



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“EFECTO DE LOS RESIDUOS DE PIEL, CARNE CRUDA Y  
COCIDA, Y SUS INTERACCIONES CON LAS  
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO, TIPO DE  
SUPERFICIE Y MICROBIOTA NATIVA DEL POLLO SOBRE  
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Salmonella*  
*enterica*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**CLAUDIA ALEJANDRA PEGUEROS VALENCIA**

DIRIGIDO POR

**M en C. ANGÉLICA GODÍNEZ OVIEDO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE LOS RESIDUOS DE PIEL, CARNE CRUDA Y  
COCIDA, Y SUS INTERACCIONES CON LAS  
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO, TIPO DE  
SUPERFICIE Y MICROBIOTA NATIVA DEL POLLO SOBRE  
LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Salmonella*  
*enterica*”

### INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

CLAUDIA ALEJANDRA PEGUEROS VALENCIA

DIRIGIDO POR

M. en C. ANGÉLICA GODÍNEZ OVIEDO

#### SINODALES

M. en C. Angélica Godínez Oviedo  
DIRECTOR

---

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
SINODAL

---

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
SINODAL

---

M. en C. José Eduardo Lucero Mejía  
SINODAL

---

### **Dedicatoria**

*A mi familia por ser mi pilar. A mis padres por ser las personas que me han apoyado en cada momento de mi vida, me han forjado como persona, brindándome su apoyo para cumplir mis metas y sueños a través de valores, principios y carácter, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. A mis hermanas por sus palabras de aliento y apoyo incondicional.*

## **Agradecimientos**

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer Angélica Godínez Oviedo, directora de esta tesis y amiga personal, a quien admiro, es un ejemplo para mí, ha sido de total apoyo desde el inicio en este proyecto y quien más que nadie creyó en mí para poder llevarlo a cabo.

A la Doctora Montserrat Hernández Iturriaga quien fue la persona que me inspiró y me introdujo el gusto por la microbiología de los alimentos, a quien también admiro por ser una persona llena de valores y principios. A José Eduardo Lucero Mejía, sinodal y amigo personal por su apoyo y enseñanzas a lo largo de este trabajo. Así como a la Doctora Sofía María Arvizu Medrano por ser parte de esto y por su apoyo y enseñanzas a lo largo de la licenciatura.

Agradezco profundamente a mis padres por brindarme las herramientas para llegar hasta aquí, por tener su apoyo incondicional y creer en mí. Sin ellos no hubiera sido posible nada de esto.

También quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la formación académica y al LECRIMA por darme el espacio y las herramientas para poder realizar esta tesis.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron en este proceso brindándome además de su amistad, su apoyo, motivación y/o alguna enseñanza en el camino la señora Martha, Alejandro, Yunuen y en general al personal del LECRIMA, a mis amigos Marcela, Lupita, Nanette, Andrea y a mi prima Briseyda Valencia.

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.	1
1.2 <i>Salmonella</i> spp.	3
1.3 <i>Salmonella enterica</i> en pollo.	7
1.4 Formación de biopelículas de <i>Salmonella enterica</i> y contaminación cruzada.	11
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1 Materiales y Reactivos	20
4.2 Métodos	21
4.2.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.	21
4.2.2 Preparación de extractos de pollo.	21
4.2.3 Recuento bacterias mesófilas aerobias (BMA).	22
4.2.4 Recuento de bacterias coliformes totales (CT).	22

4.2.5 Recuento bacterias psicotrofas (P).	22
4.2.6 Preparación del inóculo.	23
4.2.7 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación de biopelículas <i>in vitro</i> de <i>S. enterica</i> .	23
4.2.8 Evaluación de la formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.	24
4.2.9 Análisis estadístico.	26
5. RESULTADOS	26
5.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.	26
5.2 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> .	37
5.3 Evaluación de la formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.	60
6. DISCUSIÓN	
6.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.	109
6.2 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> .	113

6.3 Evaluación de la formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.	117
7. CONCLUSIÓN	119
8. BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	134

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo reportadas en México en el año 2020.	3
2	Criterios de clasificación de las cepas de <i>S. enterica</i> según su capacidad para formar biopelículas.	24
3	Análisis de varianza de factores e interacciones sobre la formación <i>in vitro</i> de biopelículas a 25 °C.	45
4	Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos de pollo almacenado a 25 °C.	48
5	Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> a 14 °C.	49
6	Análisis de varianza de factores e interacciones sobre la formación <i>in vitro</i> de biopelículas a 9 °C.	49
7	Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos no estériles de pollo durante su almacenamiento a 9 °C.	51
8	Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos no estériles de pollo durante su almacenamiento a 14 °C.	51
9	Análisis de varianza de factores e interacciones sobre la cuantificación de biopolímeros en superficies inertes a 25 °C.	65
10	Análisis de varianza de factores e interacciones sobre la concentración de <i>S. enterica</i> embebida en la biopelícula a 25 °C.	66
11	Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la cuantificación de biopolímeros a 9 y 14 °C.	71

12	Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan concentración de <i>S. enterica</i> a 9 y 14 °C.	72
13	Composición de macronutrientes de piel, pechuga cruda y pechuga cocida de pollo y pH de extractos.	116

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imagen de <i>Salmonella</i> spp. en microscopio óptico.	4
2	Ciclo de infección de <i>S. enterica</i> .	6
3	Niveles de producción y consumo mensual de carne de pollo en México en el año 2019.	10
4	Priorización de alimentos de acuerdo con su asociación con <i>S. enterica</i> en la zona centro de México.	11
5	Etapas de desarrollo de biopelículas.	15
6	Preferencia de tipo de almacenamiento y tiempo en refrigeración de almacenamiento del pollo crudo en casas de la zona centro de México.	27
7	Rangos de temperatura de refrigeradores en casas de la zona centro de México.	28
8	Nivel de potencia de enfriamiento utilizado en casas de la zona centro de México.	29
9	Zonas del refrigerador en donde la población de la zona centro de México almacenan el pollo crudo.	29
10	Preferencia del tipo de recipiente para almacenar el pollo crudo en las casas de la zona centro de México.	30
11	Rutas empeladas para la preparación de pollo en casas de la zona centro de México.	31
12	Uso y tipo de material empleados para las tablas de picar en casas de la zona centro de México.	32

13	Tipo de recipientes empleados durante la manipulación de pollo crudo en casas de la zona centro de México.	32
14	Instrumentos empleados para la reducción de tamaño de pollo crudo en casas de la zona centro de México.	33
15	Uso de la misma superficie durante la manipulación de pollo crudo y pollo cocido en casas de la zona centro de México.	34
16	Acciones que se toman luego del uso de superficies con pollo crudo, antes de emplearlos con pollo cocido en casas de la zona centro de México.	35
17	Acciones que se toman luego del uso de tablas o recipientes (A) y cuchillos (B) con pollo crudo, antes de emplearlos para picar frutas y/o verduras en casas de la zona centro de México.	35
18	Preferencia del tipo de almacenamiento y tiempo de almacenamiento en refrigeración del pollo cocido en casas de la zona centro de México.	36
19	Tipo de recipientes empleados para el almacenamiento de pollo cocido en casa de la zona centro de México.	36
20	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE de pollo almacenados a 25 °C durante tres días.	38
21	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE de pollo almacenados a 25 °C durante tres días.	39
22	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE de pollo almacenados a 14 °C durante quince días.	41
23	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE de pollo a 14 °C durante quince días.	42

24	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE de pollo almacenados a 9 °C durante quince días.	43
25	Formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE de pollo almacenados a 9 °C durante quince días.	44
26	Efecto de la interacción entre las cepas y el tipo de extracto en la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> a 25 °C.	46
27	Efecto de la interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tipo de extracto en la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> a 25 °C.	47
28	Efecto de la interacción entre las cepas y extracto en la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> a 9 y 14 °C.	50
29	Efecto de la interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tipo de extracto en la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> a 9 y 14 °C. A= 9 °C y B= 14 °C.	51
30	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE pollo a 25 °C.	54
31	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE pollo a 25 °C.	55
32	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE pollo a 14 °C.	56

33	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE pollo a 14 °C.	57
34	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en EE pollo a 9 °C.	58
35	Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación <i>in vitro</i> de biopelículas de <i>S. enterica</i> en ENE pollo a 9 °C.	59
36	Clasificación de cepas de <i>S. enterica</i> según su capacidad de formación <i>in vitro</i> de biopelículas a diferentes condiciones de almacenamiento y tipo de extracto.	60
37	Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> , CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con residuos de EEPKO almacenados a 25 °C durante tres días.	62
38	Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> , CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con remanente EEPKO a 25 °C durante tres días.	63
39	Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> , CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con remanente EEP a 25 °C durante tres días.	64
40	Efecto de la cepa en la formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C durante tres días.	67
41	Efecto de la interacción entre el tipo de extracto y tipo de material sobre la formación de biopelículas de <i>S. entérica</i>	67

en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C durante tres días.

- |    |                                                                                                                                                                                                            |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 42 | Efecto de la interacción entre el tipo de extracto y tiempo de almacenamiento sobre la concentración <i>S. enterica</i> en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C                 | 68 |
| 43 | Efecto de la interacción entre el cepa y tipo de superficie sobre la concentración de <i>S. enterica</i> a 25 °C.                                                                                          | 68 |
| 44 | Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> , CP (barras) y CB (línea azul) en superficies inertes con remanente de EEPCR a 14 °C durante quince días.                                                 | 70 |
| 45 | Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> , CP (barras) y CB (línea azul) en superficies inertes con remanente de EEPCR a 9 °C durante quince días.                                                  | 70 |
| 46 | Efecto del tipo de superficie sobre la cuantificación de biopolímeros formados por de <i>S. enterica</i> en superficies inertes con remanente de EEPCR a 9 y 14 °C durante quince días. A= 9 °C y B= 14 °C | 72 |
| 47 | Efecto de tiempo sobre la cuantificación de biopolímeros formados por <i>S. enterica</i> en superficies inertes con remanente EEPCR a 14 °C durante quince días.                                           | 73 |
| 48 | Formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> en superficies inertes con remanente EEPCR a 9 °C durante quince días.                                                                                     | 73 |
| 49 | Correlación de la formación de biopelículas de <i>S. enterica</i> (CB y CP) en remanentes de extractos de pollo en superficies inertes a 25 °C durante tres días.                                          | 74 |

- 50 Correlación de la formación de biopelículas de *S. enterica* (CB Y CP) en remanentes EEPCR en superficies inertes a 9 y 14 °C durante quince días. 75
- 51 Forma correcta de colocar los alimentos en el refrigerador. 111

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## RESUMEN

*Salmonella enterica* es un patógeno que representa un problema para la salud pública, ya que puede contaminar los alimentos durante diversas etapas de la cadena alimentaria. Además, llega a persistir en superficies, lo que se ha asociado a su capacidad de formar biopelículas. El pollo es uno de los alimentos más asociados con este patógeno. En este estudio se determinaron los hábitos de manipulación de pollo en el hogar mediante una encuesta en el centro del país. Posteriormente, se evaluó el efecto de la microbiota nativa (MN) de pollo (piel, pechuga cocida y cruda), empleando extractos estériles (EE) y no estériles (ENE), así como las condiciones de almacenamiento, 9 y 14 °C durante 15 días, y 25 °C durante 3 días, sobre la formación de biopelículas (FB) *in vitro* de nueve cepas de *S. enterica* mediante el ensayo de tinción con cristal violeta. Las cepas por cada tratamiento se clasificaron en nulas, débiles, moderadas o fuertes. Finalmente, se determinó la FB (cuantificación de polímeros y cuantificación del patógeno) de tres cepas seleccionadas en presencia de residuos de EE en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio). Como resultado se encontraron que se emplean prácticas inseguras durante la manipulación del pollo, como el uso indistinto de superficies para carne cruda y cocida. En los estudios *in vitro* se encontró una mayor FB en ENE (0.19 a 5.85 DO<sub>595nm</sub>) en todas las condiciones que en EE (0.079 a 1.50 DO<sub>595nm</sub>), lo que sugiere que la MN promueve la FB. Se observó una alta variabilidad en la clasificación la cual dependiendo del tipo de extracto como las condiciones de almacenamiento, nulas (0-71%), débiles (0-44.4%), moderadas (0-33.3%) y fuertes (0-88.9%). Finalmente, en las superficies inertes se encontró que las cepas de *S. enterica* muestra una mayor FB en plástico (0.74 a 0.97 DO<sub>595nm</sub>).

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son cualquier enfermedad resultado de la ingesta de agua o alimentos contaminados ya sea por agentes químicos (toxinas, metales, entre otros), por agentes físicos (fragmentos de vidrio, astillas de hueso, entre otros) o microbiológicos (parásitos, hongos, bacterias, virus), siendo estos últimos los responsables de la mayoría de las ETAs (OMS, 2015; Majumdar y col., 2018). Las ETAs causadas por microorganismos se pueden clasificar en infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones. Las infecciones son causadas por el consumo de alimentos contaminados por agentes patógenos, los cuales invaden y se multiplican en el huésped causando la enfermedad. Por otro lado, las intoxicaciones alimentarias son causadas por la ingesta de toxinas bacterianas o fúngicas, o metabolitos secundarios tóxicos generados por los microorganismos durante su crecimiento en un alimento. Las toxiinfecciones ocurren por la ingesta de células viables del patógeno y en el curso de la infección, estos microorganismos producen toxinas que causan la enfermedad (Majumdar y col., 2018).

Las ETAs tienen un impacto importante en la salud, por las muertes, hospitalizaciones, casos de enfermedad y reducción de los años de vida saludable que ocasionan. Además, generan un impacto negativo en el ámbito económico y social, por la disminución en la productividad de las personas (ausentismo laboral, bajo rendimiento), incremento de la demanda de servicios médicos y hospitalarios, decomiso de productos del mercado, desprestigio de empresas ante clientes y daño de imagen de productores ante el comercio nacional e internacional (Srey, Jahid y Ha, 2013; COFEPRIS, 2015; Ünüvar, 2018).

Cada año, varios patógenos causan enfermedades microbianas graves en humanos, millones de personas se enferman o incluso mueren por infecciones e intoxicaciones alimentarias. En América 77 millones de personas enferman cada año por ETAs, de las cuales mueren alrededor de 9 000, y los principales patógenos involucrados son norovirus, *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *Salmonella* no

tifoidea (OMS, 2015; Ünüvar, 2018). Siendo *Salmonella* no tifoidea uno de los principales patógenos responsables de las ETAs, cada año se reportan alrededor de 80.3 millones de casos humanos y 155,000 muertes en el mundo (Majowicz y col., 2010).

En México existe muy poca información acerca de los agentes patógenos que causan ETAs, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) un alto porcentaje de los casos de ETAs no puede asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable. Se estima que solo el 1% de los casos de ETAs son reportados a los sistemas de vigilancia epidemiológica del país, por lo tanto, el subregistro es considerable (COFEPRIS, 2015).

En México, de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), las principales enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo reportadas, son causadas por parásitos, tal como la amebiasis intestinal, causada por *Entamoeba histolytica* (Cuadro 1). Mientras que las enfermedades causadas por *Salmonella* no tifoidea (clasificado como “otras salmonelosis”), ocupan el sexto. En el año 2019 se reportaron un total de 76, 670 casos y en el año 2020 42, 864 casos de *Salmonella* no tifoidea (SSA, 2019 y SSA, 2020), de los cuales se estima que del 49 al 95% son asociados con el consumo de alimentos (Kimura y col., 2004, WHO, 2015). Sin embargo, en México, con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Zaidi, López-Macías y Calva, 2006).

Cuadro 1. Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo reportadas en México en el año 2020 (SSA, 2020).

Padecimiento	Número de casos
Enfermedades infecciosas intestinales	2,752,266
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	2,503,541
Amebiasis intestinal	111,054
Otras Helmintiasis	57,366
Otras infecciones intestinales debidas a Protozoarios	47,079
Otras salmonelosis	42,864
Ascariasis	23,502
Fiebre tifoidea	16,446
Intoxicación alimentaria bacteriana	16,446
Enterobiasis	6,041
Giardiasis	5,616
Para tifoidea	5,468
Absceso Hepático Amebiano	534
Cólera	-

### 1.2 *Salmonella* spp.

*Salmonella* es un género de microorganismos constituido por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos con flagelos periticos, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 1). Estos microorganismos poseen como principal reservorio el intestino de los animales homeotermos y poiquilotermos (Bhunja, 2008; Lambertini y col., 2019; Merino y col., 2019).

El género *Salmonella* está conformado por dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Sin embargo, el potencial patogénico de este género está representado por *S. enterica* ya que aproximadamente el 99% de las cepas de esta especie causan infección en humanos u otros mamíferos (Wigley y Barrow, 2017). *S. enterica* cuenta con más de 2600 serotipos descritos hasta la fecha, los cuales son distinguidos por sus variaciones en los antígenos O (somático) y H (flagelar) (Barreto y col., 2016; Kurtz y col., 2017; Ünüvar, 2018).

*S. enterica* serotipo Typhimurium y *S. enterica* serotipo Enteritidis son los dos serotipos más asociados como agentes causantes de salmonelosis (Wigley y Barrow, 2017). *S. enterica*, se transmite por la ruta fecal-oral, o a través de agua y alimentos contaminados (LaRock, Chaudhary y Miller, 2015; Majumdar y col., 2018).

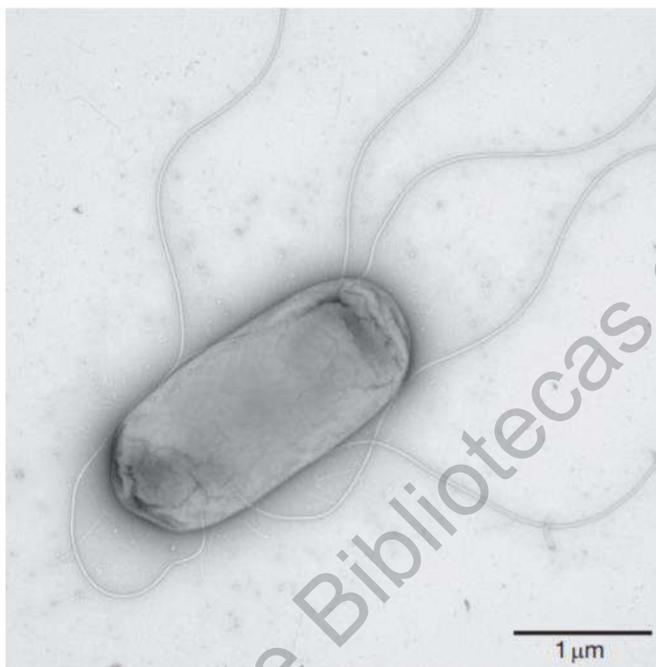


Figura 1. Imagen de *Salmonella* spp. en microscopio óptico. © Dr. Jochen Reetz, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany (Löfström, y col., 2016).

La dosis infecciosa de *S. enterica* varía entre 1 a  $10^9$  UFCg<sup>-1</sup> dependiendo de diferentes factores como el tipo de matriz alimenticia en la que se ingiere, la bacteria, tipo de cepa y el estado fisiológico del hospedero (Sánchez-Jiménez y Cardona-Castro 2003; Bhunia, 2008). Después de la ingesta de agua o alimentos contaminados, *S. enterica* inicia su ciclo de infección (Figura 2) invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide, (Figuroa-Ochoa y Verdugo-Rodríguez, 2005; LaRock, Chaudhary y Miller, 2015; Barreto y col., 2016). *S. enterica* es un patógeno intracelular facultativo ya que puede invadir macrófagos, células dendríticas y epiteliales. (Bhunias, 2008, Barreto y col., 2016, Dawoud y col., 2017). Para invadir cualquier tipo de célula, la bacteria emplea algunos mecanismos de adhesión que involucran varios tipos de fimbrias o pili (Sánchez Jiménez y Cardona Castro 2003).

*S. enterica* expresa diferentes tipos de fimbrias los cuales están definidos genéticamente: fimbria tipo I (Fim), fimbria codificada por plásmidos (Pef), fimbria polar larga (Lpf) y fimbria agregativa delgada (Curli), (Sánchez-Jiménez y Cardona-Castro 2003; Bhunia, 2008). Estas fimbrias promueven la adhesión a las células M o la colonización de las células epiteliales intestinales. Las fimbrias Fim se unen al receptor  $\alpha$ -D-manosa en la célula huésped, las Lpf se unen a las células en las placas de Peyer, las Pef y Curli ayudan a la adhesión a las células epiteliales intestinales y las Curli ayudan a las bacterias a autoagregarse, lo que ayuda la sobrevivencia en presencia de ácido estomacal o biocidas (Bhunias, 2008). Luego *S. enterica* puede causar infección por dos mecanismos, pasando a través de células mucosas microfold (células M) o colonizando las células epiteliales, hasta llegar a la lámina propia (Bhunias, 2008).

*S. enterica* puede atravesar las células M por medio de fagocitosis, ya que estas células y las células dendríticas (DC) ingieren microbiota luminal para mantener la homeostasis intestinal, este mismo proceso le permite a *S. enterica* atravesar la barrera epitelial. En la lámina propia, las células están engullidas en una vacuola por las DC o macrófagos residentes y pueden replicarse dentro de las células huésped o inducir apoptosis. Para iniciar una respuesta inmune adaptativa, las DC también sirven como células presentadoras de antígeno y activa las linfocitos o células T y B que son las células encargadas de la defensa específica del sistema inmune y presentan receptores en su membrana, que les permiten reconocer una enorme variedad de patógenos (Gonzalez-Fernandez, Fernandez-Mastache, y Lorenzo-Abalde, 2005; Bhunias, 2008).

Para colonizar las células epiteliales *S. enterica* atraviesa la pared intestinal empleando un sistema de secreción tipo III que también se denomina jeringa molecular y es responsable de la secreción de proteínas de virulencia a las células huésped (Bhunias, 2008; LaRock, Chaudhary y Miller, 2015). Estas proteínas forman un orgánulo con forma de aguja en la envoltura bacteriana, las cuales provocan un reacomodo de los filamentos del citoesqueleto de las células creando membranas ondulatorias que rodean a la bacteria patógena y la introducen a las células del

intestino y las bacterias internalizadas se establecen en una vacuola unida a la membrana, llamada vacuola que contiene a *Salmonella* (VCS), dentro de esta es capaz de evadir la actividad lítica de los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo de su hospedero (Sánchez-Jiménez y Cardona-Castro 2003; Bhunia, 2008; LaRock, Chaudhary y Miller, 2015; Barreto y col., 2016).

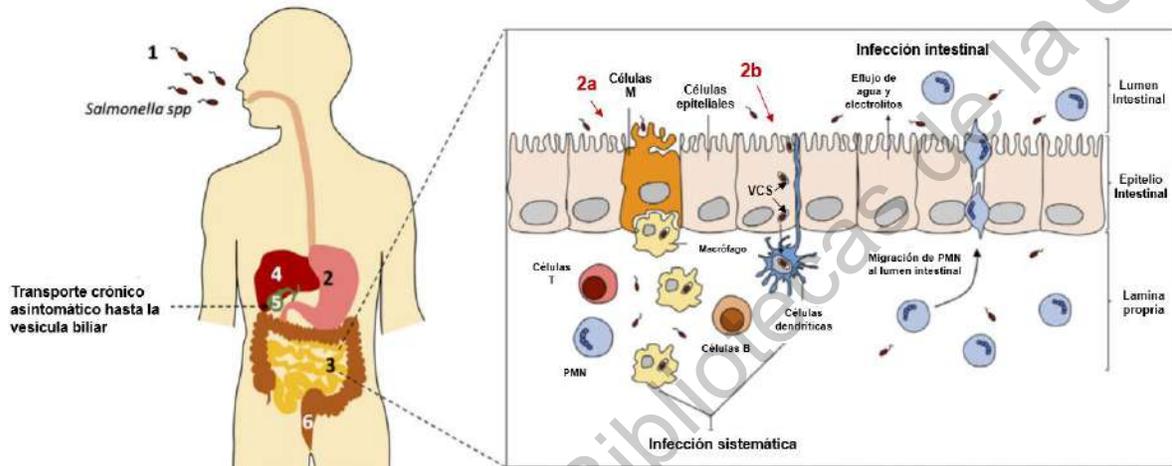


Figura 2. Ciclo de infección de *S. enterica*. (1) La infección comienza con la ingestión de alimentos o agua contaminados. (2) Sobrevivencia a las condiciones del estómago. (3) 2a. Invasión de células M. 2b Colonización de células epiteliales intestinales. Migración a la lámina propia. Pueden ocurrir dos tipos de infección: gastroenteritis e infección sistémica. (4) Durante sistémica diseminada, *S. enterica* coloniza el hígado, el bazo y la médula ósea. (5) Desde el hígado, *S. enterica* llega a la vesícula biliar y puede provocar una infección crónica (6) Los portadores de *S. enterica* excretan bacterias en el intestino delgado tras la secreción de bilis, y las heces contienen células de *S. enterica*. PMN: Células inmunitarias (neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos) (Urdaneta y Casadesús, 2017).

