *C. perfringens*, y principal compuesto relacionado con las enfermedades transmitidas por alimentos relacionada con el microorganismo (Freedman, Shrestha et al. 2016). La toxina CPE se produce durante el proceso de esporulación de la bacteria, y su expresión esta mediada por el sistema QS (Li, Chen et al. 2011), así como también se encuentra relacionado a la expresión del gen *spo0A* (Huang, Waters et al. 2014). Sin embargo, el resultado de los experimentos llevados a cabo muestran la sobre expresión de *spo0A*, y una ausencia de la expresión del gen *cpe*, sumando que se demostró la presencia del gen por PCR punto final, lo cual como se ha esta relacionando con las observaciones anteriores no se relaciona con el fenotipo observado de reducción de biopelícula o falta de efecto en la esporulación. Se ha establecido que la función del regulador maestro, el gen *spo0A*, está relacionado con diferentes procesos fisiológicos en *C. perfringens*, y no está limitado al proceso de esporulación o la producción de la toxina CPE, por lo que la sobre expresión de este gen puede estar relacionada a la activación de otras rutas metabólicas derivado de la presencia de ambos compuestos, tanto GE como LP-S, en ambos tratamientos (Li, Paredes Sabja et al. 2016).

Los cambios dinámicos observados en la formación de biopelícula por el tratamiento GE, reducen la posibilidad de este compuesto de posibles aplicaciones futuras como agente anti biopelícula de bacterias, particularmente en *C. perfringens*, pues presenta un patrón aleatorio de control a nivel genético, por otra parte el tratamiento con sobrenadantes bacterianos LP-S al reducir la formación de biopelícula en casi todas las concentraciones utilizadas y tiempos estudiados, así como tener un actividad tanto antimicrobiana como anti biopelícula, posicionan a estos compuestos con una alternativa más factible para su agente en el control de microorganismos o biopelícula en organismos como *C. perfringens*.

Estudios previos al desarrollo de esta investigación, demostraron que el sistema Agr es una ruta de regulación importante para la coordinación y desarrollo de la biopelícula en *C. perfringens*. Empleando cepas de *C. perfringens*  $\Delta$ agrB, determinaron que la facultad del

microorganismo para desarrollar biopelícula se veía reducida o eliminada (Vidal, Shak et al. 2015), con esta misma delección en el gen *agrB* se elimina la secreción de toxinas por parte de *C. perfringens* (Vidal, Ma et al. 2012). La reducción en los niveles de expresión en los genes involucrados dentro del sistema Agr a las primeras horas ocurre un efecto concomitante en la reducción de los factores de virulencia o fenotipos regulados por el sistema Agr-QS (Moormeier y Bayles, 2017, Li, Paredes-Sabja et al. 2016).

Se confirma la importancia de este sistema Agr para la regulación de factores de virulencia en los estudios realizados por Paharik y Horswill en 2016. Estos autores determinaron, utilizando *S. aureus* como modelo de estudio, que al ser suprimida la expresión de los genes *agrB* y *agrD* en las primeras fases de la producción de biopelícula, la secreción y posterior formación de la biopelícula no se puede restaurar a condiciones de maduración normal en la fase estacionaria. La gran mayoría de los casos observados en nuestros tratamientos los genes Agr se afectaron en las primeras horas de la formación de biopelícula, y posteriormente se observó una sobre expresión de estos a las 24 horas. Este cambio de expresión genética nos puede resultar similar a lo observado en el estudio de Paharik y Horswill, pues los tratamientos tuvieron un efecto en las primeras horas de la producción de biopelícula en *C. perfringens*, alterando al final en su fase estacionaria el valor de BFI. Es decir, los tratamientos con LP-S que fueron empleados en los ensayos tienen un efecto global en la reducción del valor BFI, principalmente a las 24 horas del tratamiento, a pesar de determinarse la sobre expresión de los genes *agrB* y *agrD*. Sin embargo, aún se tiene la posibilidad de que otros genes relacionados en la formación de biopelícula, que no fueron estudiados durante el desarrollo del trabajo, estén teniendo una alteración en los niveles de expresión que conduzcan a la reducción del valor BFI por efecto del tratamiento LP-S. Por otro lado, también se tiene la posibilidad de tener solo un efecto de alteración en la estructura y arquitectura de la biopelícula, interfiriendo con las proteínas (o el eADN) requeridas para el soporte de la estructura en la biopelícula, siendo este efecto similar a que se observa en bacterias Gram-positivas como *L. monocytogenes* o *S. epidermidis* por efecto de las bacteriocinas (Bolocan et al. 2017; Davison et al. 2010).

