

Estudio de los mecanismos de coagregación bacteriana en biopelículas de conducciones de agua potable mediante un enfoque proteómico

ANA C AFONSO, MANUEL SIMÕES, MARIA JOSÉ SAAVEDRA, LÚCIA SIMÕES, JUAN M. LEMA, ALBA TRUEBA-SANTISO

¹LEPABE, Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

²ALICE, Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.

³CITAB, Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801 Vila Real, Portugal.

⁴CEB-LABELS, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

⁵CRETUS, Department of Chemical Engineering, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

✉ albamaria.trueba@usc.es

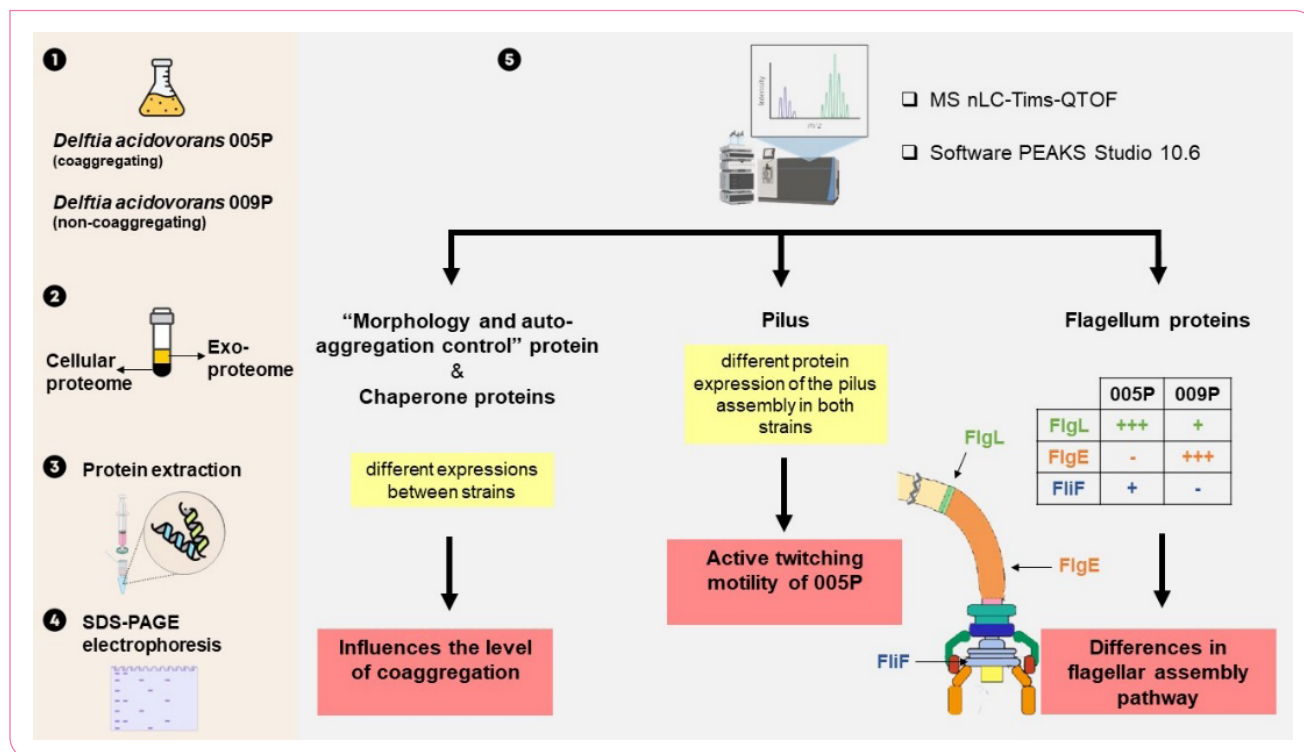


Figura 1: Diagrama explicativo de la metodología utilizada en el estudio de las expresiones proteicas de dos cepas de *Delftia acidovorans* aisladas de conducciones de agua potables en Portugal. Una de ellas presenta capacidad de coagregación (005P_C) y la otra no (009P_C).

La coagregación es un mecanismo de interacción célula-célula altamente específico, que se caracteriza por el reconocimiento y adhesión a especies bacterianas diferentes. Tiene un papel fundamental en la formación de biopelículas microbianas multiespecies (Simões *et al.*, 2008), y aunque se ha estudiado principalmente en el contexto de la microbiología oral (placa dentobacteriana), también se ha confirmado su ocurrencia en ambientes acuáticos

(Min *et al.*, 2004; Vornhagen *et al.*, 2013). La formación de biopelículas microbianas tanto en las redes de agua potable, como en los alcantarillados, depuradoras o sistemas de acuicultura tiene importantes implicaciones económicas y relacionadas con la salud (Rickard *et al.*, 2004). El desarrollo de biopelículas puede generar obstrucciones e incrementar de manera relevante los costes de mantenimiento. Además, favorece la proliferación de pató-

genos y la transmisión genética horizontal de resistencias a antibióticos.

Por otra parte, la coagregación puede ser deseable en ciertos sistemas de depuración basados en biorreactores de biomasa granular, en los que la interacción microbiana favorece la decantación y separación de la biomasa del agua tratada.