*Salmonella* spp. puede causar principalmente dos cuadros de enfermedad dependiendo el serotipo. *S. enterica* no tifoidea causa salmonelosis, una gastroenteritis en la cual sus principales síntomas son diarrea, dolor abdominal, náuseas, y a veces fiebre aguda, dolor de cabeza, y vómitos. Ocasionalmente, se reporta causa nefritis y manifestaciones sistémicas, incluida la septicemia. La tasa

de letalidad para salmonelosis es de aproximadamente 0.004% (Kennedy y col., 2004; Ünüvar, 2018; Bareto y col., 2016). Estos síntomas aparecen dentro de las 6 a 24 h y pueden persistir por 2 a 3 días, o incluso causar la muerte (Bhunja, 2008; Ünüvar, 2018; Bareto y col., 2016). La tasa de mortalidad por salmonelosis es del 4.1%. Se pueden observar formas sistémicas de la enfermedad en niños o adultos inmunocomprometidos, incluidos pacientes con cáncer y SIDA (Bhunja, 2008). Los pacientes en recuperación o asintomáticos pueden servir como portadores crónicos, y diseminar al patógeno ya que este puede persistir de 3 meses hasta 1 año.

Mientras que *S. enterica* serotipo Typhi y *S. enterica* serotipo Paratyphi causan fiebre tifoidea o paratifoidea, respectivamente, la cual se destaca por sus síntomas como son fiebre, cefalea, escalofríos, estreñimiento, tos, aunque también puede causar diarrea, náuseas, vómito y dolor abdominal. La tasa de letalidad para estas dos enfermedades es del 1-4% para fiebre tifoidea y 0.5% para la fiebre paratifoidea, la cual es generalmente menos grave. (Barreto y col., 2016).

### 1.3 *Salmonella enterica* en pollo.

Una de las formas más frecuentes de contraer salmonelosis es a través del consumo de alimentos contaminados como agua, leche, carne, huevos, aves de corral, condimentos, vegetales, chocolate, entre otros (Ünüvar, 2018; OMS, 2019).

El pollo es uno de los productos alimenticios más asociado con brotes de infecciones causadas por *S. enterica* (Adelantado-Faura y col., 2008; Lambertini y col., 2019). En Estados Unidos de América, este patógeno causa un estimado de 1.2 millones ETAs, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes anuales de los cuales el 10.4% de los casos es asociado al consumo de pollo, posicionando a este alimento en tercer lugar, precedido por productos hortofrutícolas (16.6%) y huevos (11.5%) (Lambertini y col., 2019).

La contaminación con *S. enterica* en productos de pollo puede ocurrir en cualquier etapa de la cadena alimentaria “del campo a la mesa”, que consiste en la producción, procesamiento, distribución, comercialización minorista, manipulación

y preparación (Adelantado-Faura y col., 2008; Procura y col., 2017; Lambertini y col., 2019).

*S. enterica* no es parte de la microbiota intestinal normal de los pollos. Sin embargo, en la primera etapa de la cadena alimentaria (crianza) la pueden adquirir, por condiciones prevalecientes del medio ambiente. El patógeno puede llegar a colonizar el tracto entérico de las aves y posteriormente ser eliminada en su materia fecal y esta puede llegar a contaminar a las carcasas de pollo durante el procesado en los mataderos (Adelantado-Faura y col., 2008; Procura y col., 2017; Lambertini y col., 2019). Factores como la calidad del alimento, el estrés o malestar de los animales, algunas características de la granja como la inadecuada limpieza y desinfección, la presencia de escarabajos o roedores que puedan diseminar la bacteria, la limpieza y desinfección de los mataderos, así como las prácticas de manejo de las canales, pueden afectar la prevalencia de *Salmonella enterica*. Las operaciones agrícolas de alta densidad permiten que las aves colonizadas propaguen rápidamente la *S. enterica* a otras aves dentro de una bandada. (Heybdrick y col., 2002; Bhunia, 2008; Rostagno, 2009, Lannetti y col., 2020). Otro factor importante por tomar en cuenta durante la crianza de las aves, incluyendo el pollo, es el uso de grandes cantidades de antimicrobianos para promover el crecimiento, la profilaxis y la terapia en la producción avícola, lo que conlleva a que las aves de corral frecuentemente alberguen cepas de *S. enterica* resistentes a los antimicrobianos, las cuales pueden transmitirse a los humanos a través de la cadena alimentaria (Yang y col., 2020; Gong y col., 2016).

Se ha reportado que el 48% de la contaminación de productos de pollo ocurre durante su procesamiento (Rajan y col., 2016). En la industria el pollo puede tener un proceso primario, para obtener partes y cortes, durante este proceso las aves se someten a aturdimiento, desangrado, escaldado, desplumado, evisceración, lavado y refrigeración (Días y col., 2015; Rajan y col., 2016). También puede tener un procesamiento secundario o adicional como la producción de carne molida o procesos que implican deshuesar, recortar, desollar, picar, ablandar, moler, tritular y mezclar, entre otros y si no se toman las medidas adecuadas cada uno de estos

pasos pueden ser fuente de contaminación (Wu y col., 2014; Días y col., 2015; Rajan y col., 2016). Las principales fuentes de contaminación en las plantas de procesamiento por *S. enterica* son la propagación de desechos de la evisceración, el equipo de sacrificio sucio, utensilios y herramientas durante el procesamiento de las canales, así como agua contaminada utilizada en otros pasos del proceso (Henry y col., 2012; Hamidi y col., 2014; Wu y col., 2014, Rajan y col., 2016). La resistencia de *S. enterica* a la desinfección y los tratamientos antimicrobianos de equipos y utensilios puede promover la persistencia durante el procesamiento y la posterior contaminación de los productos terminados (Arslan y Eyi, 2010; Wu y col., 2014).

De igual forma en el hogar puede existir una contaminación por un inadecuado o nulo proceso de lavado y desinfección de superficies que hayan estado en contacto con el pollo crudo (cuchillos, tablas de picar y superficies de preparación), propiciando una contaminación cruzada entre carne cruda y los alimentos que contacten posteriormente esas superficies (Hillers y col., 2003; Carrasco y col., 2012). En un estudio realizado en el centro del país se encontró que alrededor del 15 % de la población usa la misma tabla de picar y cuchillo para productos diferentes (Godínez-Oviedo y col., 2019), lo cual podría conducir a una contaminación cruzada.

En México la carne de pollo es el principal cárnico consumido; en 2019 el consumo nacional *per cápita* de pollo fue de 33.7 kg, mientras que para el 2020 se estima un consumo de 34.5 kg (CMC, 2019). México es el segundo país de Latino América con mayor nivel de consumo de pollo (SAGARPA, 2018) (Figura 3), por tanto, el alto consumo puede generar mayor riesgo de enfermarse por este alimento, comparado con otros alimentos.



Figura 3. Niveles de producción y consumo mensual de carne de pollo en México en el año 2019 (CMC, 2019).

Además, la falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *S. enterica* en las diferentes clases de alimentos (Zaidi, López-Macías y Calva, 2006), así como saber cuáles son los alimentos más involucrados con esta enfermedad. En el grupo de trabajo se desarrolló una priorización de 25 alimentos de acuerdo con su riesgo potencial de causar salmonelosis, encontrándose en el primer lugar la carne de pollo (Godínez-Oviedo, 2019) (Figura 4).

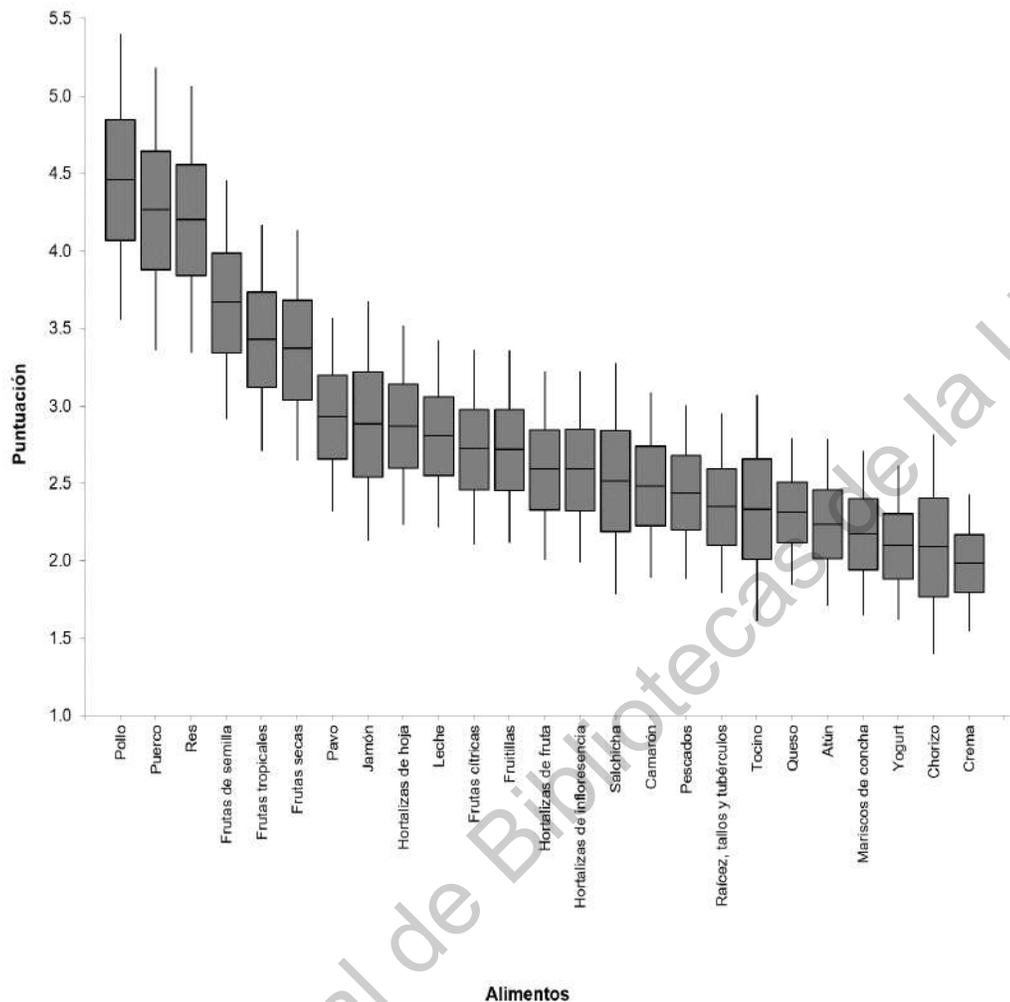


Figura 4. Priorización de alimentos de acuerdo con su asociación con *S. enterica* en la zona centro de México. (Godínez-Oviedo, 2019).

#### 1.4 Formación de biopelículas de *Salmonella enterica* y contaminación cruzada.

Dentro de la naturaleza, así como en los sistemas alimentarios, las bacterias pueden existir como células planctónicas, que existen libremente, o como células sésiles, cuando se adhieren a una superficie, y pueden llegar a formar parte de una biopelícula (Nguyrn, Yang y Yuk, 2013). Las biopelículas se definen como comunidades estructuradas de células bacterianas embebidas en una matriz polimérica autoproducida, que pueden tener una composición química muy diversa y pueden incluir polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Conrad, 2012; Stoodly y col., 2002),

estas biopelículas pueden formarse y persistir en superficies tanto vivas como inertes (Srey, Jahid y Ha, 2013).

*S. enterica* es un patógeno intestinal, que está profundamente adaptado a vivir fuera de organismos huéspedes, en cuanto está en contacto con superficies es capaz de adherirse irreversiblemente a ellas y posteriormente desarrollar una comunidad microbiana y formar biopelículas (Srey, Jahid y Ha, 2013). *S. enterica* tiene la capacidad de formar biopelículas en superficies vivas, como en diferentes partes de plantas (semillas, germinados, raíces y frutas) (Mahon y col., 1997; Campbell y col., 2001; Guo y col., 2001; Klerksy col., 2007), en células epiteliales (Althouse y col., 2003; Ricke, 2003; Morgan y col., 2004), cálculos biliares (Tsolis y col., 2008); y en superficies inertes como plástico (Stepanovicy col., 2004), cemento (Joseph y col., 2001), vidrio (Prouty y Gunn, 2003; Solano y col., 2002) y acero inoxidable (Joseph y col., 2001).

La formación de biopelículas es un proceso dinámico con diferentes fases (Figura 5) (Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018):

- 1) Adhesión inicial o reversible: En esta etapa las células se adhieren a la superficie, esta primera etapa de adhesión es reversible ya que los microorganismos unidos aún no han tenido cambios morfológicos del proceso de diferenciación, cambios que conducen a la formación de biopelículas, y muchas de las células pueden desprenderse de la superficie y volver al estilo de vida planctónico (Srey, Jahid y Ha, 2013). La adhesión inicial de las bacterias puede ser activa o pasiva, dependiendo de la motilidad o del transporte gravitacional de la célula planctónica (flotación libre), difusión o fuerza de corte de la fase líquida (Fank, 2001). La adhesión de células durante este proceso depende fuertemente de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula (Srey, Jahid y Ha, 2013). Primero las células adherentes, que son aquellas que originan la formación de la biopelícula en la superficie, poseen solo una pequeña cantidad de sustancias poliméricas, (Frank, 2001; Stoodly y col., 2002), La superficie también tiene un rol importante en la adhesión de las bacterias ya que depende de las

propiedades fisicoquímicas de ésta como la textura (rugoso o liso), carga de la superficie, hidrofobicidad, pH, temperatura y nutrientes disponibles; generalmente, cualquier superficie es vulnerable a la formación de biopelículas incluyendo plástico, vidrio, metal, madera y alimentos (Stoodly y col., 2002; Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018).

- 2) Adhesión irreversible: En esta etapa hay un cambio y pasa de haber interacción débil entre la bacteria y la superficie, a una unión permanente con la presencia de las sustancias poliméricas formadas por las bacterias. En etapa se requiere de detergentes, surfactantes, desinfectantes, calor y/o ultrasonido para remover la biopelícula (Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018). Para crecer y desarrollar una biopelícula madura, las bacterias deben mantener el contacto con el sustrato, que provee los nutrientes, y con la superficie (Stoodly y col., 2002). La transición de una interacción débil de la célula con el sustrato a un enlace permanente frecuentemente es mediada por la presencia de polímeros extracelulares, que rodean a las bacterias. Estos polímeros extracelulares generados por algunos microorganismos son polímeros biosintéticos que pueden tener una composición química muy diversa y pueden incluir polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Conrad, 2012; Stoodly y col., 2002). Investigaciones más recientes sugieren que la interacción entre la superficie y las bacterias se debe a cambios fisiológicos más profundos de las bacterias, como puede ser un cambio de motilidad de los flagelos (Conrad, 2012). Los flagelos tienen un papel importante en la adhesión e invasión, son el principal organelo encargado de la motilidad y quimiotaxis y tienen diferentes funciones a lo largo del ciclo de vida de las bacterias como en la formación de biopelículas, exportación de proteínas y adhesión (Conrad, 2012). La adhesión bacteriana es un paso inicial crítico para la colonización y persistencia. Por lo tanto, la motilidad de la bacteria cambia del estilo de vida móvil al sésil y viceversa y estos cambios se desencadena por diferentes condiciones ambientales, como temperatura, osmolaridad y pH (Haiko y Westerlund-Wikström, 2013). El cambio de

motilidad es mediado por el mecanismo pili tipo IV, este proceso requiere que las bacterias cambien sus fenotipos de motilidad de la natación libre a la motilidad superficial, es decir de manera lineal, se cree que los flagelos polares se extienden y retraen, impulsando las bacterias a través de una superficie (Conrad, 2012). Además, los flagelos también pueden actuar como adhesinas que adhieren las bacterias a las superficies y entre sí (Conrad, 2012). El cambio de motilidad en bacteria es la principal razón de la rápida colonización de comunidades bacterianas en superficies bajo condiciones de alta disponibilidad de nutrientes y en superficies húmedas (Mattick, 2002).

- 3) Formación de microcolonias: En esta etapa ocurre la formación de microcolonias y el temprano desarrollo de la arquitectura de las biopelículas (Srey, Jahid y Ha, 2013). La formación de microcolonias procede luego de la adhesión irreversible que proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento y resulta de una agregación simultánea de microorganismos que es acompañada por polímeros extracelulares (Chmielewski y Frank, 2003; Srey, Jahid y Ha, 2013). Se ha demostrado que en esta etapa hay reclutamientos de células planctónicas del medio que rodea las biopelículas, como resultado de comunicación de *quorum sensing*, proceso que se basa en la producción y excreción de moléculas de bajo peso molecular (autoinductores) por parte de la célula que sirve de señal química para permitir que toda la población inicie una acción determinada, una vez alcanzada una alta densidad poblacional. Los autoinductores iniciarán la liberación de polímeros formando una red que permitirá agrupar a toda la población y adherirla, lo que ayuda a fortalecer los enlaces entre la bacteria y la superficie, lo que estabiliza la colonia de cualquier estrés ambiental (Chmielewski y Frank, 2003). Las microcolonias pueden ser muy beneficiosas ya que proporcionan un intercambio de sustrato entre especies y/o la eliminación mutua de metabolitos secundarios de las bacterias (Srey, Jahid y Ha, 2013).
- 4) Maduración: Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento y aglomeración suficientes, la biopelícula en la naturaleza puede desarrollar

una estructura organizada (Chmielewski y Frank, 2003). La biopelícula madura puede consistir en una capa de células embebidas en el polímero extracelular poroso o microcolonias multicapas sueltas empaquetadas unidas con polímero extracelular e intercaladas con canales de agua (Chmielewski y Frank, 2003). Las bacterias crecen bajo forma sésil en microcolonias heterogéneas, que incluso llega a una saturación de la población (Chmielewski y Frank, 2003; Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018).

- 5) **Dispersión:** La dispersión es el último paso en el ciclo de formación de biopelículas, y permite que las células vuelvan a su forma planctónica. En esta etapa las biopelículas se desprenden de la superficie por diferentes razones, como puede ser alguna perturbación externa o por un proceso interno de la biopelícula como una degradación endógena enzimática o la busca de ambientes ricos en nutrientes por la sobrepoblación de la misma (Stoodly y col., 2002; Srey, Jahid y Ha, 2013).

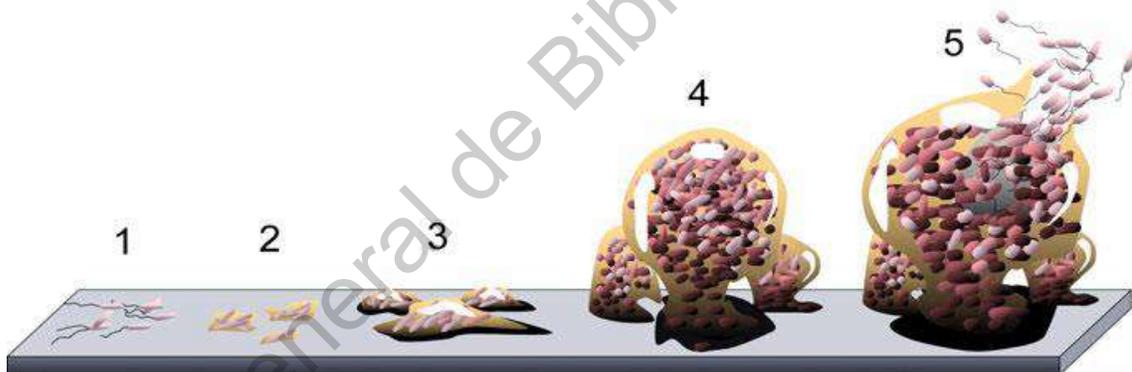


Figura 5. Etapas de desarrollo de biopelículas. Esta figura muestra 5 etapas del desarrollo: 1) Adhesión inicial o reversible, 2) Adhesión irreversible, 3) Formación de microcolonias, 4) Maduración, 5) Dispersión. (Srey, Jahid y Ha, 2013).

La capacidad de los microorganismos para adherirse a las superficies y formar biopelículas plantea un riesgo significativo para la industria alimentaria y algunas de sus consecuencias son la persistencia de patógenos en superficies de trabajo, deterioro del producto, la reducción de la eficiencia de producción, y olores desagradables (Nguyrn, Yang y Yuk, 2013). También se ha reportado que muchos brotes están asociados con la formación de biopelículas, y por lo tanto se les

reconoce como una fuente frecuente de contaminación, ya que por su dificultad para eliminarlas de las superficies donde se manipulan o procesan alimentos pueden causar una contaminación cruzada o directa, la cual se define como la transferencia de agentes contaminantes de un alimento u objeto contaminado a otro que no lo está (Srey, Jahid y Ha, 2013).

Se ha demostrado que la formación de biopelículas le confiere a *S. enterica* una mayor resistencia a antimicrobianos y a otros ambientes hostiles como desinfectantes, desecación, exposición a luz UV, al calentamiento, frío, fuerzas de corte, entre otros, ya que actúa como una barrera (Nguyrn, Yang y Yuk, 2013; Iñiguez-Moreno y col., 2019). La capacidad de formar biopelículas por parte de *S. enterica* en superficies sugiere que puede propiciar una contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, de superficies inertes en las cuales haya desarrollado una biopelícula hacia alimentos listos para el consumo. Li y col. (2017) evaluaron el desarrollo de biopelículas de *S. enterica* en presencia de jugo de carne de pollo estéril, donde se encontró que el jugo de carne en las superficies inertes facilita la formación de biopelícula, ya que este extracto podría actuar como acondicionador de superficie para apoyar la unión inicial y la formación de biopelículas. Una desventaja de los estudios de formación de biopelículas que se han realizado hasta ahora es que no toman en cuenta la microbiota nativa (MN) del producto, la cual puede estar influenciando tanto de manera negativa como positiva el comportamiento de *S. enterica*.

Por otro lado, Dantas y col. (2017), encontraron que cuando *S. enterica* forma biopelículas en superficies inertes (plástico, madera, y vidrio), el patógeno persiste en todas las superficies aún después de haber sido sometidas a un proceso de lavado. De la misma forma evaluaron la contaminación cruzada en un escenario pollo crudo - superficies inerte - pepinos encontrando una alta tasa de transferencia de *S. enterica* al pepino. A pesar de que existen estudios que han evaluado la contaminación cruzada de pollo crudo - superficies inertes - pollo cocido (Oscar, 2013), o de pollo crudo - superficies inertes - jitomate (Gkana y col., 2016), hasta ahora únicamente Dantas y col. (2017) han tomado en cuenta la formación de

biopelículas durante la modelación de los escenarios de contaminación cruzada. Dado lo anterior, es importante generar información sobre el efecto de la MN de los alimentos, temperatura y tipos de superficies sobre la formación de biopelículas de *S. enterica* para posteriormente poder desarrollar modelos de contaminación cruzada de superficies inertes a productos alimenticios más realistas, no únicamente de células adheridas, sino también de células embebidas en una biopelícula.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 2. HIPÓTESIS.