Esta variabilidad en los comportamientos, tanto fenotípicos como genotípicos, dentro de las cepas de *C. perfringens* que se observaron durante el estudio, puede vincularse a la

diversidad genética que tiene el organismo, pues como lo podemos observar *C. perfringens* cuenta con un perfil de formación de biopelícula con un espectro muy amplio (Charlebois, Jacques et al. 2014). La naturaleza diversificada del pan-genoma en *C. perfringens* es quizás resultado de que el organismo cuenta con un amplio número de nichos, que van desde ambientes dentro de hospederos o diversos ambientes en medio ambiente externo, esto resulta en la interacción con muchas otras especies bacterianas. Esto da un abanico de posibilidades en las capacidades adaptativas del organismo, desafortunadamente solo un grupo reducido estudios han reportado esta extrema variación del pan-genoma en los microorganismos (Kirk MD et al. 2017).

Por otra parte, el estudio realizado demuestra un efecto similar del tratamiento control benzbromarona en *C. perfringens* al observado en *S. aureus*. El compuesto benzbromarona es un regulador positivo del sistema Agr en *S. aureus* (Gordon Williams et al. 2013). Lo que se puede observar en *C. perfringens*, dando un compuesto candidato que posiblemente regule el sistema CpAL de *C. perfringens*, mostrando un efecto de reducción en los valores de BFI del microorganismo, siendo el efecto más homogéneo entre los compuestos utilizados.

## CONCLUSIÓN

El compuesto galato de epigalocatequina y los sobrenadantes bacterianos derivados de *L. plantarum* presentan una alternativa al uso de antibióticos, para el control de microorganismos patógenos como *C. perfringens*.

Los sobrenadantes bacterianos LP-S, así como el GE comprobaron tener actividad bactericida en contra de *C. perfringens*. El GE tiene menor efecto en la reducción de biopelícula de las cepas de *C. perfringens*. Por otra parte, el LP-S y sus fracciones tienen actividad anti-biopelícula a 24 horas de tratamiento en todas las cepas de *C. perfringens*, particularmente la fracción 10LP-S tiene una mayor reducción en los valores de BFI.

La reducción de los valores BFI no se correlaciona con una actividad tipo quorum quenching en el sistema estudiado, pues el tratamiento LP-S no muestra una reducción estadísticamente significativa o estable en los niveles de transcripción de genes involucrados en el sistema QS estudiado y formación de biopelícula del microorganismo. La benzbromarona por otro lado redujo la formación de biopelícula en todas las cepas de *C. perfringens*.

El tratamiento LP-S, sigue un comportamiento de sobre expresar los genes *spo0A*, *agrB* y *agrD*, principalmente a las 24 horas de tratamiento.

Existe una sobre expresión de los genes tales como *agrD*, *agrB* y *spo0A* posterior a un periodo de incubación de 16 horas, tiempo en el que *C. perfringens* repunta en su formación de biopelícula.

En relación con perfiles de expresión de genes, la benzbromarona tiene la mayor relación entre inhibir la expresión de los genes Agr y la reducción del valor BFI en todas las cepas de *C. perfringens* posterior a 24 horas de tratamiento.

La benzbromarona es un compuesto que tiene actividad anti QS en los sistemas Agr de bacterias Gram-positivas, y esta activada anti QS se liga a una actividad anti-biopelícula también demostrada.

Conforme a la formación de esporas, se determinó que los tratamientos no tienen un efecto en la formación de esporas de forma significativa.

La evidencia aportada sugiere que los tratamientos EG y LP-S, por su actividad antimicrobiana y anti biopelícula, son candidatos como agente de control, aplicables a la industria y seguridad alimentaria, en contra de patógenos tales como *C. perfringens*.

## PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos, se plantean dos perspectivas de trabajo. Siendo la primera de ellas el continuar con la investigación del compuesto derivado de *L. plantarum* con actividad anti-biopelícula. Con el fin de dilucidar su naturaleza química y sus mecanismos de acción, a nivel molecular, dentro de *C. perfringens* y otros modelos de estudio Gram-positivos de importancia en los alimentos.

La segunda perspectiva es, el estudio más a profundidad de los mecanismos moleculares de regulación de factores de virulencia en *C. perfringens*.

Buscar el papel que desempeñan otros sistemas de comunicación involucrados en la coordinación de factores de virulencia. Profundizar estudios en el sistema de comunicación CpAL para identificar el papel que desempeñan genes como *virX*.

Vinculado con lo anterior se sugiere estudiar la posibilidad de múltiples agrD, con diferentes secuencias aminoacídicas, que ayuden a *C. perfringens* en la coordinación de todos sus factores de virulencia. Esto en relación con lo observado en microorganismos como *S. aureus* o *C. botulinum*, los cuales son microorganismos que presentan más de un tipo de agrD.

## BIBLIOGRAFÍA

Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C. and Mathee, K. (2006) Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*. 105: 427-435.

Al-Hinai, M. A., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2015). The Clostridium sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 79(1), 19–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-14>.

Álvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gozalez-Aguilar, G. A., Ponce, A., Moreira, M. R., Roura, S. I. & Ayala-Zavala, J. F. (2014) Oregano Essential Oil-Pectin edible Films as Anti-Quorum sensing and Food Antimicrobial Agents. *Frontiers of Microbiology*. 5: 699.