La detección de cepas coagregantes, así como un mejor entendimiento de los

mecanismos implicados, puede proporcionar información esencial para el desarrollo de nuevas estrategias de gestión del agua. Estas estrategias irían orientadas a generar soluciones antibacterianas ecológicas para la formación de biopelículas indeseadas, y a reducir riesgos patogénicos y costes económicos (Afonso *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, la detección de cepas coagregantes se ha realizado mediante el aislamiento de dichas cepas y estudios visuales de laboratorio. Sin embargo, muchas cepas ambientales tienen requerimientos nutricionales desconocidos o peculiares en cuyo caso el desarrollo de una metodología de aislamiento y cultivo puede ser muy complejo. Con estas motivaciones, en este estudio hipotetizamos que existen diferencias trazables mediante proteómica que podrían determinar la capacidad de ciertas bacterias de coagregar.

Estudiamos dos cepas de *Delftia acidovorans*, aisladas previamente de conducciones de agua potable en Portugal (Afonso *et al.*, 2023), teniendo una de ellas capacidad coagregante (C+) y la otra no (C-). En primer lugar, mediante ensayos de motilidad *in vitro* detectamos una mayor motilidad de los tipos *swarming* y *twitching* para la cepa coagregante (C+) con respecto a C-. A través de microscopía electrónica de transmisión (TEM), confirmamos la presencia de flagelos en ambas cepas. Mediante proteómica, pudimos detectar una expresión significativamente mayor de proteínas de motilidad de pilus tipo IV (T4P) en C+, en línea con los ensayos de motilidad. Además, las proteínas del anillo flagelar fueron más abundantes en las muestras de C+, mientras que aquellas involucradas en la formación del gancho flagelar (FIE y FilG) solo se detectaron en C-. Estos resultados combinados sugieren diferencias estructurales y conformacionales entre las cepas en sus apéndices celulares. Adicionalmente, ciertas proteínas relacionadas con la morfología y el control de la autoagregación fueron más expresadas en la cepa C+. También, se detectó una expresión diferencial de chaperonas, siendo estas más abundantes en C-. La información obtenida sugiere que la habilidad para coagregar de la cepa C+

depende de más de un factor, incluyendo la estructura de sus apéndices celulares, la regulación de las chaperonas, los pilis y el control de la morfología y la agregación. Nuestros resultados están en línea con lo descrito previamente por Lima *et al.* (2017), que apuntaba a una interacción compleja de diferentes proteínas en la coagregación de una cepa aislada en ambientes orales de *Fusobacterium nucleatum*.

Este estudio introduce un enfoque alternativo para identificar biomarcadores proteicos para detectar habilidades de coagregación en cepas bacterianas acuáticas, ofreciendo una alternativa a los ensayos visuales tradicionales y generando nueva información sobre los complejos mecanismos moleculares en los que se basa este fenómeno. Este estudio se va a continuar analizando con la metodología introducida otras cepas bacterianas coagregantes y no coagregantes, incluyendo una comparativa entre bacterias gram positivas y gram negativas.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Grupo Gallego de Referencia Competitiva (GRC) ED431C-2021/37 (J.M.L.R. y A.T.-S.), y el contrato postdoctoral Juan de la Cierva-FJC2019-041664-I (A.T.-S.). También por la i3S Scientific Platform Histology and Electron Microscopy (HEMS), miembro del PPBI (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122); LEPABE, UIDB/00 511/2020 (DOI: <https://doi.org/10.54499/UIDB/00511/2020>) y UIDP/00 511/2020 (DOI: <https://doi.org/10.54499/UIDP/00511/2020>), y ALiCE, LA/P/0045/2020 (DOI: <https://doi.org/10.54499/LA/P/0045/2020>), financiado por fondos nacionales portugueses a través de FCT/MCTES (PIDDAC); CEB, UIDB/04469/2020 (DOI: <https://doi.org/10.54499/UIDB/04469/2020>) y por LABBELS—Associate Laboratory in Biotechnology, Bioengineering and Microelectromechanical Systems, LA/P/0029/2020; CITAB, UIDB/04033/2020 (DOI: <https://doi.org/10.54499/UIDB/04033/2020>); y el contrato predoctoral FCT de Ana Cristina Afonso (DOI: <https://doi.org/10.54499/2020.04773.BD>).

Referencias

- Afonso AC, Gomes IB, Saavedra MJ *et al.* Bacterial coaggregation in aquatic systems. *Water Res* **2021**; 196:43–1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117037>
- Afonso AC, Gomes IB, Saavedra MJ *et al.* Drinking-water isolated *Delftia acidovorans* selectively coaggregates with partner bacteria and facilitates multispecies biofilm development. *Sci Total Environ* **2023**; 875 :162646. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162646>
- Lima BP, Shi W, Lux R. Identification and characterization of a novel *Fusobacterium nucleatum* adhesin involved in physical interaction and biofilm formation with *Streptococcus gordonii*. *Microbiologyopen*. **2017**;6. <https://doi.org/10.1002/mbo3.444>
- Min KR, Zimmer MN, Rickard AH. Physicochemical parameters influencing coaggregation between the freshwater bacteria *Sphingomonas natatoria* and *Micrococcus luteus*. *Biofouling* **2010**; 26:931–40. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.531128>
- Rickard A, Gilbert P, Handley P. Influence of growth environment on coaggregation between freshwater biofilm bacteria. *J Appl Microbiol* **2004**; 96: 1367–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02297.x>
- Simões L, Simões M, Vieira M. Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. *Appl Environ Microb*, **2008**; 74 :1259–63. <https://doi.org/10.1128/AEM.01747-07>
- Vornhagen J, Stevens M, McCormick DW *et al.* Coaggregation occurs amongst bacteria within and between biofilms in domestic showerheads. *Biofouling* **2013**; 29 :53–68. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.744395>