Los residuos de piel, carne cruda y cocida promueven la formación de biopelículas de *S. enterica*, y la presencia de la microbiota nativa del pollo en estos residuos genera sinergismo con el patógeno para incrementar la producción de los biopolímeros.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los residuos de piel, carne cruda y cocida con y sin microbiota nativa sobre la formación de biopelículas de *S. enterica*, así como su interacción con las condiciones de almacenamiento y el tipo de superficie.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Conocer las prácticas de manipulación de pollo en el hogar que puedan favorecer a la formación de biopelículas y una posterior contaminación cruzada de pollo crudo a un alimento cocinado.
- Evaluar el efecto de la microbiota nativa de pollo en la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en presencia de extractos de piel, carne cruda y cocida de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.
- Evaluar la formación de biopelículas de *S. enterica* sobre plástico, acero inoxidable y vidrio en presencia de extractos estériles de piel, carne cruda y cocida de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales y reactivos

- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Gradillas
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas estériles
- Cajas Petri
- Microplacas de 96 pozos
- Tubos eppendorf
- Frascos Scott
- Filtros estériles
- Unidades de filtración
- Frascos de dilución
- Vasos de precipitados
- Tablas para cortar alimentos de plástico (grado alimenticio) vidrio (convencional, BK7) y acero inoxidable (grado alimenticio 316)
- Pinzas de metal
- Cuchillos
- Caldo soya tripticaseína (NEOGEN, EE.UU.)
- Agar soya tripticaseína (NEOGEN EE.UU.)
- Agar para métodos estándar (DIBICO, México)
- Agar rojo violeta bilis (DIBICO, México)
- Rifampicina (RIFADIN SANOFI, Francia)
- Cloruro de sodio (NaCl) (MEYER, México)
- Cristal violeta (MEYER, México)
- Metanol (MEYER, México)

Se trabajó con 8 cepas de *S. enterica* (AGO\_241, AGO\_247, AGO\_275, AGO\_319, AGO\_335, AGO\_336, AGO\_345, AGO\_389) obtenidas en un proyecto de doctorado del Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA), las cuales se aislaron de pollo crudo

comprado en tres estados del centro del país, y con una cepa de referencia (S. Typhimurium ATCC ® 14028™). Las cepas empleadas se hicieron resistentes al antibiótico Rifampicina (R+).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.

Se realizó una encuesta en línea en 11 estados de la región central de México (Aguascalientes, Colima, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Querétaro y Ciudad de México), empleando un formulario Google (<https://forms.gle/cVfyMjgGRWKvfKHf7>). La encuesta fue difundida empleando redes sociales a partir del mes de abril hasta octubre del 2020. La encuesta consistió de 21 preguntas (ver Anexo I), de las cuales se incluyeron algunas demográficas (sexo, edad, lugar de residencia), y cuestionamientos sobre hábitos de compra de pollo fresco, hábitos de almacenamiento del pollo crudo y cocido como tiempo, temperatura, material del recipiente y lugar donde se almacena en el refrigerador, también se realizaron algunas preguntas sobre las prácticas de manipulación del pollo a la hora de cocinarlo y sobre prácticas de limpieza y clasificación de utensilios como tablas y cuchillos que se pueden emplear durante la preparación del mismo. El tamaño de la muestra se calculó con la fórmula de población infinita Eq (1) (Godínez-Oviedo y col., 2019).

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times P \times q}{d^2}$$

Donde  $n$  es el tamaño de la muestra,  $Z$  es el nivel de confianza (99%),  $P$  es la probabilidad de éxito (0.5),  $q$  es la probabilidad de falla (0.5) y  $d$  el error máximo permitido (0.05 valor mínimo).

### 4.2.2 Preparación de extractos de pollo.

Se prepararon dos tipos de extractos para cada una de las partes a evaluar (piel, carne cruda y carne cocida), uno estéril (EE) y el otro sin esterilizar (ENE). Para el ENE se colocó la muestra de pollo (piel, carne cruda o carne cocida) en una bolsa estéril, posteriormente se adicionó agua destilada en una proporción 1:10 y la

muestra se procesó en un homogeneizador de paletas (BagMixer Interscience, México) durante 1 min a velocidad media. Cada solución obtenida se hizo pasar a través de un colador. El líquido decantado se pasó a través de una unidad de filtración estéril con papel filtro convencional, esto se repitió dos veces, agregando una capa extra en cada filtración; este paso se realizó nuevamente empleando papel Whatman 40 (los ENE se prepararon el mismo día de su uso). Para el caso del ENE de pechuga cocida, previamente la pechuga cruda se cocinó a 74 °C durante 3 min de cada lado. Se realizó recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT) y bacterias psicrótrofas (P), a partir de los ENE (ver sección 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5).

Para la preparación de los EE se realizó el procedimiento anterior agregando un paso de centrifugado (6000 rpm/ 3 min) y los sobrenadantes se filtraron con una membrana estéril (0.22 µm). Los extractos se congelaron para su posterior uso. Para asegurar la esterilidad de los extractos, previo a su uso, se tomó aproximadamente 1 mL y se colocó en tubos con caldo soya tripticaseína (CST), los cuales se incubaron a 35 °C durante 48 h y se verificó que no presentara turbidez.

#### 4.2.3 Recuento bacterias mesófilas aerobias (BMA).

El recuento de BMA se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa realizando las diluciones pertinentes; se utilizó agar para métodos estándar, y las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

#### 4.2.4 Recuento de bacterias coliformes totales (CT).

El recuento de CT se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa realizando las diluciones pertinentes; se utilizó agar rojo violeta bilis y las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

#### 4.2.5 Recuento de bacterias psicrótrofas (P).

El recuento de P se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa realizando las diluciones pertinentes; se utilizó agar para métodos estándar y las placas se incubaron a 10 °C durante 5 días.

#### 4.2.6 Preparación del inóculo.

Las cepas *S. enterica* R+ almacenadas a -80 °C, se descongelaron y se estriaron en tubos de agar base sangre inclinado, los cuales se incubaron a 35 °C durante 24 h. Posteriormente se inocularon en tubos eppendorf con 1 mL CST y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego de la incubación, se realizó el lavado de las cepas centrifugando los cultivos a 15000 x g / 3 min, realizando 2 lavados con 1 mL de solución isotónica al 0.85% (SSI), y finalmente se resuspendió cada cepa en 1 mL SSI.

#### 4.2.7 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación de biopelículas *in vitro* de *S. enterica*.

A las cepas de *S. enterica* R+ se les determinó su capacidad para formar biopelículas *in vitro* mediante el ensayo en microplacas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Beshiru y col. (2018) con algunas modificaciones. En cada uno de los pozos de una microplaca, se colocaron 180 µL de extracto de pollo (ENE o EE) y se inocularon independientemente con 20 µL (10<sup>4</sup> UFC/mL) de cada una de las cepas de *S. enterica*, se incluyó como blanco dos pozos con cada uno de los extractos sin inocular y como control positivo CST inoculado. Las microplacas se incubaron a 9, 14, y 25 °C sin agitación, y se realizaron mediciones del desarrollo y formación de biopelículas a los 5, 10 y 15 días para 14 y 9 °C, y a las 24, 48 y 72 h para la temperatura de 25 °C y. El desarrollo de *S. enterica* se evaluó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm y la formación de biopolímeros se realizó mediante la tinción con cristal violeta. Para ello se decantó el cultivo y se realizaron 2 lavados con SSI; después se añadieron 200 µL de metanol y se dejaron reposar por 15 min, transcurrido el tiempo se decantó el líquido y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido el tiempo, se le adicionaron 200 µL de una solución de cristal violeta (0.1%; m/v) y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. El colorante se decantó y se realizó dos enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se añadieron 200 µL de ácido acético (30%; v/v) y se midió la DO a 595 nm en un lector de placas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Este procedimiento se realizó con cada uno de los extractos (EE y ENE).

Para los ENE, luego de la medición del desarrollo, se realizó la cuantificación de BMA, CT y P de los blancos (ver sección 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5), y posteriormente se evaluó la formación de biopelículas. Se realizaron dos experimentos independientes con tres réplicas.

Las cepas se clasificaron basados en la DO de la FB de acuerdo con las categorías propuestas por Stepanovic y col. (2000): productora nula, débil, moderada o fuerte de biopelículas. El corte de DO (DOc) se definió como tres desviaciones estándar por encima de la media de DO del control negativo.

Cuadro 2. Criterios de clasificación de las cepas de *S. enterica* según su capacidad para formar biopelículas.

Criterio	Clasificación
$DO \leq DOc$	Nula
$DOc < DO \leq (2 \times DOc)$	Débil
$(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$	Moderada
$(4 \times DOc) < DO$	Fuerte

4.2.8 Evaluación de la formación de biopelículas de *S. enterica* en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.

Para este procedimiento se utilizaron cuadros (1 x 1 cm) de superficies de acero inoxidable grado alimenticio, tablas para picar de plástico y vidrio. Las superficies se colocaron en tubos falcón de 15 mL (se emplean 16 tubos para cada superficie, cada cepa y cada extracto) y se esterilizaron a 121 °C durante 15 min, posteriormente se añadieron a cada tubo 2 mL de extracto estéril, de tal forma que cubriera por completo las superficies, y se inocularon de manera independiente con 200 µL ( $10^4$  UFC/mL) de cada una de las cepas y se incubaron sin agitación a 25 °C durante 4 h. Concluidas las 4 h de incubación, las superficies se enjuagaron dos veces añadiendo 2 mL de SSI y vertiendo cuidadosamente. Para la cuantificación de las células adheridas en las superficies, se tomaron dos tubos con superficies de cada material y extracto se adicionó 1 mL de DP y se homogeneizó en un vortex por 30 seg y a partir de la suspensión se hicieron las diluciones pertinentes. Se empleó

la técnica de extensión por superficie en agar soya tripticaseína, las placas se incubaron a 35 °C durante 25 h.

Finalmente, para propiciar la formación de biopelículas en los tres tipos de superficies con las células de *S. enterica* adheridas se realizó un enjuague con una solución de los extractos al 10%, según correspondió. Una vez realizados los enjuagues las superficies se colocaron dentro de contenedores de plástico con cierre hermético a una humedad relativa (HR) de 97%, ajustada mediante la adición de una solución saturada de sales de sulfato de potasio, la HR se midió con el equipo AquaLab (Decagon Device, Inc., EE. UU.), los contenedores se incubaron a 25 °C durante y 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo se realizó la cuantificación de *S. enterica* embebida en la matriz polimérica (CP) y de biopolímeros (CB). La CP se realizó como se mencionó anteriormente para las células adheridas. La CB se realizó tomando las superficies de cada material, a las cuales se les realizaron dos enjuagues con SSI, y posteriormente se les añadió 2 mL de una solución de cristal violeta (0.1% m/v) por 5 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril y finalmente, las superficies se depositaron en otro tubo falcón limpio y se añadió 1 mL de ácido acético (30%, v/v) y se homogeneizó con un vortex por 30 seg, y de estos tubos se tomaron 200 µL y se transfirieron por triplicado a una microplaca de 96 pozos para realizar la medición de la DO a 595 nm en un lector de placas (Varioskan, Thermo Scientific), de cada muestra se obtuvo el promedio.

Este procedimiento se realizó también para las condiciones de 9 y 14 °C durante 5, 10 y 15 días de almacenamiento. A estas condiciones únicamente se emplearon superficies de tabla para picar de plástico y vidrio en extracto estéril de pechuga cruda. Las condiciones se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en la encuesta realizada (sección 4.2.1) que mostraron las tablas de plástico y el vidrio son los materiales más empleados en la cocina, así como la pechuga es la parte del pollo que más se manipula en casa.

#### 4.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se analizarán estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) comparando las medias con la prueba de Tukey y Dunnett con un nivel de significancia de 5%, empleando el programa estadístico JMP 8. (JMP Statistical Discovery™ 5.01 from the SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.**

Con la finalidad de conocer los hábitos de manipulación del pollo en casa, se realizó una encuesta en la región centro del país. La encuesta fue respondida por 688 personas de un amplio rango de edad (entre 15 y mayores a 65 años), de las cuales más de la mitad se encuentra entre los 20 y 30 años, siendo el 63% mujeres y el 37% hombres.

La primera pregunta fue si las personas piden que le retiren la piel al pollo o no cuando lo compran, a lo que el 66 % de las personas respondieron que sí, el 24% que no y al 10% le es indiferente. Esta información permite tener una idea de la probabilidad de que el pollo este contaminado con algún microorganismo patógeno ya que se ha encontrado que en la piel hay una mayor cantidad de bacterias (Tan y Dykes, 2014) y mayor incidencia de patógenos que en la carne (Gonçalves-Tenório, 2018). Además, ya que uno de los objetivos de este estudio fue evaluar FB a través de ensayos de laboratorio en superficies inertes en contacto con remanentes de extractos de diferentes partes de pollo, esta información permitió conocer cuáles son los escenarios más comunes.

En el caso del almacenamiento del pollo, la encuesta arrojó como resultado que el pollo crudo se almacena principalmente en congelación (43.5%), seguido de refrigeración (39.9%), y en un mínimo de ocasiones no se almacena ya que se consume el mismo día. De aquellas personas que almacenan el pollo, en su mayoría lo consume entre los primeros tres días después de haberlo adquirido, mientras que hay personas que lo almacenan hasta por más de cinco días (Figura 6). Lo

recomendado por la USDA (2015) es que el pollo crudo fresco se almacene como máximo hasta dos días en refrigeración.

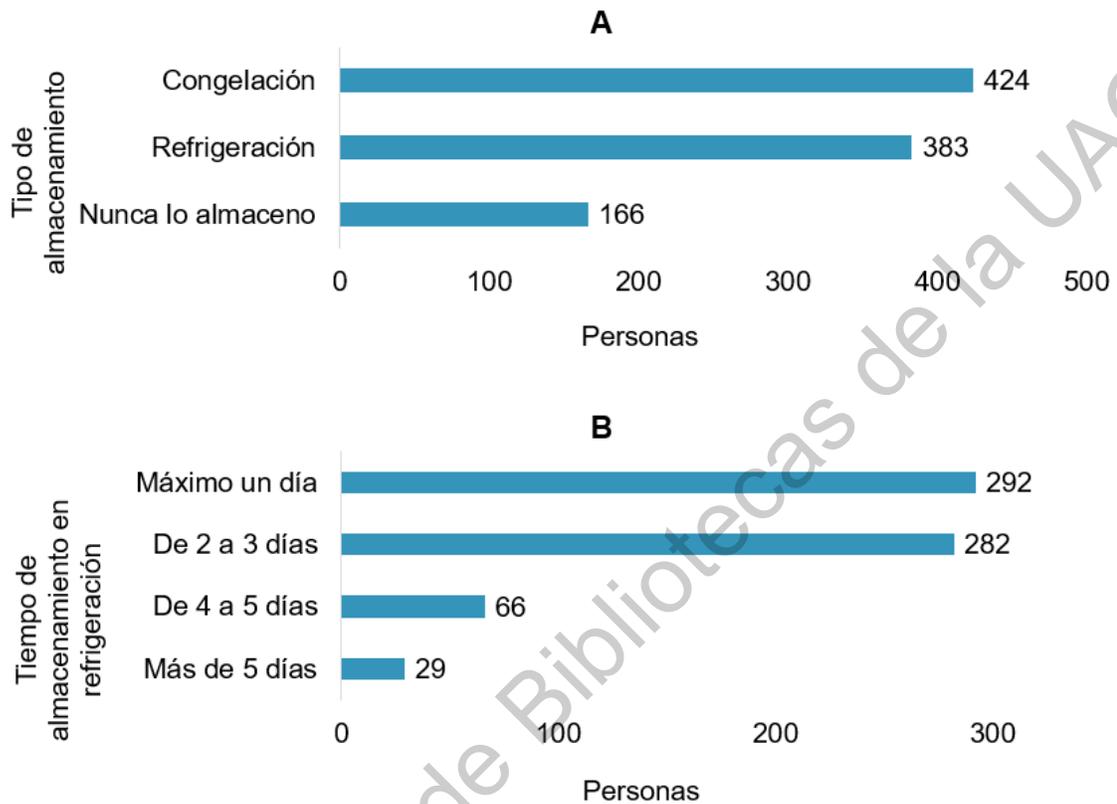


Figura 6. Preferencia de tipo de almacenamiento (A) y tiempo en refrigeración (B) de almacenamiento del pollo crudo en casas de la zona centro de México.

Dado que se esperaba que la refrigeración fuese una de las formas de almacenamiento más común, se les cuestionó sobre el conocimiento de la temperatura de su refrigerador a lo cual únicamente el 28% tiene conocimiento sobre esto y el resto (72%) ignora este dato.

De las personas que tienen conocimiento sobre la temperatura de su refrigerador, la mayoría (66.5%) lo tiene de entre 1 a 5 °C. Mientras que hay quienes manejan la temperatura por arriba de los 11 °C, incluso mayor a los 16 °C (Figura 7).

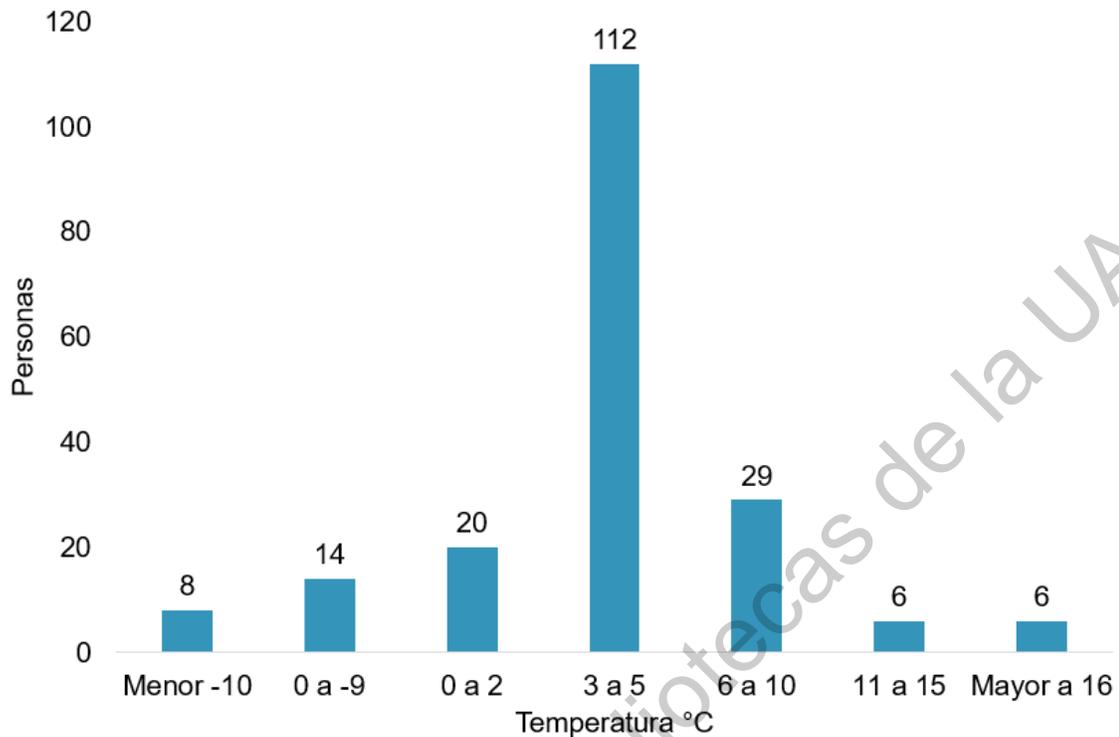


Figura 7. Rangos de temperatura de refrigeradores en casas de la zona centro de México.

La mayoría de las personas tiene su refrigerador regulado a niveles de carga media de alimentos (C Y D), que sería a una temperatura aproximada de entre los 5 y 6 °C, y una minoría lo tiene en alguno de los extremos, ya sea el máximo (E), que sería aproximadamente 1 °C, o el mínimo (A), que sería 8 °C aproximadamente (G.E., 2004) (Figura 8). Es importante mencionar que esta temperatura puede variar de acuerdo con el volumen ocupado del refrigerador, la temperatura inicial de los alimentos almacenados y la capacidad de enfriamiento del refrigerador, esta última puede verse comprometida cuando la cámara de refrigeración está sobrecargada, lo cual contribuye al aumento de la temperatura operativa (James, Evans y James, 2008), y en consecuencia deja un ambiente favorable para el desarrollo de bacterias patógenas y no patógenas.

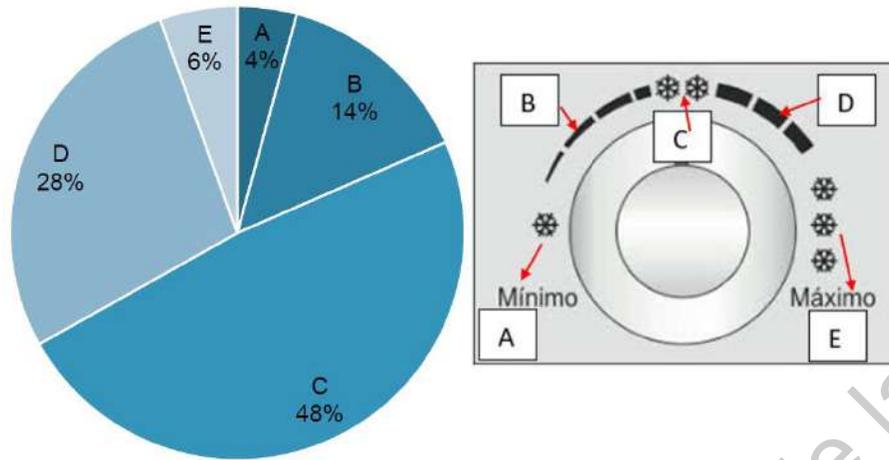


Figura 8. Nivel de potencia de enfriamiento utilizado en casas de la zona centro de México.

La mayoría de las personas que almacenan el pollo crudo, lo hacen en congelación, en la zona A del refrigerador y muy pocos en la parte H. En el caso de la refrigeración, la mayoría lo coloca en la zona B, luego en la parte C, y una minoría lo coloca en la zona D y E, o incluso en las puertas del refrigerador (F y G) (Figura 9).

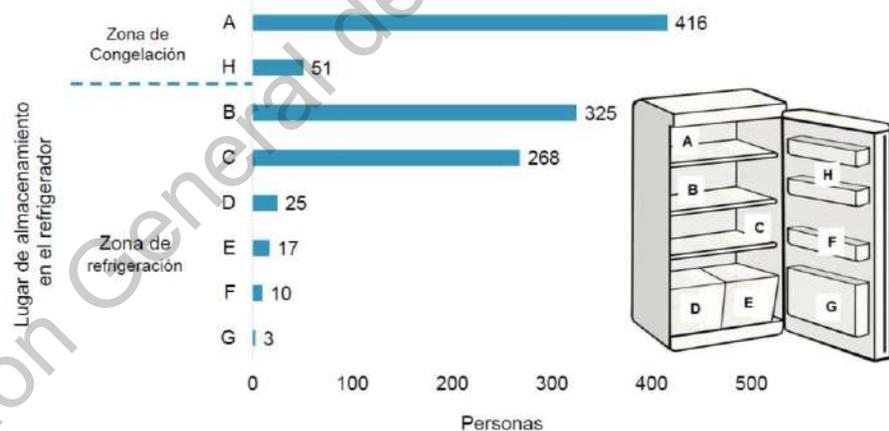


Figura 9. Zonas del refrigerador en donde la población de la zona centro de México almacenan el pollo crudo.

También se preguntó en que material almacenan comúnmente el pollo crudo, a lo que la mayoría (71.9%) contestó que, en bolsa de plástico, seguido de recipiente de plástico (39.6%), luego vidrio (10.3%) y en la categoría "otros" se mencionaron

principalmente a las charolas del supermercado, la cuales están hechas de unícel y aluminio (Figura 10).