Arráiz, N. (2002) Sigma Factors and Stress Reactions in Micobacterias. *Kesmara*. 30: 112-125.

Asfour, H. Z. (2018). Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2018 Jan-Mar;6(1):1-10. doi: 10.4103/JMAU.JMAU\_10\_18.

Balcázar, J. L., Subirats J. & Borregeo, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 6(1216).

Bali, E. B., Turkmen, K. E., Erdonmez, D. & Saglam, N. (2019). Comparative Study of Inhibitory Potential of Dietary Phytochemicals Against Quorum Sensing Activity of and Biofilm Formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and Swimming and Swarming Behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Food technology and biotechnology* 57(2): 212-221.

Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Quorum-sensing network-associated gene regulation in Gram-positive bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 64(4), 439–453. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.040>.

Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I. V., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Franco, B. D. (2014). Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1195–1208. <https://doi.org/10.1111/jam.12438>.

Bernier S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J., Ghigo, J. & Beloin, C. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genetics*. 2013;9(1):e1003144. doi:10.1371/journal.pgen.1003144.

Betoni, J. E. C., Mantovani, R. P., Barbosa, L. N., Di Stasi, L. C. & Fernandes Junior, A. (2006) Synergism between Plant Extract and Antimicrobial Drugs used on *Staphylococcus aureus*. *Desies. memorias del instituto Oswaldo Cruz*. 101(4): 387-390.

Bolocan, A. S., Pennone, V., O'Connor, P. M., Coffey, A., Nicolau, A. I., McAuliffe, O., & Jordan, K. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *Journal of applied microbiology*, 122(1), 279–293. <https://doi.org/10.1111/jam.13337>.

Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick R., & Kolter, R. (2001). Fruiting Body Formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the national academy of sciences*. 98: 11621–11626.

Cai, Z., Yuan Z.-H., Zhang, H., Pan, Y., Wu, Y., Tian, X.-Q., Wang, F.-F., Wang, L. & Qian, W. (2017). Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. *PLoS pathogens* 13(4): e1006304-e1006304.

Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R. & Hultgren, S. J. (2008) The Biology and Future Prospects of Antivirulence Therapies. *Nature reviews in microbiology*. 6: 17-27.

Cooksley, C. M., Davis, I. J., Winzer, K., Chan, W. C., Peck, M. W., & Minton, N. P. (2010). Regulation of neurotoxin production and sporulation by a Putative agrBD signaling system

in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4448–4460. <https://doi.org/10.1128/AEM.03038-09>.

Charlebois, A., Jacques, M., & Archambault, M. (2014). Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in microbiology*, 5, 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00183>.

Charlebois, A., Jacques, M., & Archambault, M. (2016). Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium perfringens* biofilms and planktonic cells. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A*, 45(5), 593–601. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1189512>.

Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M. & Archambault, M.. (2017). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry." *Food Microbiology* 62: 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.009>.

Chemugil, P., Lakshmi, P., & Annamalai, A. (2019). Exploring Morin as an anti-quorum sensing agent (anti-QSA) against resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 127, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.007>.

Chen, J., Ma, M., Uzal, F. A., & McClane, B. A. (2014). Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut microbes*, 5(1), 96–107. <https://doi.org/10.4161/gmic.26419>.

Cheung, G. Y., Wang, R., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2011). Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and immunity*, 79(5), 1927–1935. <https://doi.org/10.1128/IAI.00046-11>.

Cirkovic, I., Bozic, D. D., Draganic, V., Lozo, J., Beric, T., Kojic, M., Arsic, B., Garalejic, E., Djukic, S., & Stankovic, S. (2016). Licheniocin 50.2 and bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 inhibit biofilms of coagulase negative Staphylococci and *Listeria monocytogenes* clinical isolates. *PloS one*, 11(12), e0167995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167995>.

Davies, D. (2003) Understanding resistance to antibacterial agents. *Natural review in drug discovery*. 2: 114-122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>.

Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends in microbiology* 26(4): 313-328. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>.

Deryabin, D., Galadzhieva, A., Kosyan, D., & Duskaev, G. (2019). Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: modes of action. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5588. <https://doi.org/10.3390/ijms20225588>.

Diaz Carrasco, J. M., Redondo, L. M., Redondo, E. A., Dominguez, J. E., Chacana, A. P., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2016). Use of plant extracts as an effective manner to control *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis in poultry. *BioMed research international*, 2016, 3278359. <https://doi.org/10.1155/2016/3278359>.

Dong, Y. H., Wang, L. Y., & Zhang, L. H. (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), 1201–1211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>.

Donlan R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>.

Duarte, J. C., Valença, G. P., Moran, P. J., & Rodrigues, J. A. (2015). Microbial production of Propionic and Succinic acid from Sorbitol using *Propionibacterium acidipropionici*. *AMB Express*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0095-6>.

Eichner, C., Frost, P., Dysvik, B., Jonassen, I., Kristiansen, B. & Nilsen, F. (2008). Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) transcriptomes during post molting maturation and egg production, revealed using EST-sequencing and microarray analysis. *BMC Genomics* 9, 126. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-126>.

- Elizondo, A. M., Mercado, E. C., Rabinovitz, B. C., & Fernandez-Miyakawa, M. E. (2010). Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary microbiology*, 145(3-4), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.003>.
- Figueira, I., Menezes, R., Macedo, D., Costa, I., & Dos Santos, C. N. (2017). Polyphenols beyond barriers: a glimpse into the brain. *Current neuropharmacology*, 15(4), 562–594. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161026151545>.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563. <https://doi:10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Freedman, J. C., Li, J., Mi, E., & McClane, B. A. (2019). Identification of an important orphan histidine kinase for the initiation of sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* Type F strain SM101." *mBio* 10(1): e02674-18. <https://doi:10.1128/mBio.02674-18>.
- Freedman, J. C., Shrestha, A., & McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins*, 8(3), 73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>.
- Galante, J., Ho, A. C., Tingey, S., & Charalambous, B. M. (2015). Quorum sensing and biofilms in the pathogen, *Streptococcus pneumoniae*. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 25–30. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905113336>.
- García, S., Araiza, M., Gómez, M. & Heredia, N. (2002) Inhibition of growth, enterotoxin production, and spore formation of *Clostridium perfringens* by extracts of medicinal plants. *Journal of Food Protection*. 65(10): 1667-1669.
- García, S. & Heredia, N. (2011) *Clostridium perfringens*: A Dynamic Foodborne Pathogen. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*. 4: 624-630.

García, S., J.E. Vidal, N. Heredia & V. K. Juneja. (2019). *Clostridium perfringens*. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th Ed. (eds) M.P. Doyle, F. Diez-Gonzalez, C. Hill. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, D.C. ISBN: 978555819965. Doi: 10.1128/9781555819972.

García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food microbiology*, 59, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.001>.

Gogineni, V. K., Morrow, L. E., Gregory, P. J., & Malesker, M. A. (2013). Probiotics: history and evolution. *Journal of infectious diseases and preventive medicine* 1(107): 2. DOI: 10.4172/2329-8731.1000107.

Goo, E., Khang, Y., Kim, H. & Hwang, I. (2010) Proteomic Analysis of quorum-sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*. *Journal of proteome research*, 9, 3184-3199. <https://doi.org/10.1021/pr100045n>.

Gordon, C. P., Williams, P., & Chan, W. C. (2013). Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. *Journal of medicinal chemistry*, 56(4), 1389–1404. <https://doi.org/10.1021/jm3014635>.

Goyal, C., Malik, R. K., & Pradhan, D. (2018). Purification and characterization of a broad spectrum bacteriocin produced by a selected *Lactococcus lactis* strain 63 isolated from Indian dairy products. *Journal of food science and technology*, 55(9), 3683–3692. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3298-4>.

Gray, B., Hall, P., & Gresham, H. (2013). Targeting agr- and agr-Like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(4), 5130–5166. <https://doi.org/10.3390/s130405130>.

Guo, S., Liu, D., Zhang, B., Li, Z., Li, Y., Ding, B., & Guo, Y. (2017). Two lactobacillus species inhibit the growth and  $\alpha$ -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced

proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Frontiers in microbiology*, 8, 2081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02081>.

Gupta, K., Marques, C. N., Petrova, O. E., & Sauer, K. (2013). Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. *Journal of bacteriology*, 195(21), 4975–4987. <https://doi.org/10.1128/JB.00732-13>.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.

Hamon M. & Lazazzera B. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 42:1199–1209.

Hansen, A. M., Peng, P., Baldry, M., Perez-Gassol, I., Christensen, S. B., Vinther, J., Ingmer, H., & Franzyk, H. (2018). Lactam hybrid analogues of solonamide B and autoinducing peptides as potent *S. aureus* AgrC antagonists. *European journal of medicinal chemistry*, 152, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.053>.

Haque, S., Ahmad, F., Dar, S. A., Jawed, A., Mandal, R. K., Wahid, M., Lohani, M., Khan, S., Singh, V., & Akhter, N. (2018). Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microbial pathogenesis*, 121, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.046>.

Heredia, N. L. & Labbé, R. G. (2013). *Clostridium perfringens* John Wiley & Sons, Ltd.

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>.

Hossain, M. A., Lee, S. J., Park, N. H., Mechesso, A. F., Birhanu, B. T., Kang, J., Reza, M. A., Suh, J. W., & Park, S. C. (2017). Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine

lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Scientific reports*, 7(1), 10618. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10997-5>.

Huang, I. H., Waters, M., Grau, R. R., & Sarker, M. R. (2004). Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS microbiology letters*, 233(2), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.02.014>.