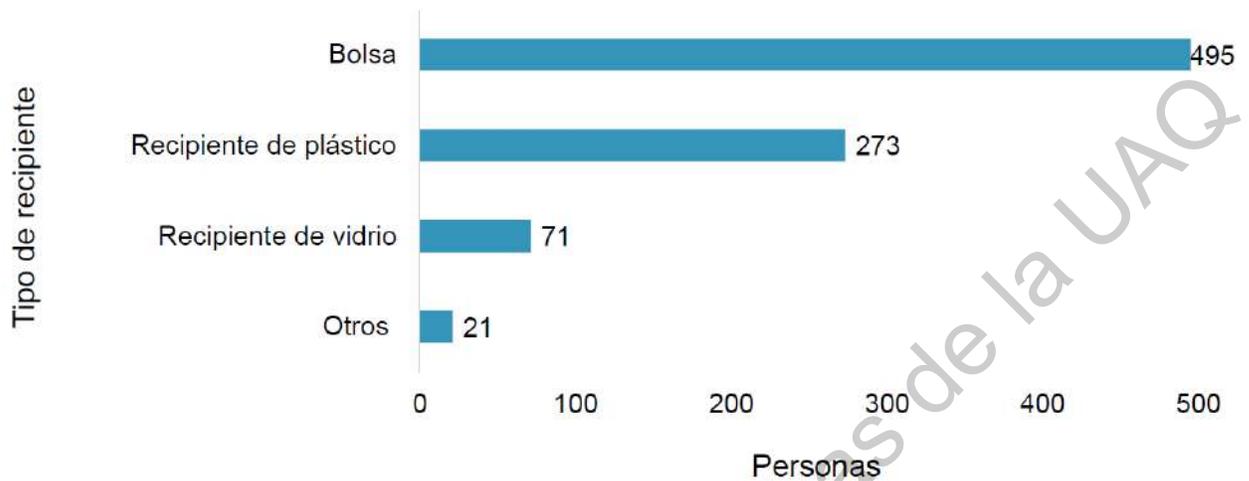


Figura 10. Preferencia del tipo de recipiente para almacenar pollo crudo en las casas de la zona centro de México.

Sobre los hábitos de preparación del pollo en casa se plantearon algunos posibles escenarios de preparación (Figura 11), independientemente de los hábitos de almacenamiento. Los resultados arrojaron que la ruta C, que es aquella donde el pollo tiene la menor manipulación es la que se realiza con mayor frecuencia (31.2%), luego la B (23.14%), en donde se manipula tanto antes como después de ser cocinado, seguido de la A (19.2%), D (16.6%) y E (9.78%). Es importante mencionar que las personas no siempre emplean la misma ruta, ya que algunos emplean más de una.

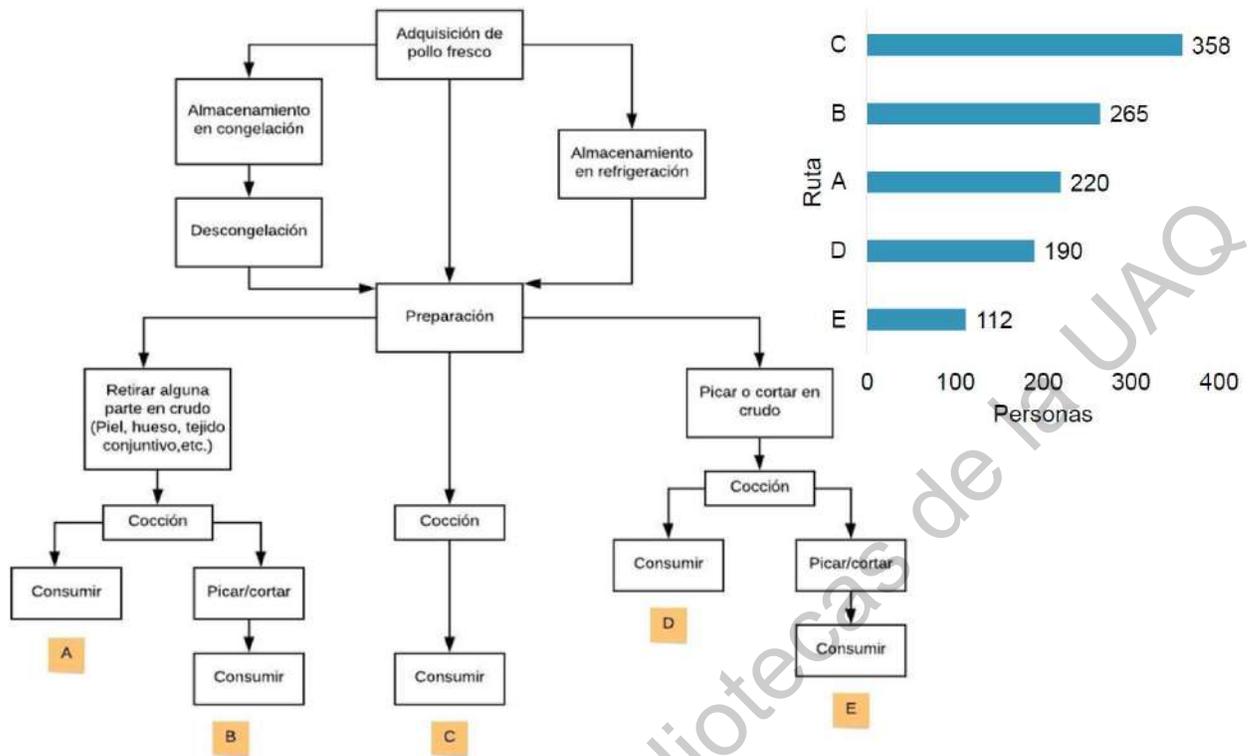


Figura 11. Rutas empeladas para la preparación de pollo en casas en el centro de México.

Igualmente se cuestionó sobre el material y uso de las tablas de picar, en caso de que se tenga que reducir el tamaño del pollo crudo, así como sobre el material y uso de los recipientes empelados para su preparación (contener, marinar). En el caso de las tablas para picar los materiales más empleados resultaron ser el plástico (47.1%), seguido de la madera (45.2%), el vidrio (5.2%) y acero inoxidable (1%). Dentro de la categoría “otros” mencionaron materiales como el granito, el bambú y cerámica. De igual forma se les pregunto cómo empleaban las tablas, si de manera indistinta o si las clasificaban de acuerdo con el alimento que procesan, el 49% respondió que las usan de manera indistinta, 21 % solo cuenta con una tabla y el 30 % si la clasifica según el tipo de alimento (Figura 12). Las personas que clasifican sus tablas, la mayoría lo hace por alimento, es decir dependiendo el tipo de alimento usan tablas diferentes (frutas, verduras, carne cruda), otras las clasifican por material, es decir, dependiendo el material de la tabla la usan para ciertos alimentos, y una minoría de los encuestados las clasifican por color, es decir verde para frutas

y verduras, blanca para lácteos, amarilla para aves crudas, roja para carnes rojas, azul para pescados y mariscos, y café para carne y alimentos cocinados.

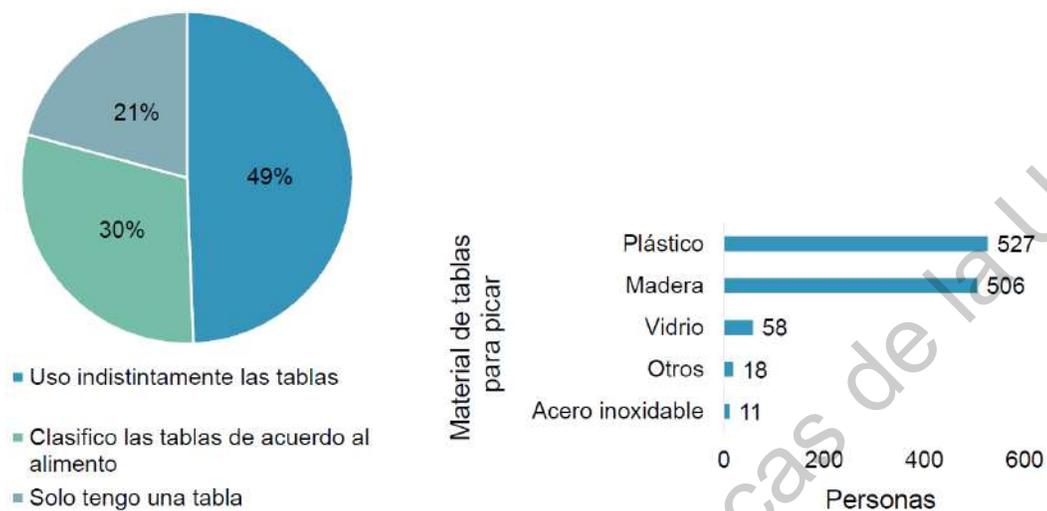


Figura 12. Uso y tipo de material empleados para las tablas de picar en casas de la zona centro de México.

En cuanto a la preparación del pollo crudo antes de cocinarlo, la mayoría respondió que emplean recipientes de plástico (39.7%) y vidrio (21%), luego de madera (17.13%), cerámica (12.9%), acero inoxidable (7.9%) y otros (1.3%), entre los que se encuentra marmol, granito y bambú (Figura 13).

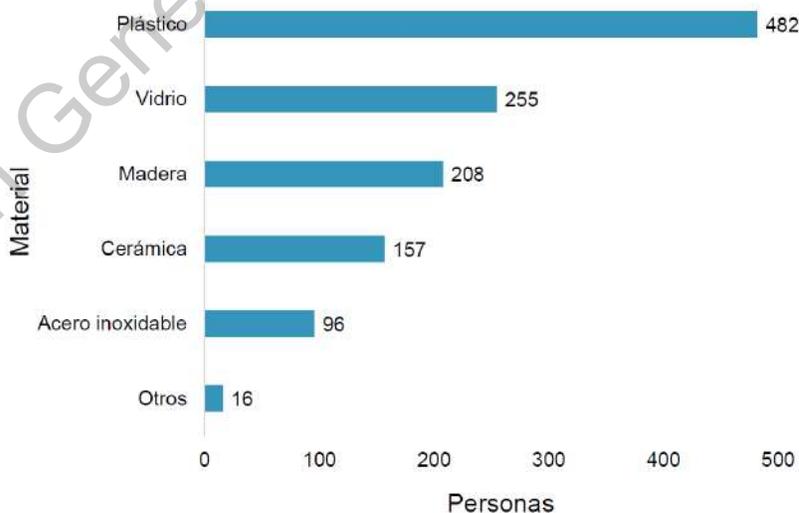


Figura 13. Tipo de recipientes empleados para la preparación de pollo crudo en casas de la zona centro de México.

En relación a la reducción del tamaño del pollo crudo, se preguntó que instrumentos emplean (cuchillo, las manos o ambas), a lo que la mayoría de los encuestados respondió que emplean chuchillo, seguido de ambos (cuchillo y manos) y muy pocos emplean unicamente las manos. También hay quienes usan otros instrumentos como tijeras y también quienes no lo pican (Figura 14).

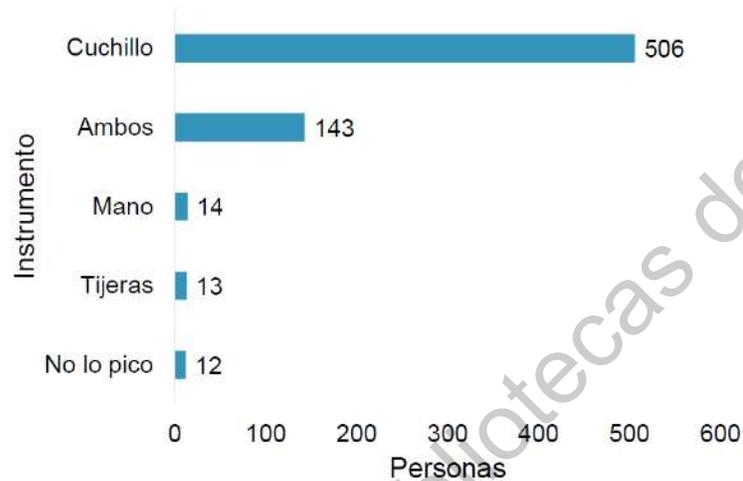


Figura 14. Instrumentos empleados para la reducción de tamaño de pollo crudo en casas en el centro de México.

Con la finalidad de saber la posibilidad de que en casa se creen escenarios de contaminación cruzada, se les cuestionó que tan frecuentemente usan la superficie donde se colocó el pollo crudo, para colocar el pollo ya cocinado, independientemente de que esta superficie se lave o enjuague entre cada acción. A lo que la mayoría (47.7%) respondió que nunca lo hacen, algunas personas lo hace "Rara vez", sin embargo, el 3% de las personas lo hacen siempre (Figura 15).



Figura 15. Uso de la misma superficie durante la manipulación de pollo crudo y pollo cocido en casas de la zona centro de México.

Para las personas que emplean los mismos instrumentos con el pollo crudo y cocido, se les cuestionó sobre las que acciones que toman. En el caso de las tablas para picar (Figura 16), la mayoría que emplea la misma, la lava con agua y jabón (46%), algunos solamente la enjuagan (7.12%), y una minoría la usa directamente (2.3%).

Por otra parte se les pregunto sobre el manejo de otras superficies o recipientes cuando primero las usan para pollo crudo y posteriormente para picar frutas y/o vegetales (Figura 17). El 39.2% no usan las mismas superficies, de quienes si lo hacen la mayoría de las personas que respondieron que las lava con agua y jabón(45.7%), mientras que otras personas únicamente las enjuagan con agua (11.7%) y una minoría no hace nada; algunas personas en la clasificación "otra" mencionaron que las desinfectan con cloro antes de utilizarlas nuevamente. Finalmente, en el caso del uso del cuchillo (Figura 17), la mayoría de las personas opta por emplear uno completamente limpio (49.4%), mientras que otras lo lavan con agua y jabón (41.3%), algunas únicamente lo enjuagan con agua (7.3%); sin embargo, también hay personas que usan el mismo cuchillo para partir pollo crudo y cocido sin lavar o enjuagar (2%).



Figura 16. Acciones que se toman luego del uso de superficies con pollo crudo, antes de emplearlos con pollo cocido en casas de la zona centro de México.

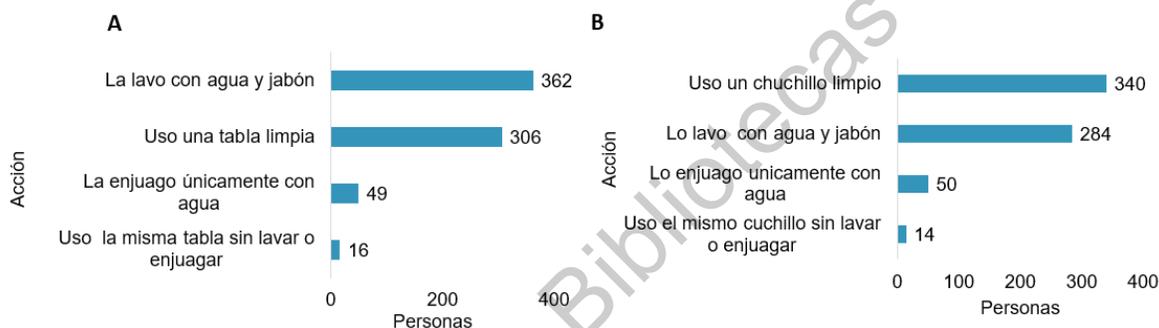


Figura 17. Acciones que se toman luego del uso de tablas o recipientes (A) y cuchillos (B) con pollo crudo, antes de emplearlos para picar frutas y/o verduras en casas de la zona centro de México.

Sobre la manipulación del pollo después de su cocción se cuestionó sobre el almacenamiento, la mayoría de las personas señalaron que lo almacenan máximo dos días (44.7%), seguido de entre tres y cuatro días (10.4%), y una minoría lo llega a almacenar más de cinco días (1.1%). A las personas que almacenan el pollo se les preguntó sobre las condiciones del almacenamiento a lo que la mayoría respondió que lo hacen en refrigeración (93.4%), algunos en congelación (4.1%) y una minoría lo deja a temperatura ambiente (2.4%) (Figura 18).

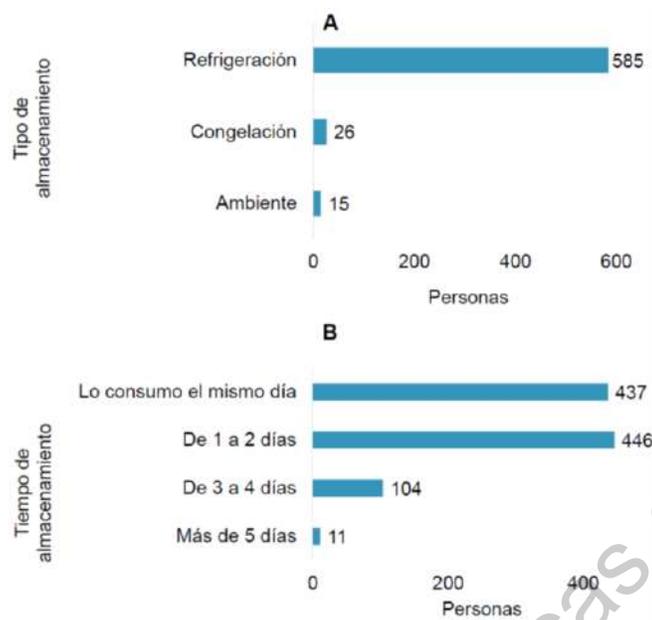


Figura 18. Preferencia de tipo (A) y tiempo de almacenamiento (B) del pollo cocido en casas de la zona centro de México.

Al igual que para el pollo crudo se cuestionó sobre el tipo de material en el cual se almacena el pollo cocido, a lo que la mayoría respondió que utiliza plástico (58.4%), luego vidrio (30.6%) y una minoría emplea cerámica (5.6%) y “otros” dentro de lo que se encuentran ollas de acero inoxidable o peltre donde se preparó el pollo (Figura 19).

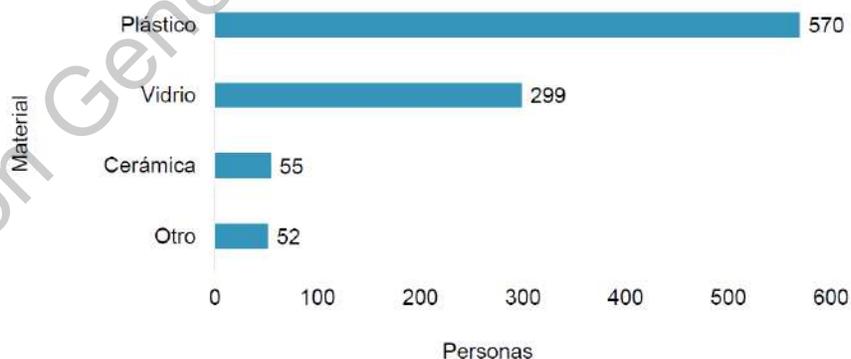


Figura 19. Tipo de recipientes empleados para el almacenamiento de pollo cocido en casa de la zona centro de México.

5.2 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica*.

La evaluación de la FB de las cepas de *S. entérica* se realizó en extractos estériles (EE) y extractos no estériles (ENE) (en presencia de MN) de pechuga cocida (PCO), pechuga cruda (PCR) y piel (P) de pollo, a 25 °C durante 3 días, y a 14 y 9 °C durante 15 días, empleado como control (medio óptimo) CST. En la Figura 20 (EE) y Figura 21 (ENE) se muestra la FB de cepas de *S. enterica* en los diferentes extractos incubados a 25 °C. Independientemente del extracto, la FB fue mayor en los ENE, es, es decir, con presencia de MN.

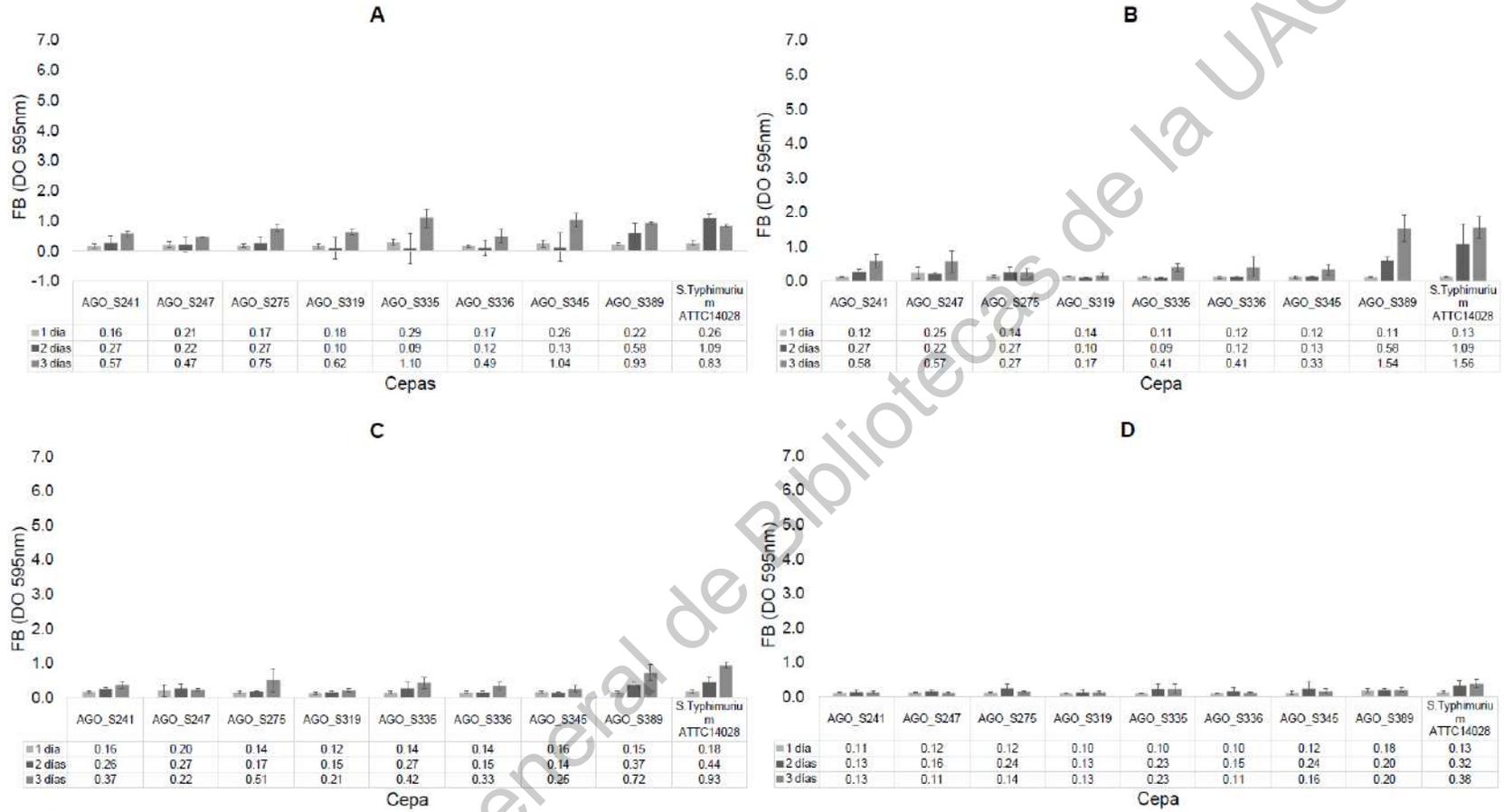


Figura 20. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE de pollo almacenados a 25 °C. A=CST, B= EEPCO, C= EEPCR, D= EEP

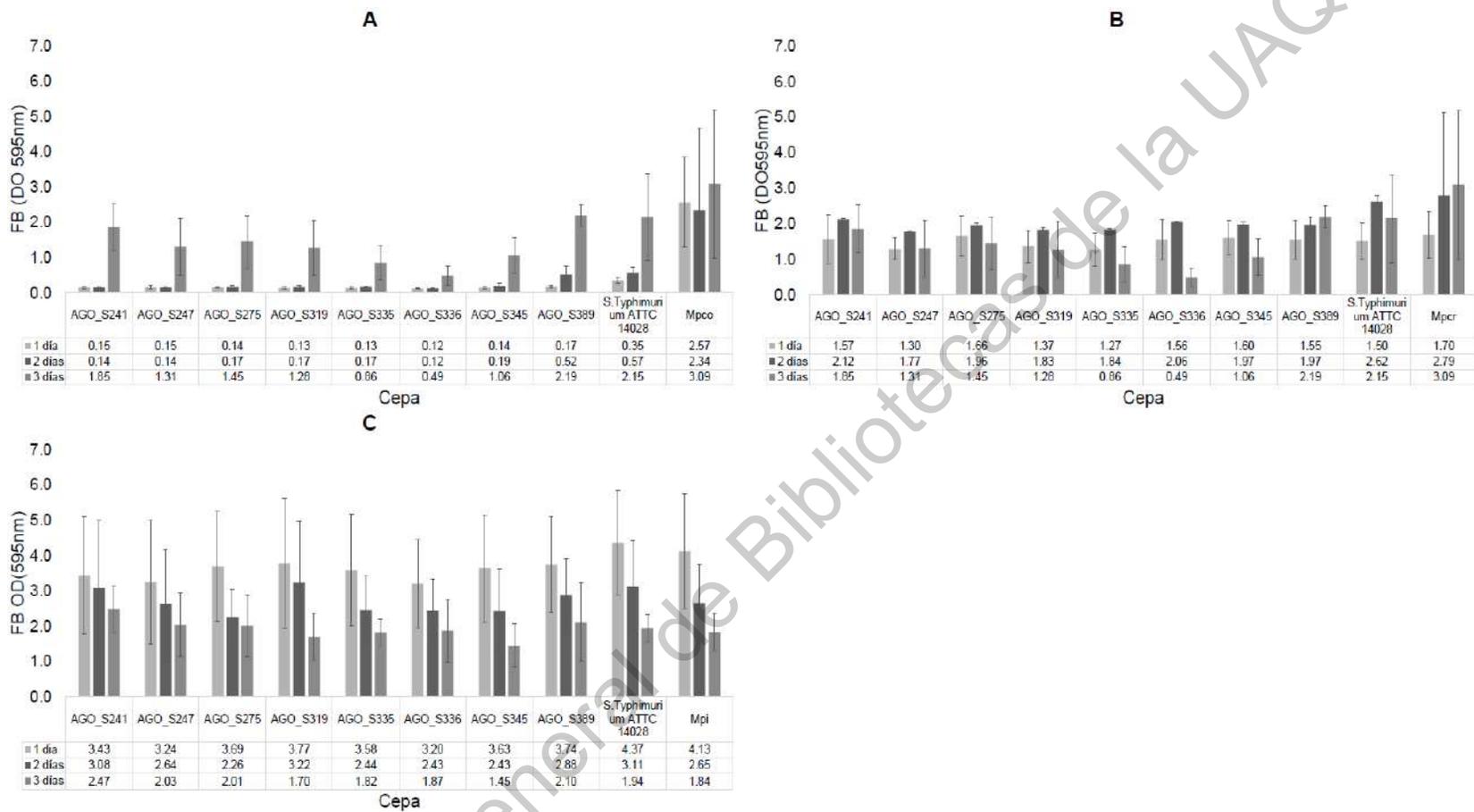


Figura 21. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE de pollo almacenados a 25 °C durante tres días. A= ENEPCO, B= ENEPCR, C= ENEP.