Jenul, C., & Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology spectrum*, 6(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>.

Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum Sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *BioMed research international*, 2019, 2015978. <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>.

Jiang, Y., Kong, Q., Roland, K. L. & Curtiss III, R. (2014) Membrane Vesicles of *Clostridium perfringens* Type A Strains Induce Innate and Adaptive Immunity. *International Journal of medical microbiology*. 304:431-443. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.006>

Joerger R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry science*, 82(4), 640–647. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>.

Kampouris, I. D., Karayannakidis, P. D., Banti, D. C., Sakoula, D., Konstantinidis, D., Yiangou, M., & Samaras, P. E. (2018). Evaluation of a novel quorum quenching strain for MBR biofouling mitigation. *Water research*, 143, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.030>.

Kanini, G. S., Katsifas, E. A., Savvides, A. L., & Karagouni, A. D. (2013). *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. *BioMed research international*, 2013, 387230. <https://doi.org/10.1155/2013/387230>.

Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J., & Kaur, S. (2018). Anti-biofilm properties of the fecal probiotic Lactobacilli against *Vibrio* spp. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 120. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00120>.

Kawai, Y., Arakawa, K., Itoh, A., Saitoh, B., Ishii, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H., Itoh, T., & Saito T. (2003) Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasei* LA39. *Animal Science Journal*. 74: 45-51. <https://doi.org/10.1046/j.1344-3941.2003.00085.x>.

Khan, B. A., Yeh, A. J., Cheung, G. Y., & Otto, M. (2015). Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert opinion on investigational drugs*, 24(5), 689–704. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1019062>.

Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2017). Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nature microbiology*, 2, 17080. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.80>.

Knutsen, E., Ween, O., & Håvarstein, L. S. (2004). Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 186(10), 3078–3085. <https://doi.org/10.1128/jb.186.10.3078-3085.2004>.

Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., & Adams, M. R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International journal of food science and technology*, 34(1), 81-85.

Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 15(12), 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.

Koul, S., Prakash, J., Mishra, A., & Kalia, V. C. (2016). Potential emergence of multi-quorum sensing inhibitor resistant (MQSIR) bacteria. *Indian journal of microbiology*, 56(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0558-0>.

Kretli Winkelströter, L., Tulini, F. L., & De Martinis, E. C. P. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Food science and technology*, 64(2), 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>.

Krzyżek P. (2019). Challenges and Limitations of Anti-quorum Sensing Therapies. *Frontiers in microbiology*, 10, 2473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02473>.

Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014). Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *International journal of biological sciences*, 10(5), 550–565. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9028>.

Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014). N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control. *BioMed research international*, 2014, 162584. <https://doi.org/10.1155/2014/162584>.

LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(1), 73–111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>.

Lattar, S. M., Wu, X., Brophy, J., Sakai, F., Klugman, K. P., & Vidal, J. E. (2018). A mechanism of unidirectional transformation, leading to antibiotic resistance, occurs within nasopharyngeal Pneumococcal biofilm consortia. *mBio*, 9(3), e00561-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00561-18>.

Lee, P., & Tan, K. S. (2015). Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Archives of oral biology*, 60(3), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.014>.

Leistner L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00161-6).

Li, J., Chen, J., Vidal, J. E. & McClane, B. A. (2011) The Agr-like Quorum-Sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* Type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infection and Immunity*. 79(6): 2451-2459. <https://doi.org/10.1128/IAI.00169-11>.

Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R., & McClane, B. A. (2016). *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production. *Microbiology spectrum*, 4(3), 10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015>.

Li, J., Wang, W., Xu, S. X., Magarvey, N. A., & McCormick, J. K. (2011). *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), 3360–3365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017431108>.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Luo, P., & Morrison, D. A. (2003). Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 185(1), 349–358. <https://doi.org/10.1128/jb.185.1.349-358.2003>.

Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M. R., Hadjifrangiskou, M., & Tegos, G. P. (2018). Options

and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clinical microbiology reviews*, 31(3), e00084-16. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>.

Maldonado, M. C., Aban, M. P., & Navarro, A. R. (2014). Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(4), 1133–1137. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000400015>.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Martín, V., Ruiz-Barba, J. L., & Rodríguez, J. M. (2016). Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC microbiology*, 16, 37. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0663-1>.

March Rosselló, G. A., & Eiros Bouza, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras [Quorum sensing in bacteria and yeast]. *Medicina clinica*, 141(8), 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.02.031>.

Martin, C., Low, W. L., Gupta, A., Amin, M. C., Radecka, I., Britland, S. T., Raj, P., & Kenward, K. M. (2015). Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 43–66. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905123529>.

Monroy-Dosta, M. C., Castro-Barrera, T., Fernández-Perrino, F. J., & Mayorga-Reyes, L. (2009) Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*. 73: 63-72.

Monte, J., Abreu, A. C., Borges, A., Simões, L. C., & Simões, M. (2014). Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 3(2), 473–498. <https://doi.org/10.3390/pathogens3020473>.

Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>.

Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*, 5(5), e01341-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>.

Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N. & Ikeda, T. (2008) N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC12472. *FEMS Microbiology Letters*. 279: 124-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>.

Muriana, P. M., & Luchansky, J. B.(1993). CHAPTER 3 - Biochemical methods for purification of bacteriocins. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Academic Press: 41-61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-355510-6.50011-7>.

Nami, Y., Haghshenas, B., Bakhshayesh, R. V. Jalaly, H. M., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A. (2018). Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. *LWT*, 98, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.035>.

Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., Mahmood, M. S., Siddique, A. B. & Iqbal, Mazhar (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13:265. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-265>.

Nazzaro, F., Fratianni, F., & Coppola, R. (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12607–12619. <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.

Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>.

Noor Mohammadi, T., Maung, A. T., Sato, J., Sonoda, T., Masuda, Y., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2019). Mechanism for antibacterial action of epigallocatechin gallate and theaflavin-3,3'-digallate on *Clostridium perfringens*. *Journal of applied microbiology*, 126(2), 633–640. <https://doi.org/10.1111/jam.14134>.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2019 Apr 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Obana, N., Nakamura, K., & Nomura, N. (2014). A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. *Journal of bacteriology*, 196(8), 1540–1550. <https://doi.org/10.1128/JB.01444-13>

Obana, N., & Nakamura, K. (2011). A novel toxin regulator, the CPE1446-CPE1447 protein heteromeric complex, controls toxin genes in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*, 193(17), 4417–4424. <https://doi.org/10.1128/JB.00262-11>

Ohtani K. (2016). Gene regulation by the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 41, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.003>.

Ohtani, K., & Shimizu, T. (2016). Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins*, 8(7), 207. <https://doi.org/10.3390/toxins8070207>.

Ohtani, K., Hirakawa, H., Paredes-Sabja, D., Tashiro, K., Kuhara, S., Sarker, M. R., & Shimizu, T. (2013). Unique regulatory mechanism of sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*, 195(12), 2931–2936. <https://doi.org/10.1128/JB.02152-12>.

Ohtani, K., Hirakawa, H., Tashiro, K., Yoshizawa, S., Kuhara, S., & Shimizu, T. (2010). Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 16(3), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.10.003>.

Ohtani, K., Yuan, Y., Hassan, S., Wang, R., Wang, Y., & Shimizu, T. (2009). Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*, 191(12), 3919–3927. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-08>.

Olivero-Verbel, J., Barreto-Maya, A., Bertel-Sevilla, A., & Stashenko, E. E. (2014). Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 45(3), 759–767. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300001>.

Özel, B., Şimşek, Ö., Akçelik, M., & Saris, P. (2018). Innovative approaches to nisin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(15), 6299–6307. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9098-y>.

Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015>.

Paredes-Sabja, D., Sarker, N., Setlow, B., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008). Roles of DacB and spm proteins in *Clostridium perfringens* spore resistance to moist heat, chemicals, and UV radiation. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3730–3738. <https://doi.org/10.1128/AEM.00169-08>.

Park, H., Yeo, S., Ji, Y., Lee, J., Yang, J., Park, S., Shin, H., & Holzapfel, W. (2014). Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control*, 45, 62-69.

Peña, W. E., de Massaguer, P. R., & Teixeira, L. Q. (2009). Microbial modeling of thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 spores in concentrated orange juice with nisin addition. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40(3), 601–611. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090003000024>.

Ponnusamy, K., Paul, D., & Kweon, J. H. (2009). Inhibition of quorum sensing mechanism and *Aeromonas hydrophila* biofilm formation by vanillin. *Environmental Engineering Science*, 26(8), 1359-1363.

Ramirez-Hernandez, A., Rupnow, J. & Hutkins, R. W. (2015) Adherence reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to HEp-2 Cells by mannan oligosaccharides and a high-molecular-weight component of cranberry extract. *Journal of Food Protection*. 78: 1496-1505. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-087>.

Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L. and Baca, B. E. (2014) Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(3). 242-255. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3).

Ramos-Silva, P., Serrano, M., & Henriques, A. O. (2019). From Root to Tips: Sporulation Evolution and Specialization in *Bacillus subtilis* and the Intestinal Pathogen *Clostridioides difficile*. *Molecular biology and evolution*, 36(12), 2714–2736. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz175>.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009) Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8: 157-180. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x>.

Reuter, K., Steinbach, A., & Helms, V. (2016). Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspectives in medicinal chemistry*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13209>

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>.

Russell A. D. (1990). Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical microbiology reviews*, 3(2), 99–119. <https://doi.org/10.1128/cmr.3.2.99>.

Saad, M., Abdelsamei, H., Ibrahim, E., Abdou, A., & El-Sohaimy, S. (2015). Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal* 28: 210-215. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2015.32744>.