De la Figura 22 a la Figura 25 se muestran la FB de *S. enterica* en los diferentes extractos incubados a 14 y 9 °C durante 15 días, encontrando que al igual que a 25 °C la FB es mayor en los extractos con presencia de MN. En la Figura 22 se puede observar que la FB de las distintas cepas es muy variable en los EE. La variabilidad de la formación de biopolímeros entre las cepas es más evidente en CST (control) y el extracto de EEPCR. En el caso del EEPCO se observa la mayor FB a los 5 días. En el EEP se observó de manera general la menor FB. Para los ENE incubados a 14 °C (Figura 23), se puede observar, de forma general que la mayor FB ocurre en el día 5 y ésta disminuye conforme transcurre el tiempo, a excepción de la cepa AGO\_336 que en el EPC muestra una mayor FB a los 10 días.

Por otro lado, a 9 °C también se puede observar una variabilidad en el comportamiento de las cepas en CST (control). En la Figura 24, se observa que en EEPCO y EEP todas las cepas muestran la menor FB a los 5 días, luego hay un incremento, teniendo a los 10 días la mayor FB y posteriormente hay una disminución de esta a los 15 días. En el EEPCR, se observó la misma tendencia, con excepción de la cepa AGO\_S247, la cual incrementó la FB conforme los días. En los ENE, particularmente ENEPCR y ENEP en todas las cepas se observó la misma tendencia de aumento de la FB conforme transcurrieron los días de almacenamiento (Figura 25). Mientras que, ENEPCO, a los 10 días hubo una mayor FB para la mayoría de las cepas, excepto para la cepa AGO\_241 donde a los 10 días tiene la menor FB.

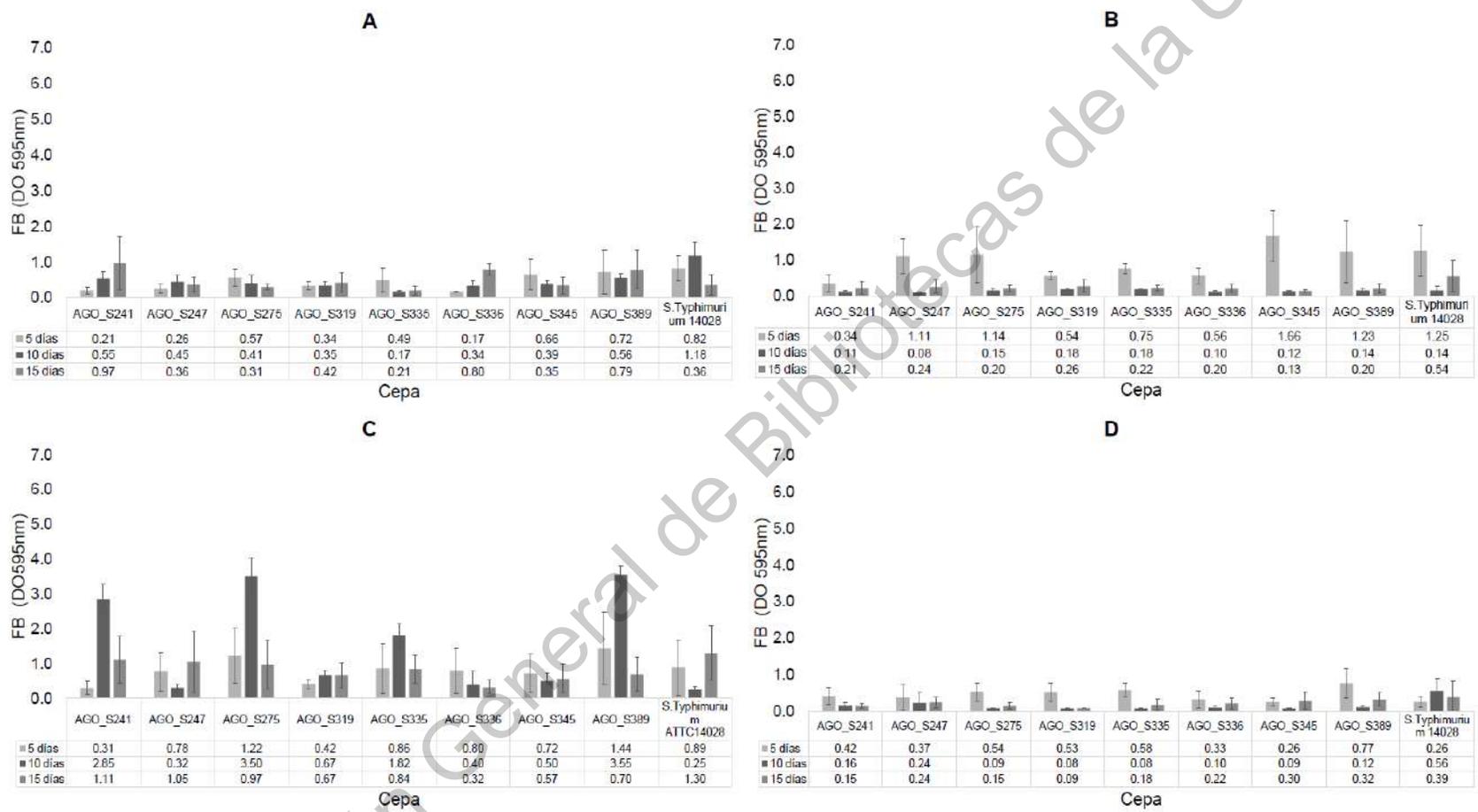


Figura 22. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE de pollo almacenados a 14 °C durante quince días. A=CST, B= EEPCO, C= EEPCR, D= EEP.

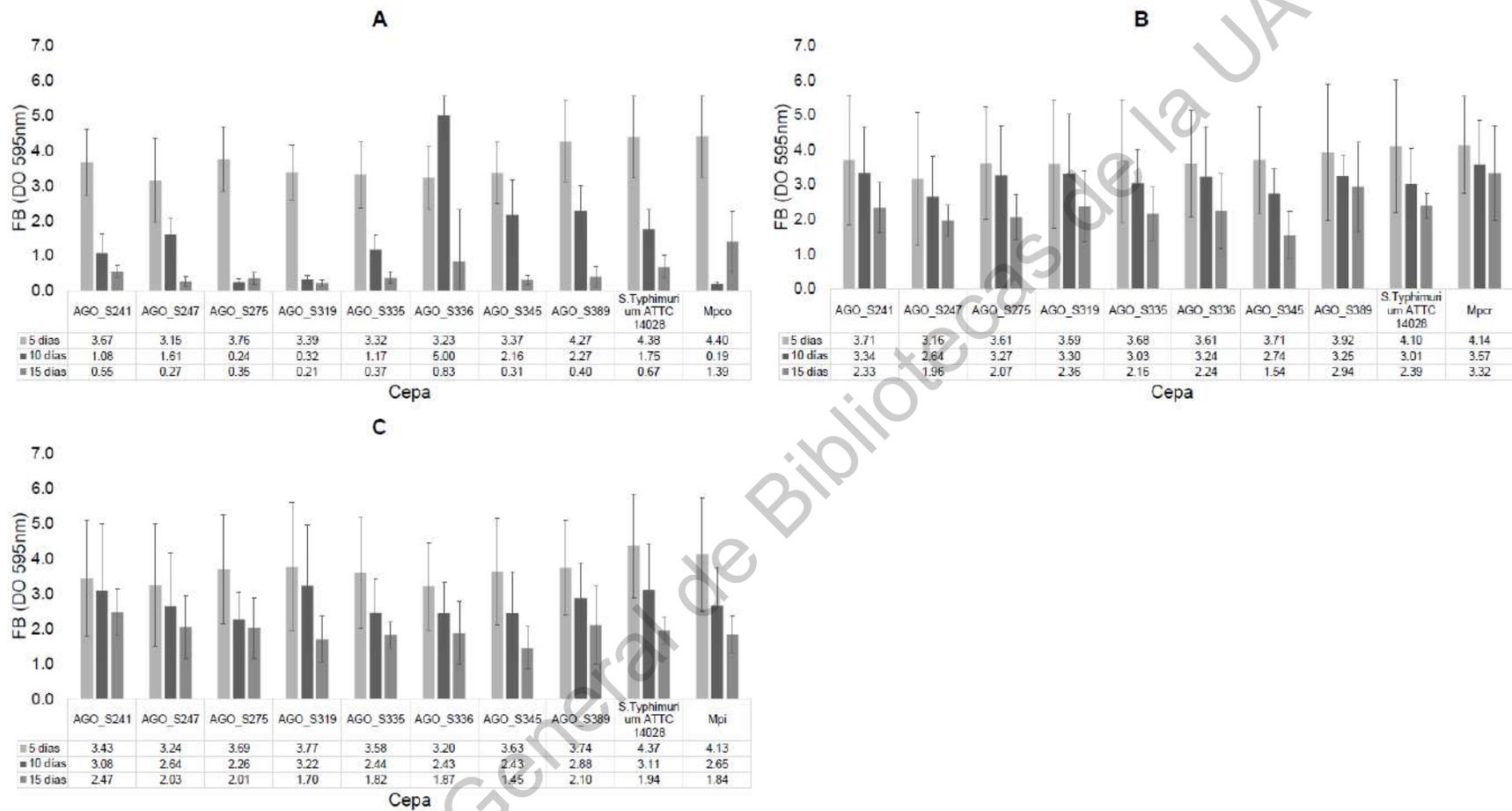


Figura 23. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE de pollo a 14 °C durante quince días. A= ENEPCO, B= ENEPCR, C= ENEP.

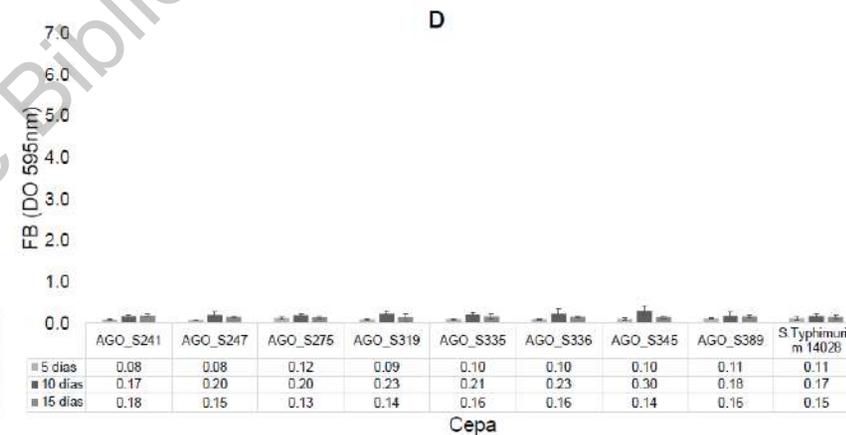
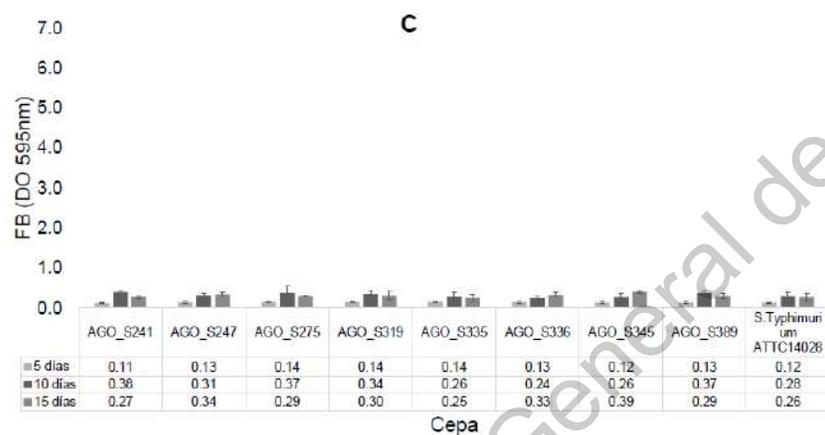
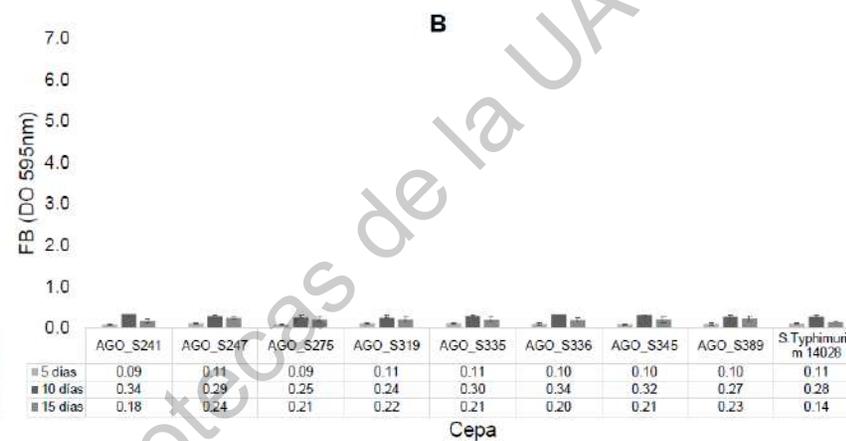
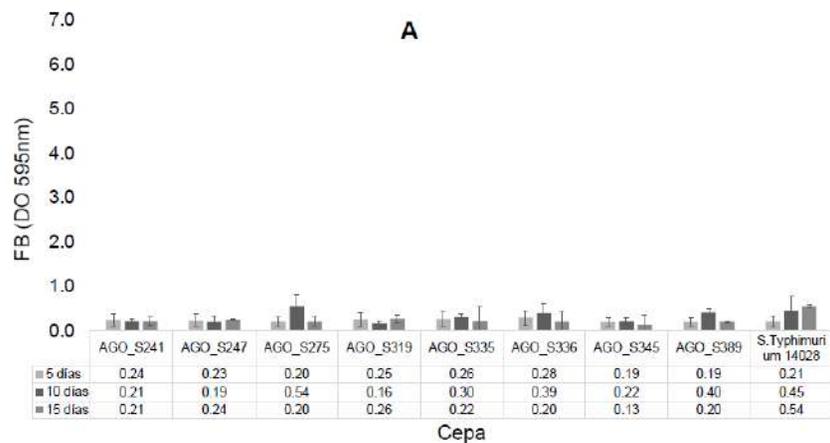


Figura 24. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE de pollo almacenados a 9 °C durante quince días.

A=CST, B= EEP, C= EEP, D= EEP.

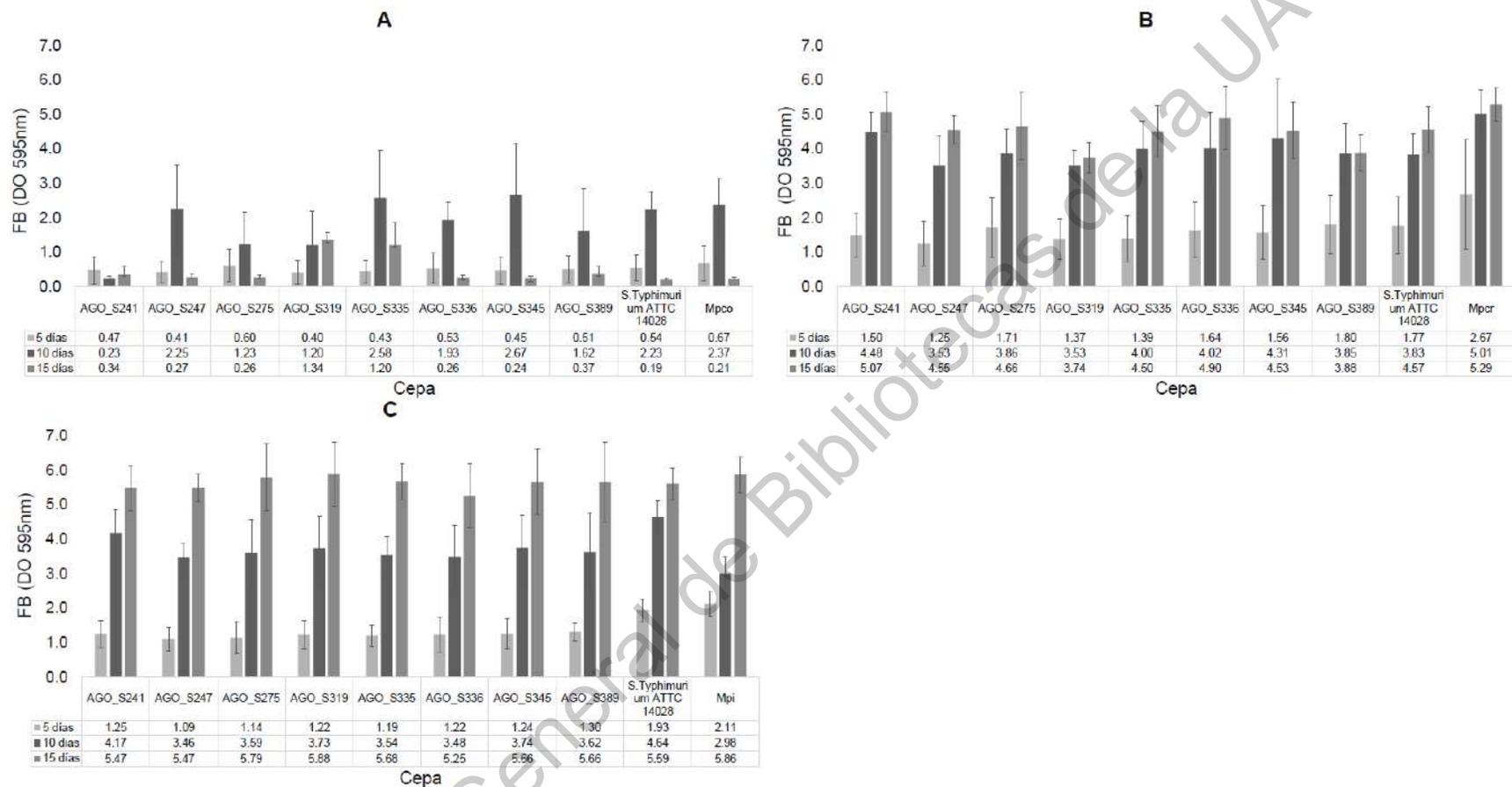


Figura 25. Formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE de pollo almacenados a 9 °C durante quince días. A= ENEPCO, B= ENEPCR, C= ENEP.

En el Cuadro 3 se muestra el análisis de varianza de los factores cepa, tipo de extracto y tiempo de almacenamiento, así como sus interacciones sobre la FB a 25 °C. Los factores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) fueron: cepa, tipo de extracto, días de almacenamiento y la interacción cepas/tipo de extracto, cepa/tiempo y tiempo/tipo de extracto.

Cuadro 3. Análisis de varianza de factores e interacciones que influyen en la formación *in vitro* de biopelículas a 25 °C.

Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
Cepa	8	24.901	14.941	<0.0001*
Tipo de extracto	6	560.149	448.124	<0.0001*
Tiempo	2	87.405	209.774	<0.0001*
Cepa*Tipo de extracto	48	17.985	1.798	0.0007*
Cepa*Tiempo	16	10.030	3.009	<0.0001*
Tiempo*Tipo de extracto	12	42.890	17.156	<0.0001*

Se encontró que no todas las cepas de *S. enterica* tienen la misma capacidad de FB, siendo la cepa de referencia *S. Typhimurium* la mayor formadora en la mayoría de los extractos a 25 °C. En relación al tipo de extracto, como se mencionó anteriormente, en los ENE se observó una mayor FB. En orden decreciente la FB fue: ENEPCR > ENEP > EEPKO > CST > EEPKO > EEPKR > EEP (Anexo II).

En el caso de la interacción entre cepas y tipo de extracto (Figura 26) como se describió anteriormente de manera general la FB fue mayor en ENE a pesar de que las cepas muestran comportamientos distintos dependiendo el extracto en el cual se encuentren, lo que sugiere que ciertas cepas se adaptan mejor a diferentes sustratos. Por ejemplo, la cepa AGO\_S389 y la cepa de referencia tienen una mejor adaptación al EEPKO y ENEP que el resto de las cepas.