Saeed, F., Afzaal, M., Tufail, T., & Ahmad, A. (2019). Use of natural antimicrobial agents: a safe preservation approach. *Act. Antimicrob. Food Packag.*

Saliani, M., Jalal, R., & Kafshdare Goharshadi, E. (2015). Effects of pH and temperature on antibacterial activity of zinc oxide nanofluid against *Escherichia coli* O157: H7 and

*Staphylococcus aureus*. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2), e17115. <https://doi.org/10.5812/jjm.17115>.

Samy, R. P. & Gopalakrishnakone, P. (2008) Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, eCAM*, 7(3), 283–294. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen036>.

Santhakumari, S., & Ravi, A. V. (2019). Targeting quorum sensing mechanism: an alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *South African Journal of Botany* 120: 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.028>.

Schachter B. (2003). Slimy business--the biotechnology of biofilms. *Nature biotechnology*, 21(4), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nbt0403-361>.

Shao, D., Li, J., Li, J., Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q., & Yang, H. (2015). Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Journal of food science*, 80(6), M1299–M1305. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12902>.

Shen, A., Edwards, A. N., Sarker, M. R., & Paredes-Sabja, D. (2019). Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens. *Microbiology spectrum*, 7(6), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018>.

Shimamura, Y., Hirai, C., Sugiyama, Y., Shibata, M., Ozaki, J., Murata, M., Ohashi, N., & Masuda, S. (2017). Inhibitory effects of food additives derived from polyphenols on staphylococcal enterotoxin A production and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(12), 2346–2352. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1395681>.

Shukla, V., & Bhathena, Z. (2016). Broad spectrum anti-quorum sensing activity of tannin-rich crude extracts of Indian medicinal plants. *Scientifica*, 2016, 5823013. <https://doi.org/10.1155/2016/5823013>.

Silva, C., Silva, S., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.

Steiner, E., Dago, A. E., Young, D. I., Heap, J. T., Minton, N. P., Hoch, J. A., & Young, M. (2011). Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Molecular microbiology*, 80(3), 641–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07608.x>.

Stewart P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*, 185(5), 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/jb.185.5.1485-1491.2003>.

Surendran Nair, M., Amalaradjou, M. A., & Venkitanarayanan, K. (2017). Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Advances in applied microbiology*, 98, 1–29. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.12.001>.

Talukdar, P. K., Olguín-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D., & Sarker, M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in microbiology*, 166(4), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001>.

Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., & Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) system. *Frontiers in microbiology*, 9, 55. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00055>.

Tang, K., & Zhang, X. H. (2014). Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Marine drugs*, 12(6), 3245–3282. <https://doi.org/10.3390/md12063245>.

Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2012). The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PloS one*, 7(1), e30147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030147>.

Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 16(2), 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.001>.

Varga, J. J., Therit, B., & Melville, S. B. (2008). Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infection and immunity*, 76(11), 4944–4951. <https://doi.org/10.1128/IAI.00692-08>.

Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2016). Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica L.* against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 49(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.03.012>.

Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 1. 10.15406/jmen.2014.01.00014.

Veening, J. W., Kuipers, O. P., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Kort, R. (2006). Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 188(8), 3099–3109. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3099-3109.2006>.

Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., & De Spiegeleer, B. (2017). Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo. *Frontiers in neuroscience*, 11, 183. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00183>.

Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M. A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>.

Vidal, J. E., Shak, J. R., & Canizalez-Roman, A. (2015). The CpAL quorum sensing system regulates production of hemolysins CPA and PFO to build *Clostridium perfringens* biofilms. *Infection and immunity*, 83(6), 2430–2442. <https://doi.org/10.1128/IAI.00240-15>.

Vidal, J. E., Ma, M., Saputo, J., Garcia, J., Uzal, F. A., & McClane, B. A. (2012). Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Molecular microbiology*, 83(1), 179–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07925.x>.

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in microbiology*, 10, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>.

Visick, K. L., Schembri, M. A., Yildiz, F., & Ghigo, J. M. (2016). Biofilms 2015: multidisciplinary approaches shed light into microbial life on surfaces. *Journal of bacteriology*, 198(19), 2553–2563. <https://doi.org/10.1128/JB.00156-16>.

von Bodman, S. B., Willey, J. M., & Diggle, S. P. (2008). Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *Journal of bacteriology*, 190(13), 4377–4391. <https://doi.org/10.1128/JB.00486-08>.

Vuotto, C., Longo, F., & Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International journal of oral science*, 6(4), 189–194. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.52>.

Wang, B., & Muir, T. W. (2016). Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles. *Cell chemical biology*, 23(2), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.004>.

Wang, G., Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2011). Kinetics of germination of wet-heat-treated individual spores of *Bacillus* species, monitored by Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3368–3379. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-11>.

Weyder, M., Prudhomme, M., Bergé, M., Polard, P., & Fichant, G. (2018). Dynamic modeling of *Streptococcus pneumoniae* competence provides regulatory mechanistic insights

into its tight temporal regulation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01637>.

Wilson, C. M., Yang, S., Rodriguez, M., Jr, Ma, Q., Johnson, C. M., Dice, L., Xu, Y., & Brown, S. D. (2013). *Clostridium thermocellum* transcriptomic profiles after exposure to furfural or heat stress. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-131>.

Wu, S., Li, X., Gunawardana, M., Maguire, K., Guerrero-Given, D., Schaudinn, C., Wang, C., Baum, M. M., & Webster, P. (2014). Beta- lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism. *PloS one*, 9(7), e99204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099204> .

Więckowicz, M., Schmidt, M., Sip, A., & Grajek, W. (2011). Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. *Letters in applied microbiology*, 52(3), 281–289. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02999.x>.

Xu, D., Zhang, W., Zhang, B., Liao, C., & Shao, Y. (2016). Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. *PeerJ*, 4, e2178. <https://doi.org/10.7717/peerj.2178>.

Yamakazi, K., Murakami, M., Kawi, Y., Inoue, N. & Matsuda, T. (2000) Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food microbiology*. 17: 315-320. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0309>.

Yasugi, M., Okuzaki, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., Fujita, M., Sarker, M. R., & Miyake, M. (2016). Transcriptional profile during deoxycholate-induced sporulation in a *Clostridium perfringens* isolate causing foodborne illness. *Applied and environmental microbiology*, 82(10), 2929–2942. <https://doi.org/10.1128/AEM.00252-16>.

Yap, P. S., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>.

Yoda, Y., Hu, Z. Q., Zhao, W. H., & Shimamura, T. (2004). Different susceptibilities of Staphylococcus and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 10(1), 55–58. <https://doi.org/10.1007/s10156-003-0284-0>.

Anexo A

Tabla 1 Primers para PCR utilizados en el estudio de PCR en tiempo real, todos los primers fueron confirmados por PCR:

Gene	Proceso fisiológico en el que está envuelto	Secuencia	Tamaño de amplicon (bp)	Referencia
<i>cpe</i>	Gen enterotoxina (CPE)	AGGAGATGGTTGGATATTAGGGGA TCATTTGGACCAGCAGTTGT	240	(Vidal, Shak et al. 2015)
<i>spo0A</i>	Proteína de regulación de esporulación	TGTCCTCTTCCCAAGCAAC AGGAGTACCAGCTCACATAAAAGG	192	Este estudio
<i>sSRA</i>	Proteína de exportación en membrana	CCCAAACAGTTTCAAGTTGCCA TGAGAAGATATTCAGGAGAAGAGCC	300	Este estudio
<i>agrB</i>	Proteína de secreción del autinductor	TGGAGGAGCACATTCAGAATCC ACACTACAAGCTCAAAGTTCATTT	120	Este estudio
<i>agrD</i>	Autoinductor del sistema QS	ACAAACCTTGGTTAACGAAGATGG AGCTTCCTCTTCTGAAGTATTAGG	298	Este estudio
<i>HCPE</i>	Sensor histidin cinasa de CPE	AGGAGGAGATGCACAAGAACA TGTGAACAGCAGCAACTGAG	161	Este estudio
<i>gyrA</i>	Gen de girasa, subunidad de la polimerasa, gen housekeeping	TGGGGCGTATATGTTAAAGGCT CCAGTTTCCGTGTCCATCA	100	(Vidal, Shak et al. 2015)
16S	Gen de la subunidad ribosomal menor RNA, housekeeping gene	GCGATGAAGTTTCCTTCGGG CTCTATGAGGCAGGTTGC	99	(Vidal, Shak et al. 2015)
16S <i>Lactobacillus</i>	Gen de la subunidad ribosomal menor RNA	GGAGGCAGCAGTAGGGAATC AACTCTCATGGTGTGACGGG	1074	Este estudio

## **RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

Alberto Aguayo Acosta

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: Esporulación y Biopelícula de *C. perfringens*: Acción de los Antimicrobianos Naturales

Campo de estudio: Biotecnología de Alimentos, Inocuidad Alimentaria

Datos personales: Nacido en Yahualica de González Gallo, Jalisco el 29 de Julio de 1988. Hijo de Alfredo Aguayo Esparza y Ana María Acosta Luevanos

Educación: Egresado de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, grado obtenido de Ingeniería Bioquímica en 2011. Egresado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, grado obtenido de Maestría en Ciencias (Microbiología) con opción en Bioquímica y Genética de los Microorganismos en 2015.

Experiencia Profesional: Laboratorista técnico en la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes en el año 2013, Profesor investigador asociado en el Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes del 2014 al 2015, Profesor adjunto y De apoyo a la investigación en la Universidad del Valle de Puebla en 2019, Profesor Adjunto en la Universidad México Americana del Golfo en 2019, Profesor asignatura en el Bachillerato del Deporte Aguascalientes desde el 2020.