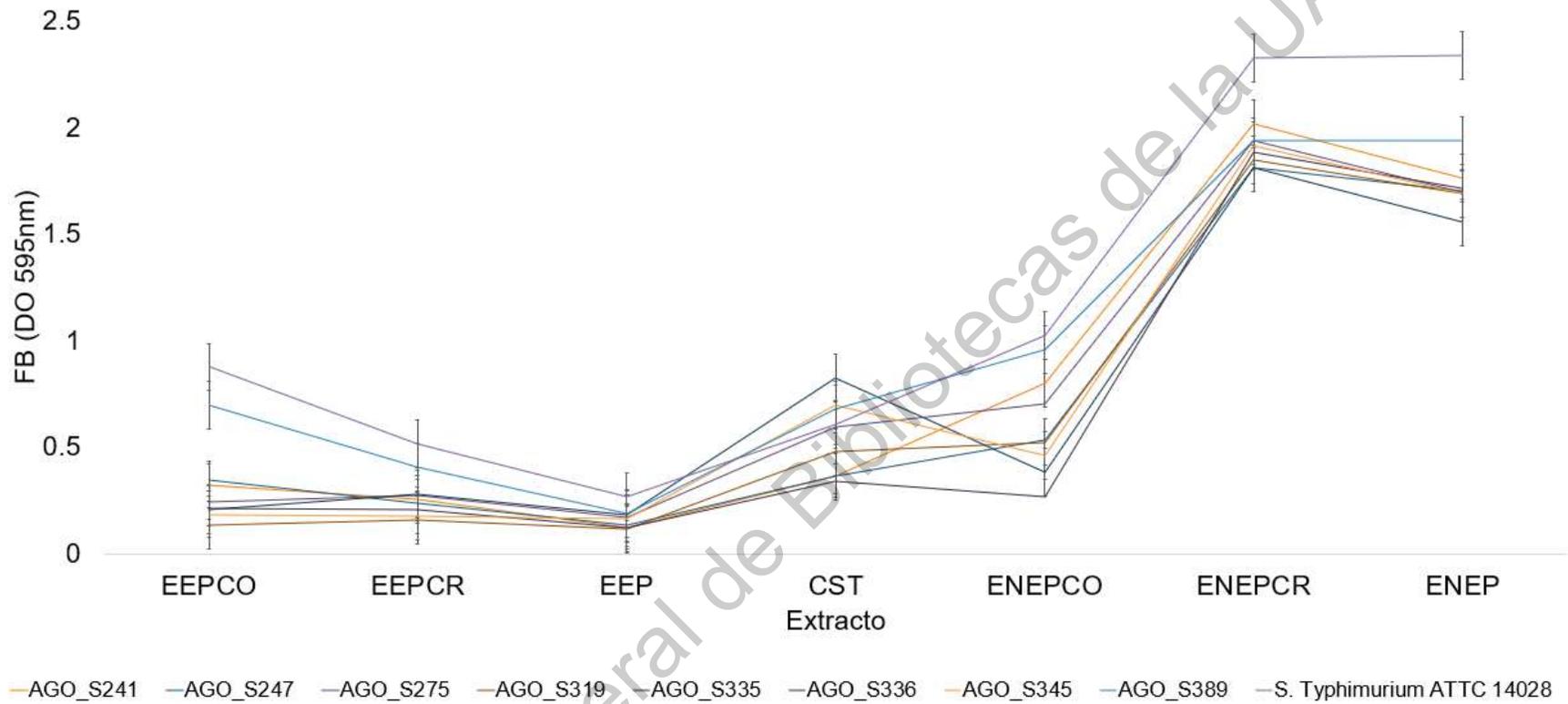


Figura 26. Efecto de la interacción entre las cepas y el tipo de extracto en la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 25 °C.

Respecto a la interacción de tiempo y tipo de extracto (Figura 27) únicamente en el caso del EEP no hay incremento conforme al tiempo de la FB, ya que no hay diferencia entre las 48 h y 72 h. En el caso específico de ENE, a pesar de que se observa un incremento conforme al tiempo, ENEPCR y ENEP muestran una mayor FB comparado con el ENEPCO principalmente en las primeras 48 h, esto se puede atribuir a la cantidad de MN inicial que se encuentra presente en cada extracto (Cuadro 4).

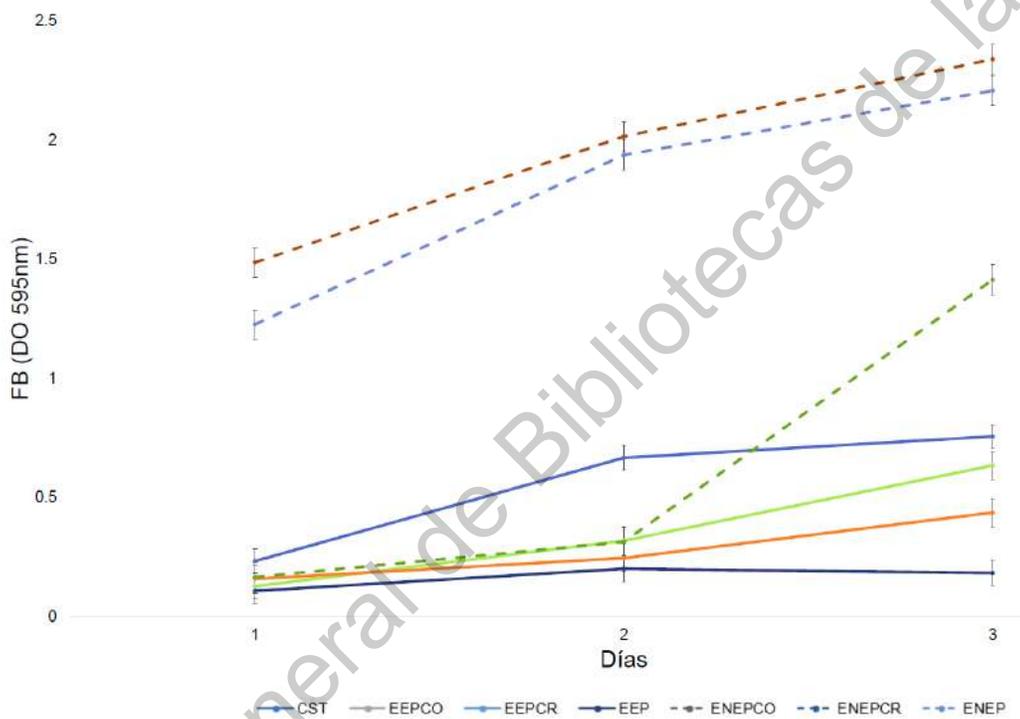


Figura 27. Efecto de la interacción entre el tiempo de almacenamiento y tipo de extracto en la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 25 °C.

Cuadro 4. Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos de pollo almacenado a 25 °C.

Días	Extracto	Log UFC/mL		
		Bacterias mesófilas aerobias	Coliformes totales	Psicrótrofos
0	ENEPCO	2.16 ± 2.14	1.30 ± 1.64	0.99 ± 1.6
	ENEPCR	4.73 ± 0.61	3.33 ± 1.27	4.84 ± 0.99
	ENEP	4.27 ± 2.26	3.67 ± 1.97	5.43 ± 2.19
1	ENEPCO	7.41 ± 1.27	5.55 ± 2.95	8.21 ± 0.33
	ENEPCR	8.55 ± 0.74	7.73 ± 1.41	8.61 ± 0.50
	ENEP	7.33 ± 1.36	6.82 ± 1.10	8.7 ± 0.45
2	ENEPCO	7.06 ± 1.54	4.61 ± 3.12	8.10 ± 0.60
	ENEPCR	8.30 ± 0.99	7.66 ± 0.72	8.79 ± 0.61
	ENEP	8.1 ± 0.68	7.56 ± 0.76	8.54 ± 0.63
3	ENEPCO	9.32 ± 1.63	5.50 ± 3.40	8.40 ± 1.63
	ENEPCR	9.25 ± 0.60	8.40 ± 0.60	9.11 ± 0.28
	ENEP	8.57 ± 0.76	7.60 ± 0.11	8.98 ± 0.27

En los Cuadro 5 y 6 se muestra el análisis de varianza de los factores cepa, tipo de extracto y tiempo de almacenamiento, así como sus interacciones sobre la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 9 y 14 °C sobre la FB. Los factores que fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) a 14 °C fueron: cepa, extracto, días y la interacción cepas/tipo de extracto y tiempo/tipo de extracto. A 9 °C los mismos factores e interacciones fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) con excepción de la cepa.

Cuadro 5. Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 14 °C.

Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
Cepa	8	34.188	6.291	<0.0001*
Tipo de extracto	6	1213.072	297.628	<0.0001*
Tiempo	2	190.336	140.098	<0.0001*
Cepa*Tipo de extracto	48	51.215	1.570	0.008*
Cepa*Tiempo	16	13.661	1.256	0.218
Tiempo*Extracto	12	257.98	31.648	<0.0001*

Cuadro 6. Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 9 °C

Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
Cepa	8	34.188	6.291	0.122
Tipo de extracto	6	1213.072	297.628	<0.0001*
Tiempo	2	190.336	140.098	<0.0001*
Cepa*Tipo de extracto	48	51.215	1.570	<0.0001*
Cepa*Tiempo	16	13.661	1.256	0.165
Tiempo*Tipo de extracto	12	257.98	31.648	<0.0001*

A 14 °C el factor cepa es estadísticamente significativo, mientras que a 9 °C no, esto puede deberse a que a 9 °C las cepas de *S. enterica* prácticamente no tienen una FB en ausencia de MN.

En el caso de la interacción entre cepas y tipo extracto (Figura 28) en ambas condiciones (9 y 14 °C) en los EE es en donde las cepas mostraron una mayor variabilidad en la FB, siendo más evidente a 14 °C. Estos datos al igual que los obtenidos a 25 °C comprueban que la FB es dependiente de la cepa, sustrato y en el caso de los ENE de la cantidad de MN inicial (Cuadro 6 y 7)

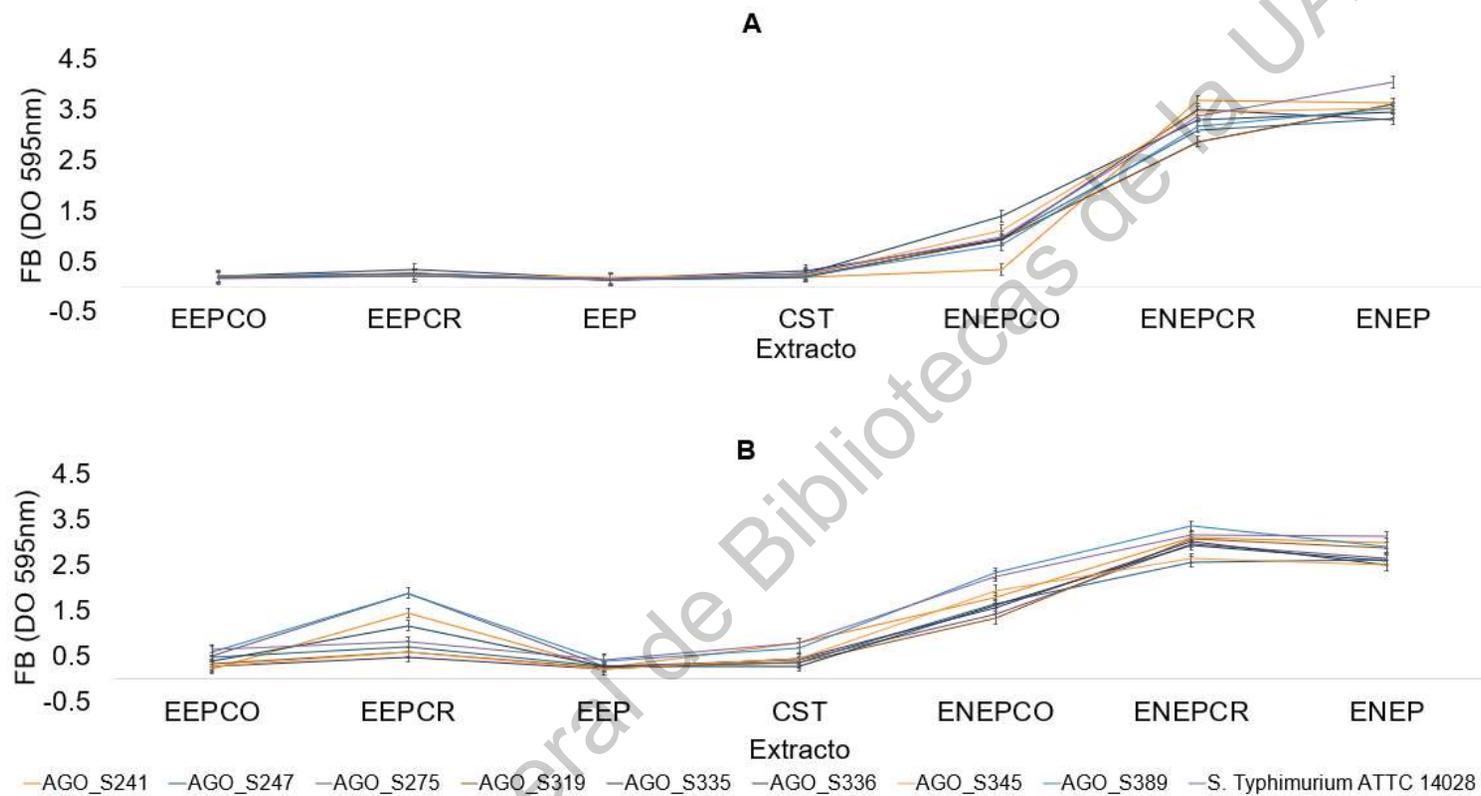


Figura 28. Efecto de la interacción entre las cepas y extracto en la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 9 y 14 °C. A= 9 °C, B= 14 °C.

En relación a la interacción de cepas y tiempo de almacenamiento (Figura 29) a 14 °C la tendencia de la mayoría de los extractos fue a disminuir la FB. Sin embargo, cabe la posibilidad que en tiempos menores a los 5 días esta tendencia sea distinta. Mientras que para 9 °C se puede observar que de manera general la FB aumenta conforme al tiempo, con la excepción en CST , ENEPCO y ENEP.

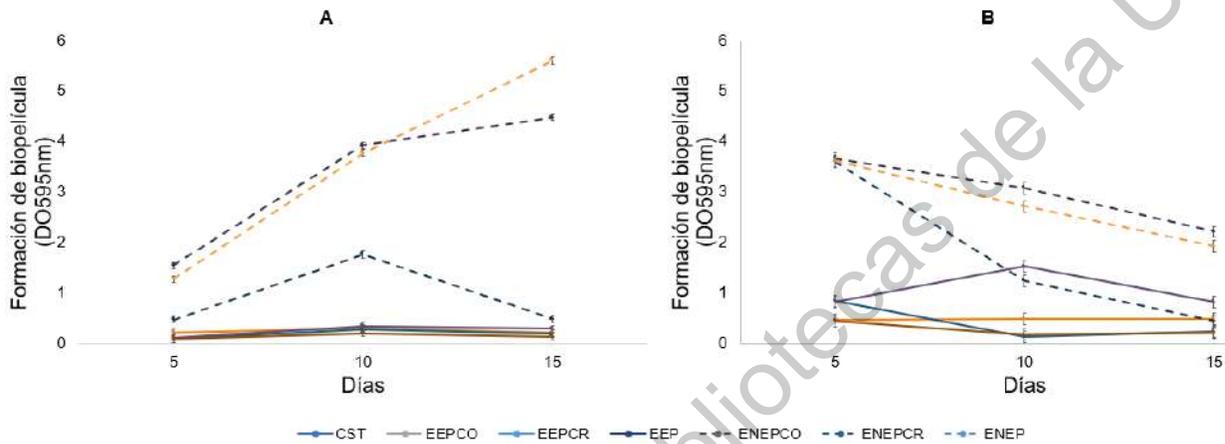


Figura 29. Efecto de la interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tipo de extracto en la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* a 9 °C y 14 °C. A=9 °C y B= 14 °C.

En los Cuadros 7 y 8 se observan los recuentos iniciales y finales para cada una de las temperaturas, respecto a los recuentos iniciales, como era de esperarse hubo una menor concentración de todas las bacterias analizadas en ENEPCO que en ENEP y ENEPCR, lo que se puede asociar con una menor FB en ese extracto, respecto a los recuentos finales, de forma general se observa que las bacterias psicrótrofas son las que tienen un mayor desarrollo.

Cuadro 7. Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos de pollo almacenados a 9 °C.

Días	Extracto	Log UFC/mL		
		Bacterias mesófilas aerobias	Coliformes totales	Psicrótrofos
0	ENEPCO	2.16 ± 2.14	1.30 ± 1.64	0.99 ± 1.6
	ENEPCR	4.73 ± 0.61	3.33 ± 1.27	4.84 ± 0.99
	ENEP	4.27 ± 2.26	3.67 ± 1.97	5.43 ± 2.19
5	ENEPCO	4.77 ± 3.64	3.10 ± 3.58	5.6 ± 3.75
	ENEPCR	7.94 ± 0.86	4.84 ± 4.38	8.85 ± 0.20
	ENEP	8.81 ± 0.86	7.76 ± 1.24	8.09 ± 0.27
10	ENEPCO	6.82 ± 4.7	3.41 ± 4.00	5.45 ± 3.67
	ENEPCR	7.47 ± 2.34	6.95 ± 0.07	8.55 ± 0.35
	ENEP	7.46 ± 1.07	6.25 ± 2.33	8.20 ± 0.28
15	ENEPCO	2.8 ± 3.5	2.80 ± 3.9	4.00 ± 5.6
	ENEPCR	7.21 ± 0.97	6.16 ± 0.95	9.36 ± 0.90
	ENEP	7.16 ± 0.81	6.32 ± 1.17	8.77 ± 0.58

Cuadro 8. Contenido de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y psicrótrofos en extractos de pollo almacenados a 14 °C.

Días	Extracto	Log UFC/mL		
		Bacterias mesófilas aerobias	Coliformes totales	Psicrótrofos
0	ENEPCO	2.16 ± 2.14	1.30 ± 1.64	0.99 ± 1.6
	ENEPCR	4.73 ± 0.61	3.33 ± 1.27	4.84 ± 0.99
	ENEP	4.27 ± 2.26	3.67 ± 1.97	5.43 ± 2.19
5	ENEPCO	5.36 ± 1.95	2.72 ± 3.16	5.54 ± 4.06
	ENEPCR	5.5 ± 1.95	4.49 ± 3.18	8.08 ± 1.86
	ENEP	6.9 ± 0.36	5.82 ± 0.95	4.94 ± 4.2
10	ENEPCO	4.2 ± 4.98	1.95 ± 3.9	6.01 ± 4.09
	ENEPCR	8.74 ± 1.04	8.2 ± 1.68	9.2 ± 0.14
	ENEP	7.61 ± 0.45	7.21 ± 0.48	8.92 ± 0.30
15	ENEPCO	6.49 ± 4.33	5.51 ± 3.79	6.89 ± 4.61
	ENEPCR	9.65 ± 1.30	8.25 ± 0.63	9.10 ± 0.06
	ENEP	9.19 ± 0.92	8.09 ± 0.26	9.38 ± 0.87

Para evaluar si la MN de cada extracto genera sinergismo para incrementar la FB con las diferentes cepas *S. enterica*, se realizó la prueba de Dunnett donde se compara la FB de la MN sola y en presencia de cada cepa del patógeno, encontrándose que a 25 °C en ENEPCO había una disminución en la FB de biopelículas en el primer y segundo día cuando interaccionaba la MN con todas las cepas del patógeno y en el tercero cuando interaccionaba con la mayoría de las cepas con respecto a la FB de la MN sola. En ENEP también se encontró una disminución de la FB en el primer día cuando interacciono con la mayoría de las cepas de *S. enterica* (Anexo IV). A 14 °C, en ENEPCO se encontró también una menor FB cuando interactuaron algunas cepas del patógeno y la MN a los 10 y 15 días, mientras que a 9 °C se observó una diferencia estadísticamente significativa cuando hay una interacción con la mayoría de las cepas. Dichos resultados lo que sugieren es un efecto antagonista entre la MN y algunas cepas de *S. enterica* a ciertas condiciones. A pesar de esto no descarta de que este patógeno puede persistir en esta matriz polimérica durante más tiempo dado que siempre hubo una mayor FB en presencia de la MN que cuando se encontraba el patógeno solo.

Por último, se realizó un análisis de las correlaciones entre la FB y el desarrollo en los diferentes extractos a 25, 14 y 9 °C; a ninguna temperatura se observó correlación (Figura 30 a Figura 35).

Finalmente, se integró toda la información y se clasificó las cepas de *S. enterica* de acuerdo con su FB (nula, débil, moderada o fuerte) según las condiciones en las que se encontraron (Figura 36).

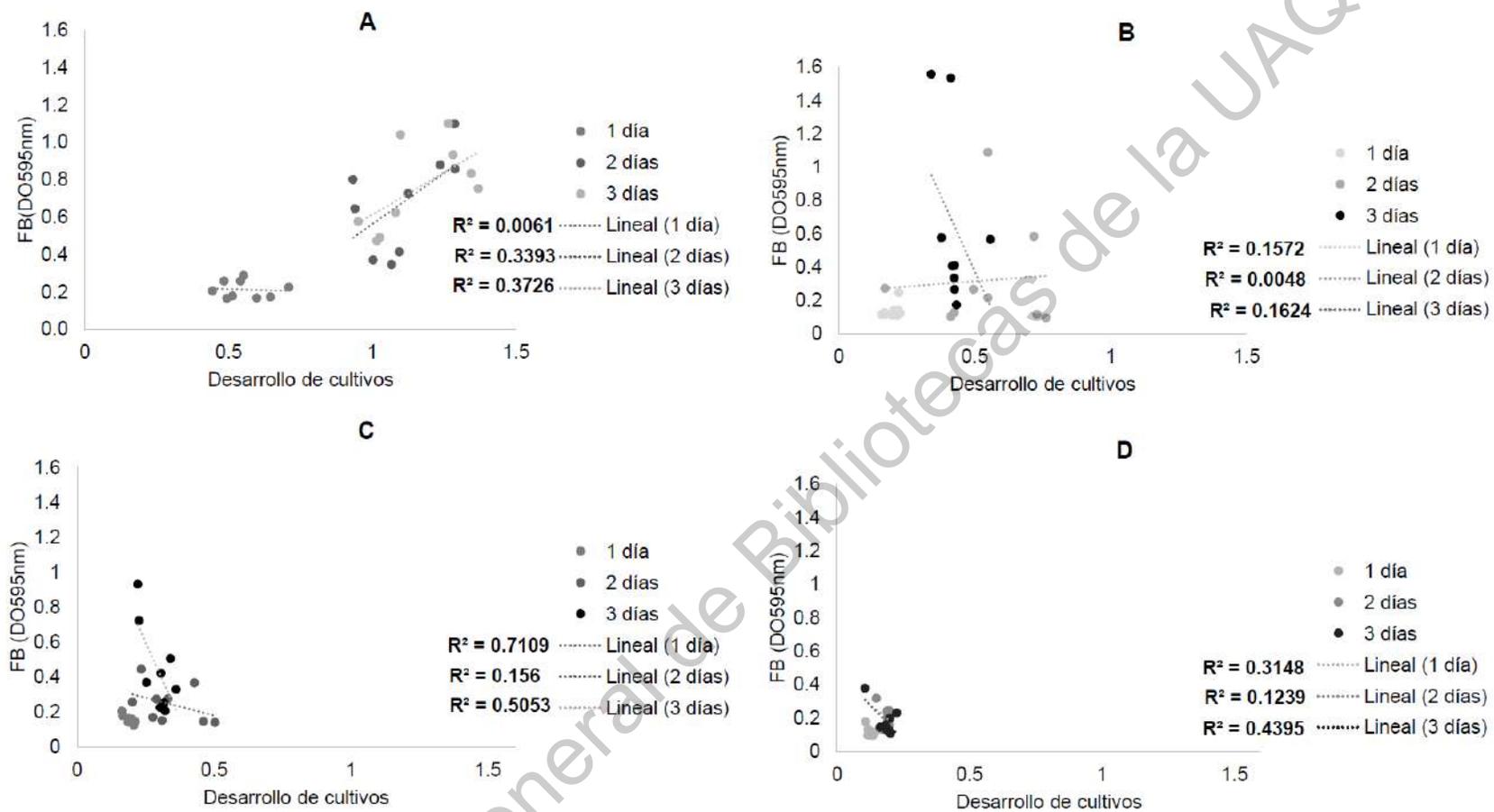


Figura 30. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE pollo a 25 °C. A= EEPCO, B= EEPCR, C= EEP

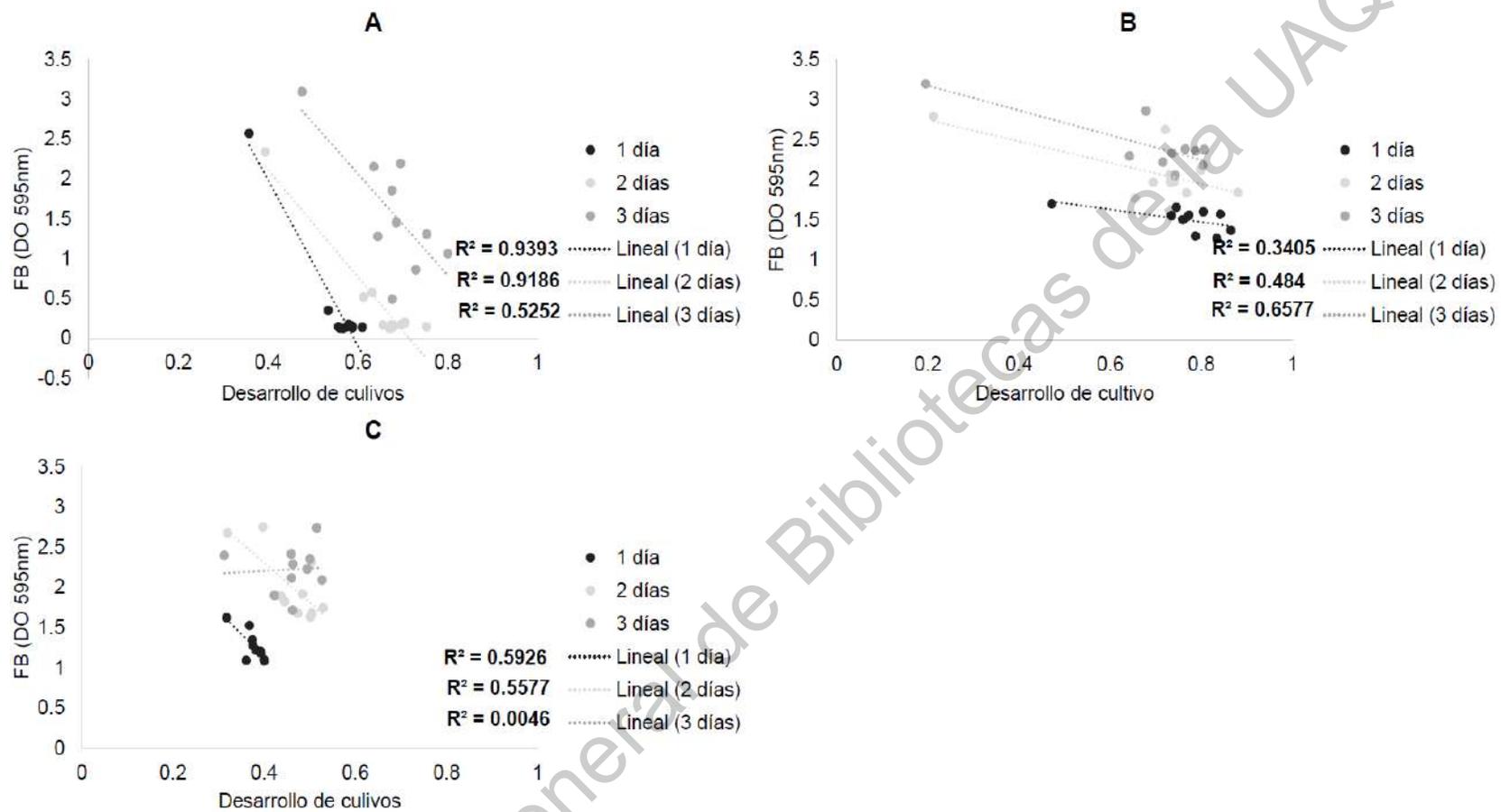


Figura 31. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE pollo a 25 °C. A= ENEPCO, B= ENPCR, C= ENEP.

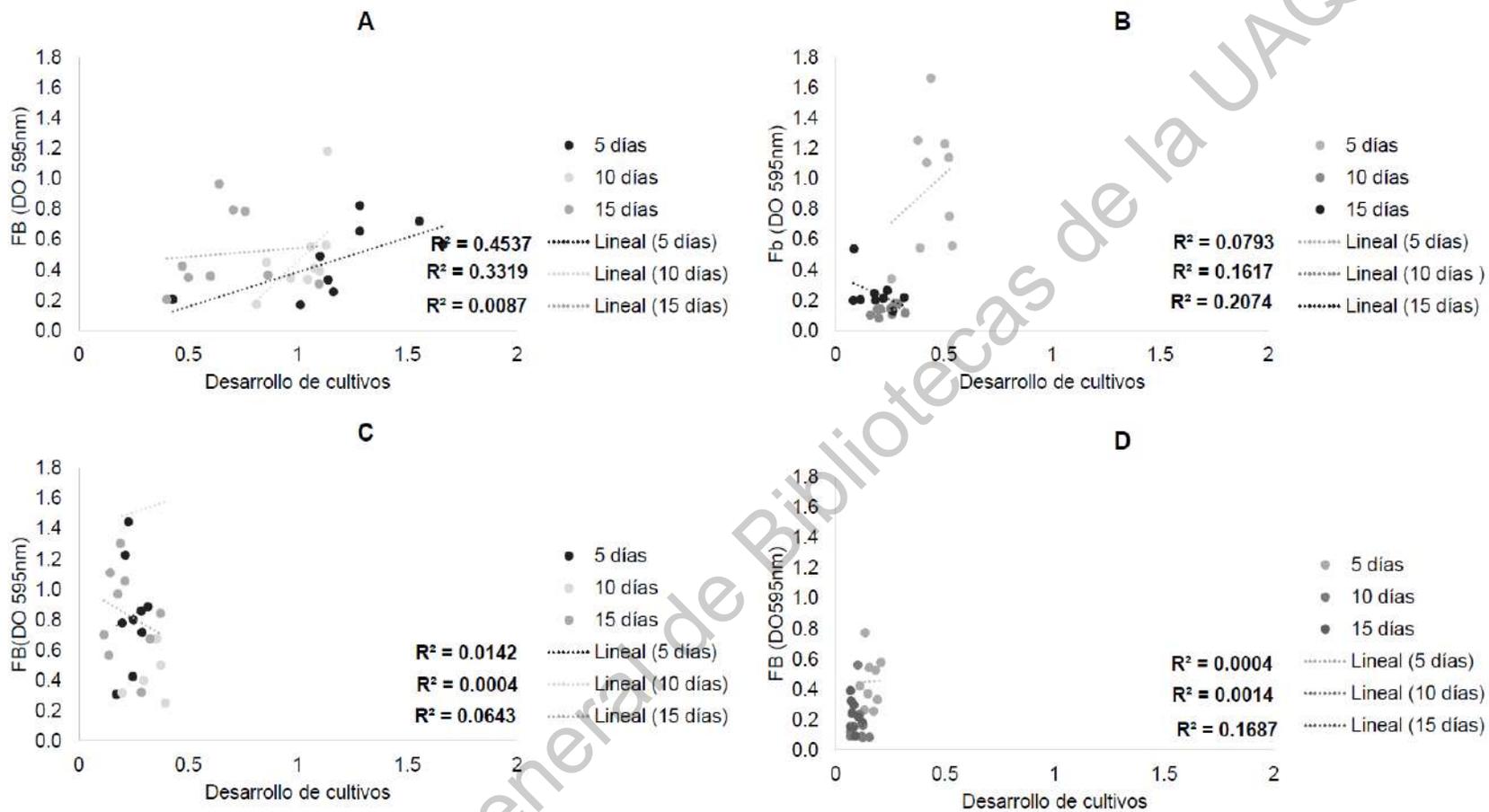


Figura 32. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE pollo a 14 °C. A= CTS, B= EEPKO, C= EEPKR, D= EEP.

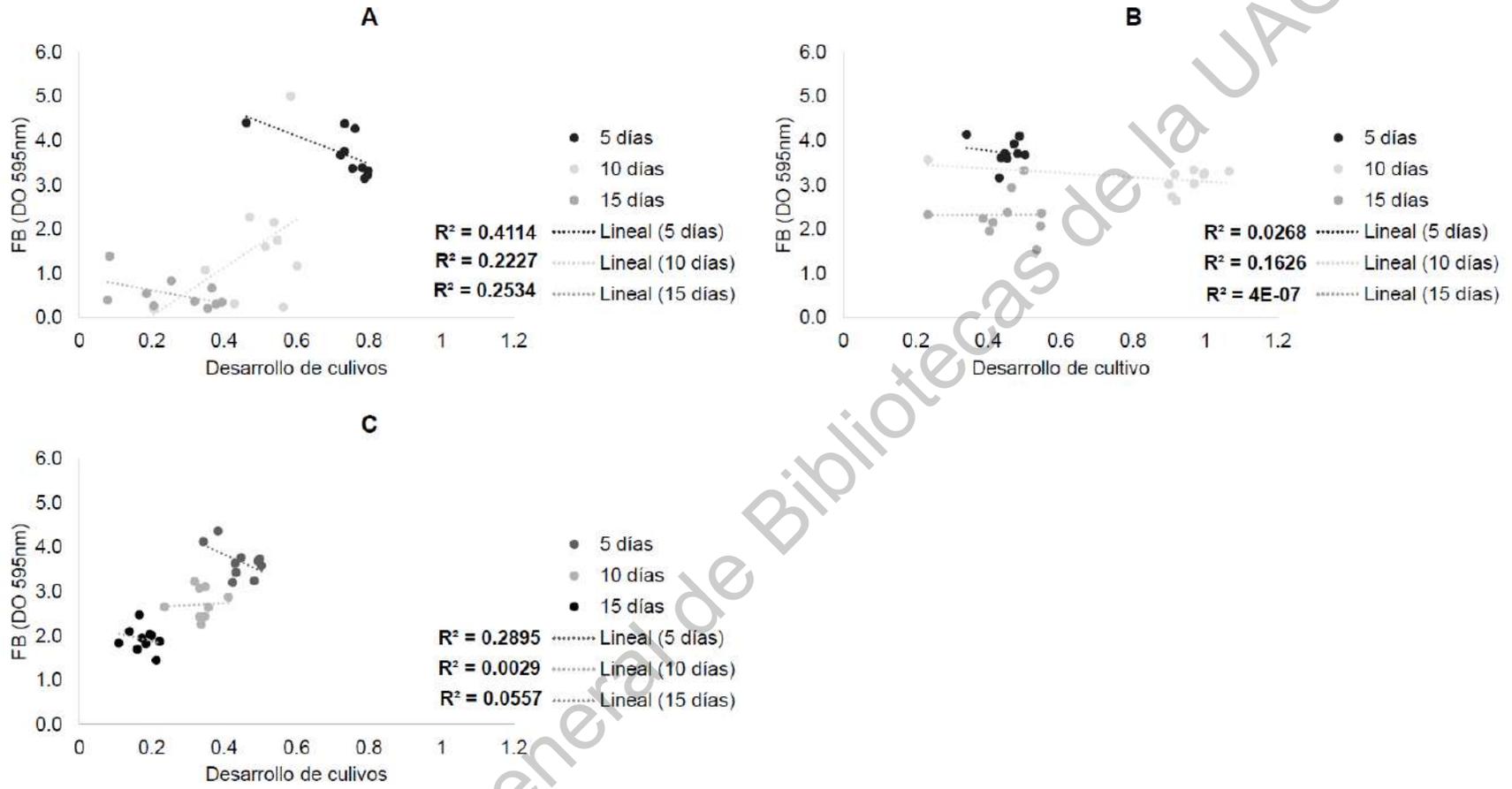


Figura 33. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE pollo a 14 °C. A= ENEPCO, B= ENPCR, C= ENEP.

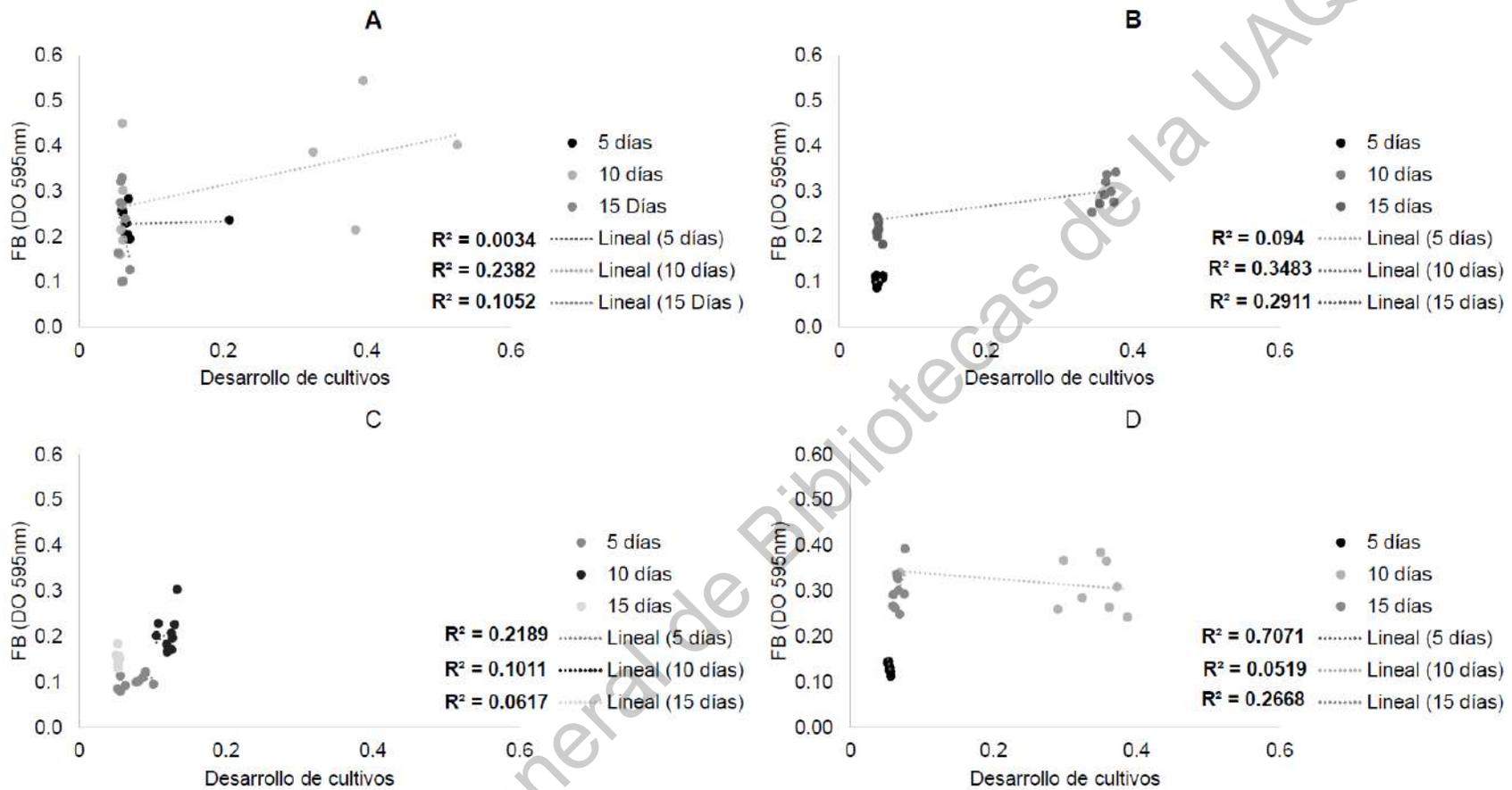


Figura 34. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en EE pollo a 9 °C. A= CTS, B= EEPCO, C= EEPCR, D= EEP.

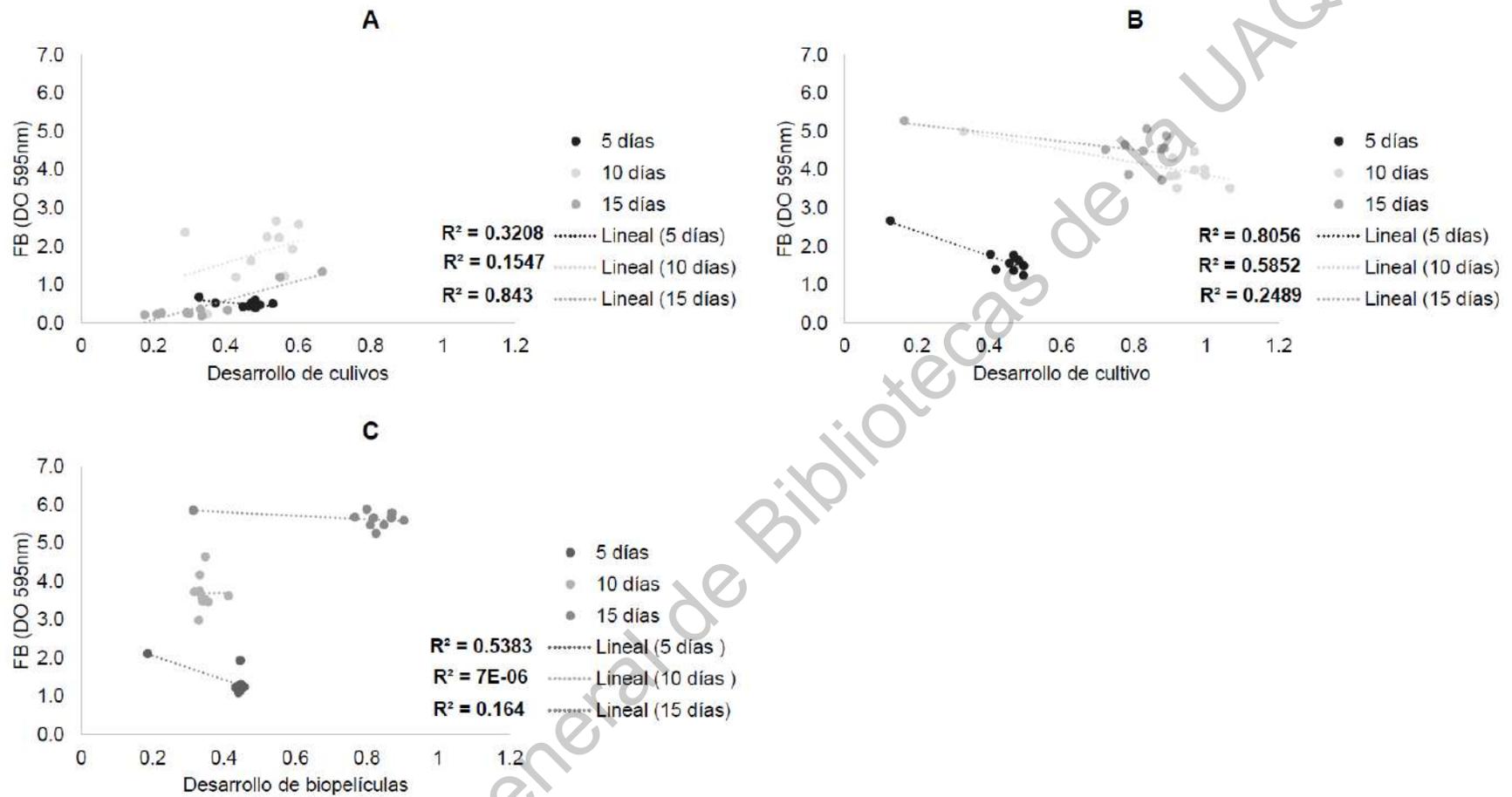


Figura 35. Correlación entre el desarrollo de plantónicos y la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica* en ENE pollo a 9 °C. A= ENEPCO, B= ENPCR, C= ENEP.

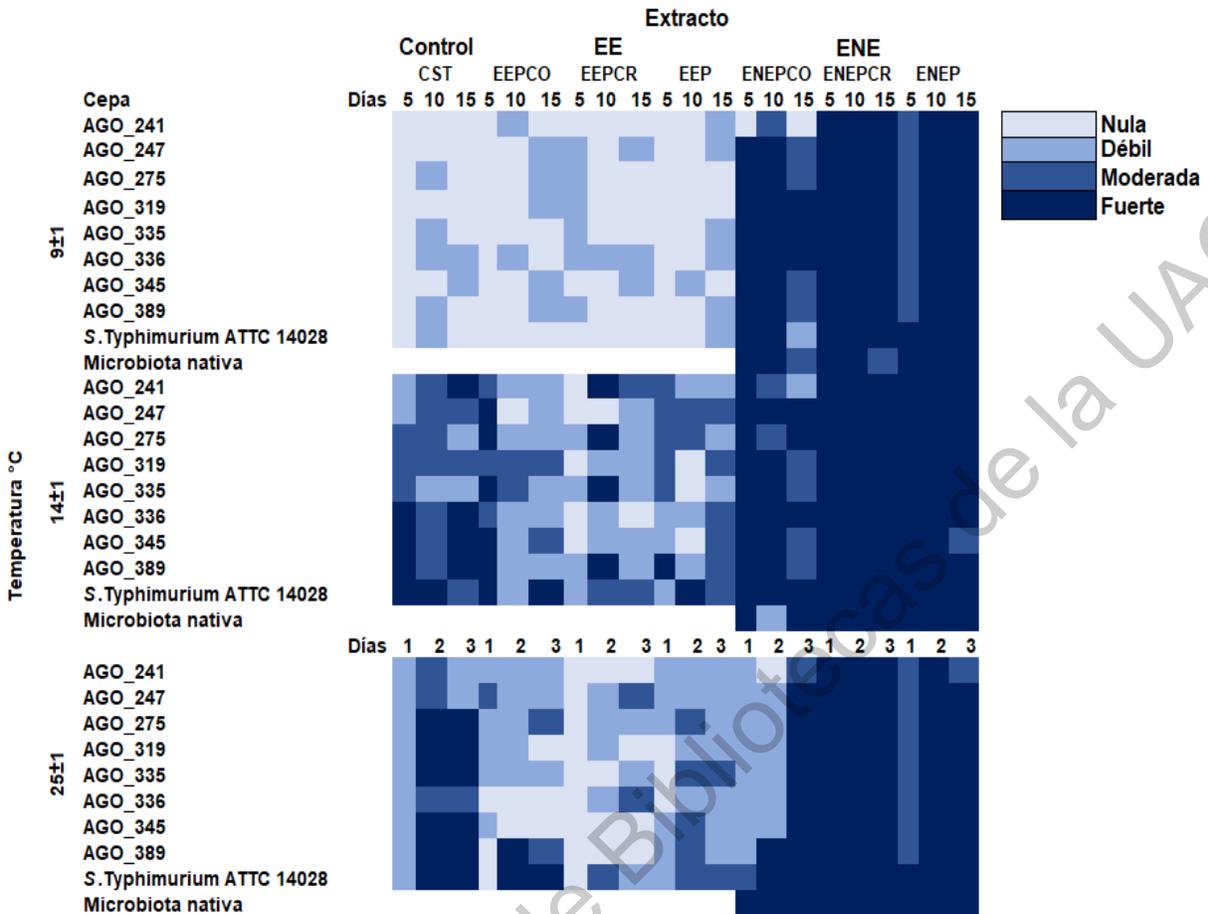


Figura 36. Clasificación de cepas de *S. enterica* según su capacidad de formación *in vitro* de biopelículas a diferentes condiciones de almacenamiento y tipo de extracto.

Control: CST estéril inoculado con *Salmonella enterica*.

5.3 Evaluación de la formación de biopelículas de *S. enterica* en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.

A partir de la clasificación realizada en la sección anterior se seleccionaron dos cepas de *S. enterica* (AGO\_S241 y AGO\_S389) aisladas de pollo con comportamientos opuestos en la FB. La cepa AGO\_S241 tuvo una FB en la mayoría de los tratamientos entre nula y débil, y la AGO\_S389 una FB entre moderada y fuerte. También se empleó la cepa de referencia, *S. Typhimurium* ATCC 14028, que tuvo una FB en la mayoría de los casos fuerte.

El objetivo de este estudio fue evaluar las posibles implicaciones de mantener superficies sucias en el área de alimentos, por lo cual se eligieron dos materiales diferentes que son los más empelados para el procesamiento de pollo en el hogar (plástico y vidrio) y además se seleccionó acero inoxidable que es el material más empleado en la industria. Las superficies fueron expuestas a EE de pollo (EEPCO, EEPCR, EEP) inoculados con las cepas de *S. enterica* seleccionadas e incubadas a 25 °C. Posteriormente se evaluó la FB que, a diferencia de la sección anterior, además de cuantificar los biopolímeros (CB) producidos se evaluó la concentración del patógeno (CP) en la matriz polimérica.

Este procedimiento se realizó primero a 25 °C empleando los tres extractos, ya que simula la temperatura ambiente, a la cual se manipula el pollo (pechuga cocida, pechuga cruda y piel). En la Figura 37, 38 y 39 se muestra la CB y el CP en las superficies inertes cuando están en contacto con los diferentes extractos a 25 °C durante 1, 2 y 3 días. El recuento inicial de células adheridas a 25 °C fue de  $5.21 \pm 0.26$ ,  $5.73 \pm 0.34$  y  $5.74 \pm 0.56$  Log UFC/mL para acero inoxidable, plástico y vidrio, respectivamente. De forma general se puede observar que las CB y la CP presentan diferentes comportamientos dependiendo del extracto y material en que se encuentren.

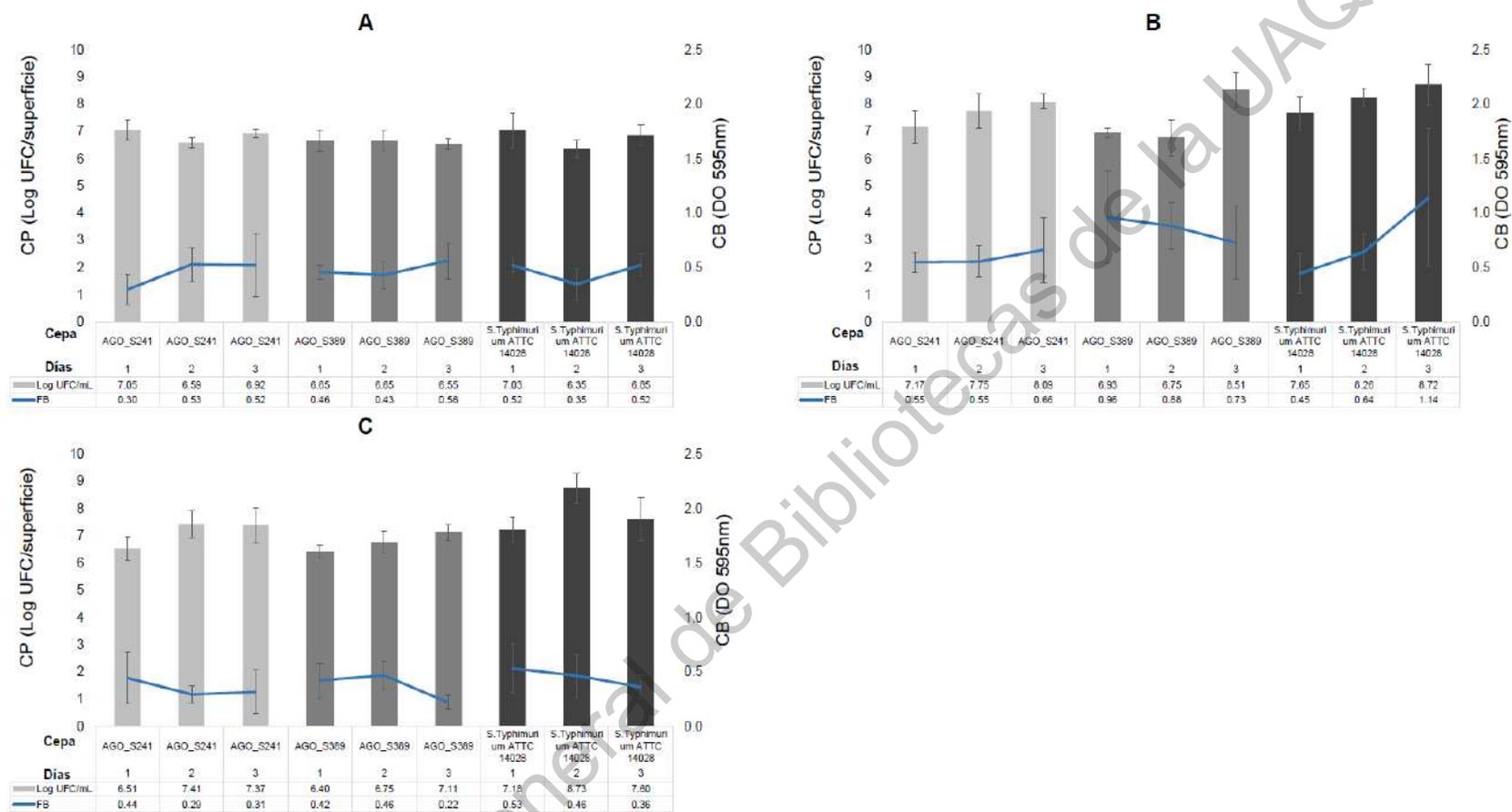


Figura 37. Formación de biopelículas de *S. enterica*, CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con residuos de EEPKO almacenados a 25 °C durante tres días. A= Acero inoxidable, B=plástico, C= vidrio.

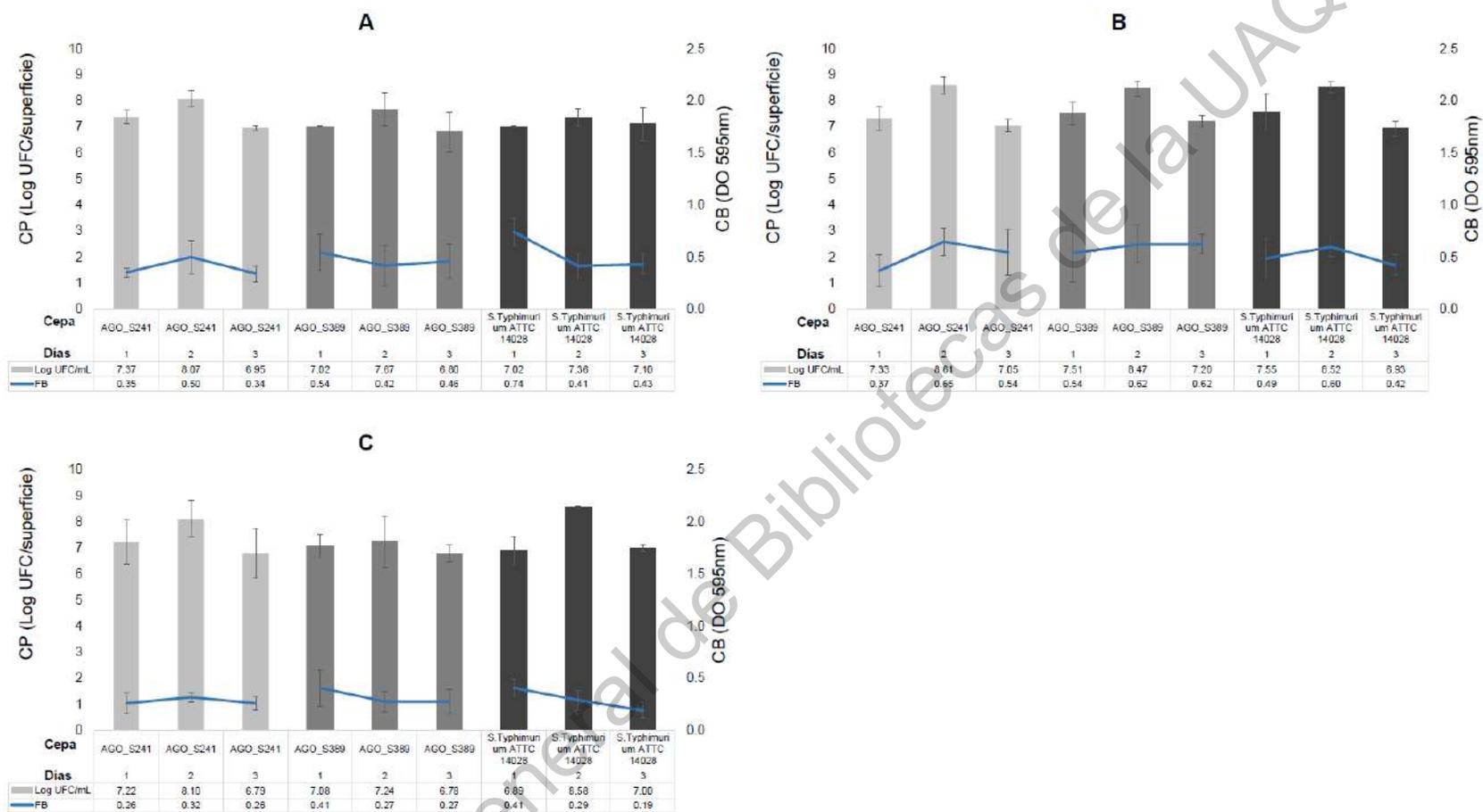


Figura 38. Formación de biopelículas de *S. enterica*, CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con remanente EEPGR a 25 °C durante tres días. A= Acero inoxidable, B=plástico, C= vidrio.

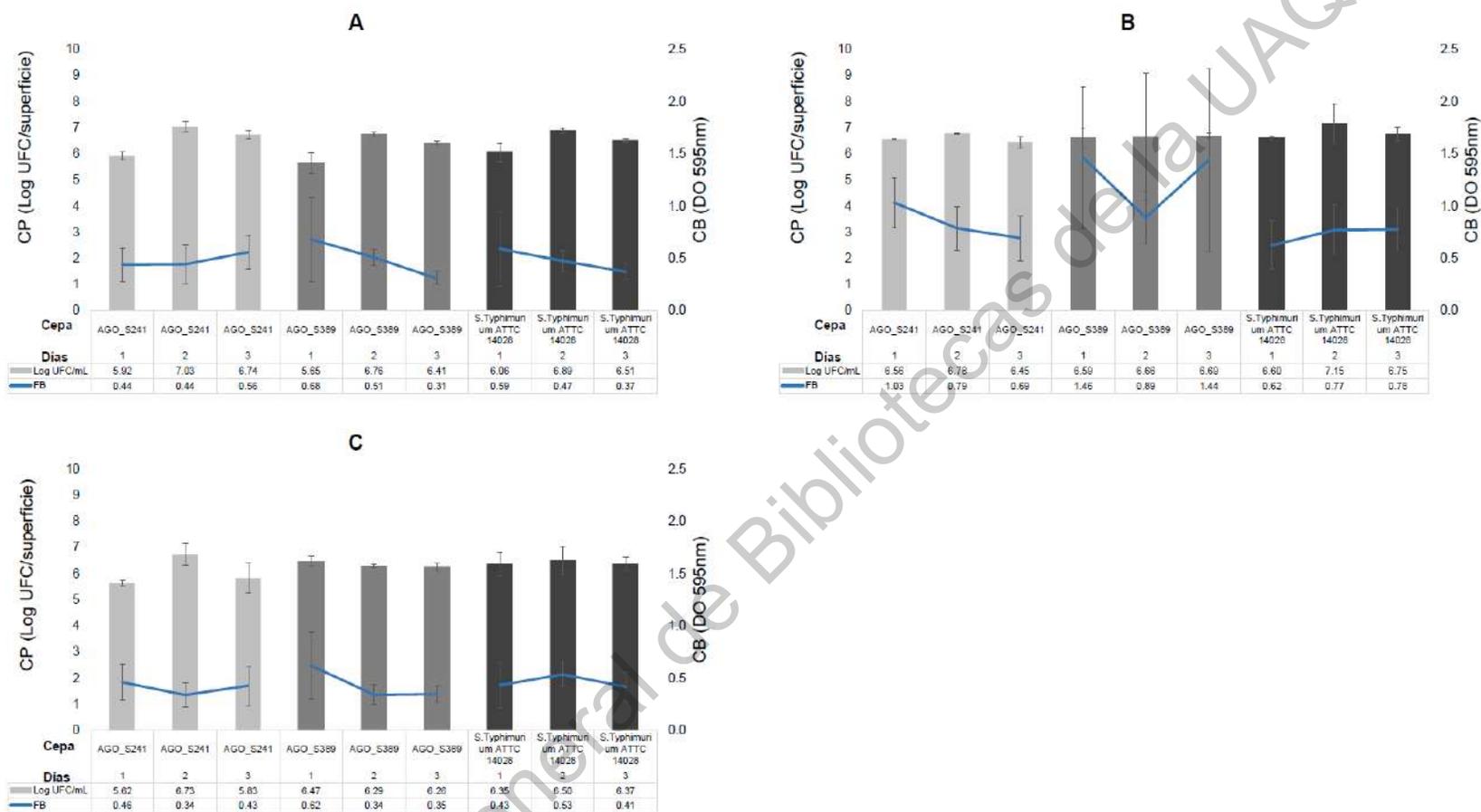


Figura 39. Formación de biopelículas de *S. enterica*, CP (barras) y CB (línea azul), en superficies inertes con remanente EEP a 25 °C durante tres días. A= Acero inoxidable, B=plástico, C= vidrio.

En el Cuadro 9 y 10 se presentan los resultados del análisis de varianza de los factores que afectan la CB y CP a 25 °C. Los factores que son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para la CB fueron: tipo de extracto, tipo de superficie, cepa y la interacciones tipo de extracto/tipo de superficie y tipo de superficie/cepa.

Cuadro 9. Análisis de varianza de factores e interacciones sobre la cuantificación de biopolímeros en superficies inertes a 25 °C.

Factor/ Interacción	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
Tipo de extracto	2	0.54	12.85	<0.0001*
Tipo de superficie	2	1.96	46.87	<0.0001*
Tiempo	2	0.05	1.32	0.277
Cepa	2	0.14	3.43	0.040*
Tipo de extracto*Tipo de superficie	4	0.30	3.56	0.012*
Tipo de extracto*Tiempo	4	0.17	2.07	0.098
Tipo de extracto*Cepa	4	0.07	0.84	0.506
Tipo de superficie *Tiempo	4	0.13	1.55	0.201
Tipo de superficie*Cepa	4	0.23	2.80	0.036*
Tiempo*Cepa	4	0.10	1.19	0.326

Para CP, los cuatro factores estudiados afectaron estadísticamente ( $p < 0.05$ ) así como las interacciones tipo de extracto/tipo de superficie y tipo de extracto/tiempo.

Cuadro 10. Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la concentración de *S. enterica* embebida en la biopelícula 25 °C.

Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
Tipo de extracto	2	13.75	54.38	<0.0001*
Tipo de superficie	2	4.79	18.97	<0.0001*
Tiempo	2	4.49	17.77	<0.0001*
Cepa	2	1.38	5.48	0.007*
Tipo de extracto*Tipo de superficie	4	1.70	3.36	0.016*
Tipo de extracto*Tiempo	4	4.44	8.78	<0.0001*
Tipo de extracto*Cepa	4	1.00	1.99	0.110
Tipo de superficie*Tiempo	4	0.38	0.76	0.554
Tipo de superficie*Cepa	4	0.86	1.70	0.163
Tiempo*Cepa	4	0.61	1.22	0.313

El factor cepa tuvo un efecto estadísticamente significativo para CB y CP. En el caso de CB se observó que la cepa AGO\_S389 fue la que mostró una mayor producción de polímeros, seguido de *S. Typhimurium* ATTC 14028 y AGO\_S241. Un comportamiento similar se observó en la sección anterior de estudios *in vitro*, donde AGO\_S389, *S. Typhimurium* ATTC 14028 resultan ser cepas moderadas o fuertes FB, y AGO\_S241 nula o débil FB en las diferentes condiciones analizadas. Lo que sugiere que la técnica *in vitro* puede ayudar a seleccionar o tamizar las cepas de una manera más rápida. Sin embargo, en relación con la CP se observó un comportamiento diferente: la mayor CP fue de *S. Typhimurium* ATTC 14028 seguido de AGO\_S241 y AGO\_S389 (Figura 40).

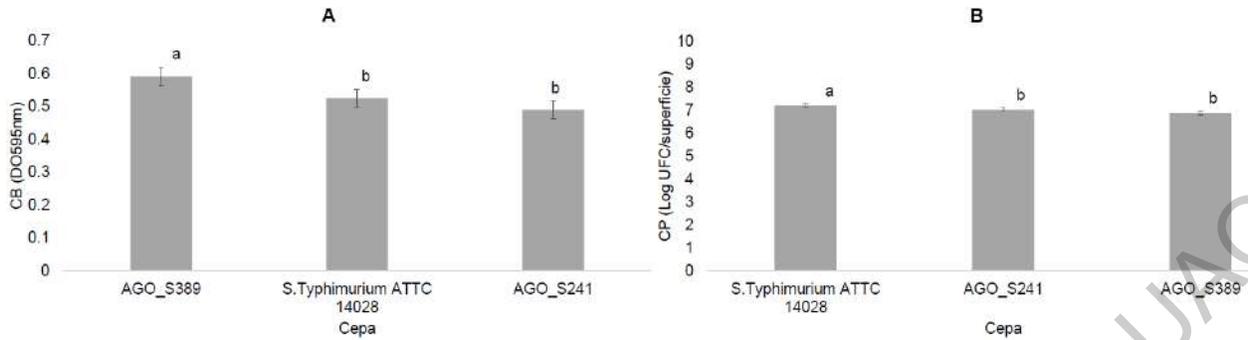


Figura 40. Efecto de la cepa en la formación de biopelículas de *S. enterica* (A= CB y B=CP) en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C durante tres días.

También en ambos casos la interacción tipo de extracto/tipo de superficie tuvo un efecto significativo. La mayor CB ocurrió en plástico con residuos de EEPKO y EEP, mientras que para CP, fue igual en plástico en presencia de EEPKO y EEPKR (Figura 41).

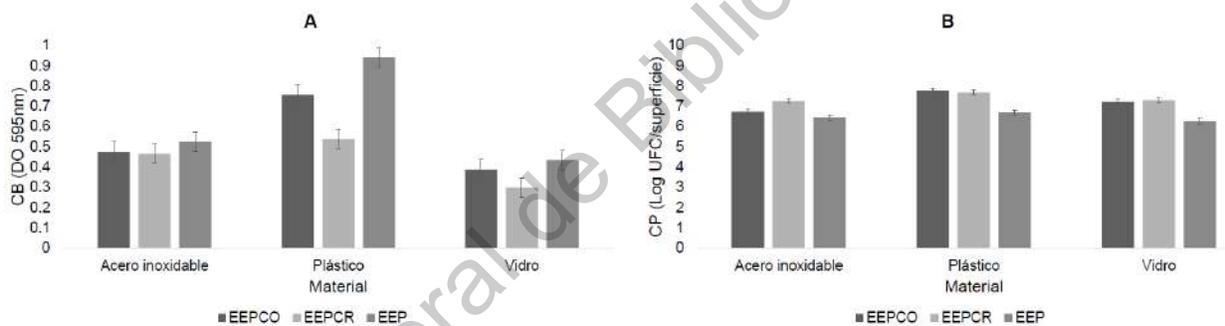


Figura 41. Efecto de la interacción entre el tipo de extracto y tipo de material sobre la formación de biopelículas de *S. enterica* (A= CB y B=CP) en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C durante tres días.

Por otra parte únicamente para CP la interacción tipo de extracto/tiempo tuvo un efecto significativo (Figura 42). En EEPKR y EEP se observó un aumento continuo hasta el segundo día y luego hubo un decremento, mientras que en EEPKO la CP aumentó de manera constante durante los tres días de almacenamiento.

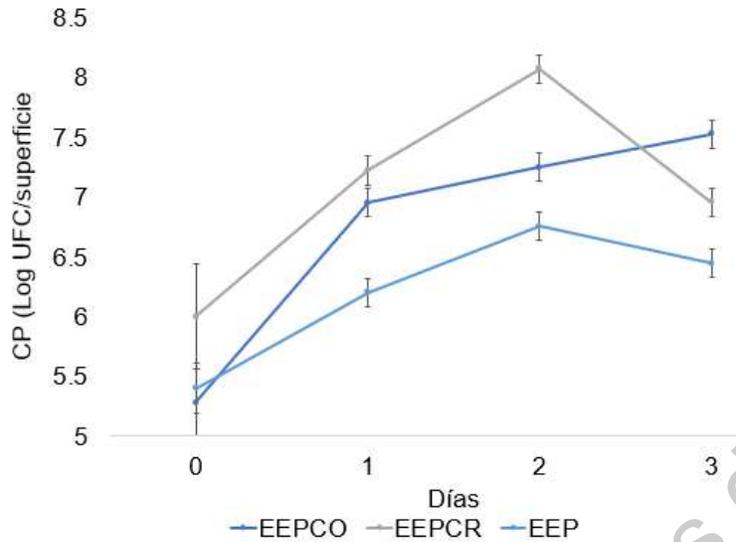


Figura 42. Efecto de la interacción entre el tipo de extracto y tiempo de almacenamiento sobre la concentración *S. enterica* en superficies inertes con remanente de extractos de pollo a 25 °C.

La interacción cepa/tipo de superficie afectó únicamente la CB (Figura 43), observando que la variabilidad entre cepas en la producción de polimeros esta más marcada en plástico .

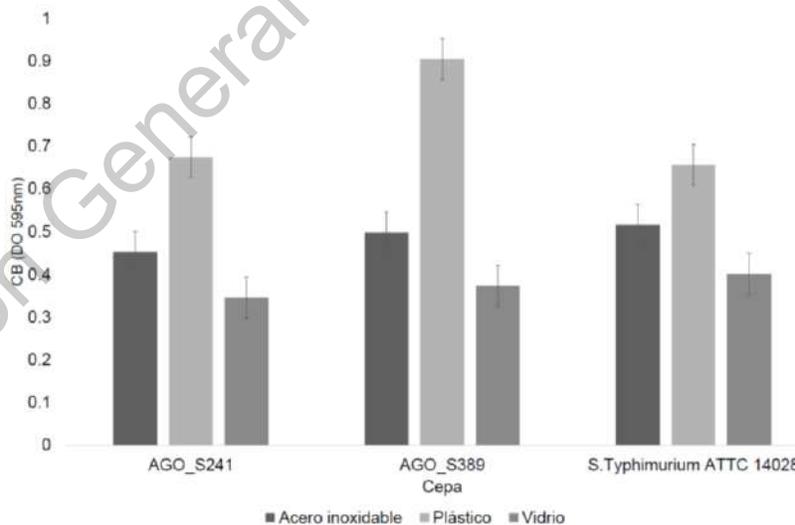


Figura 43. Efecto de la interacción entre la cepa y tipo de superficie sobre la concentración de *S. enterica* a 25 °C.

A partir de estos resultados se eligió EEPCR para realizar la evaluación de CB y CP a 9 y 14 °C ya que es el extracto que presenta una menor CB, pero la mayor población de *S. entérica* embebida en la matriz polimérica. De igual forma se trabajó únicamente con plástico y vidrio ya que son los dos materiales donde se forma una mayor y menor CB, respectivamente. La selección de este extracto y estos materiales, también se basó en los datos obtenidos en la encuesta.

En la Figura 44 y 45 se muestra la CB y la CP en los diferentes extractos incubados a 14 y 9 °C, durante 5, 10 y 15 días. El recuento inicial de células adheridas fue de  $5.19 \pm 0.38$  Log UFC/mL en plástico y  $4.69 \pm 0.31$  Log UFC/mL en vidrio.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

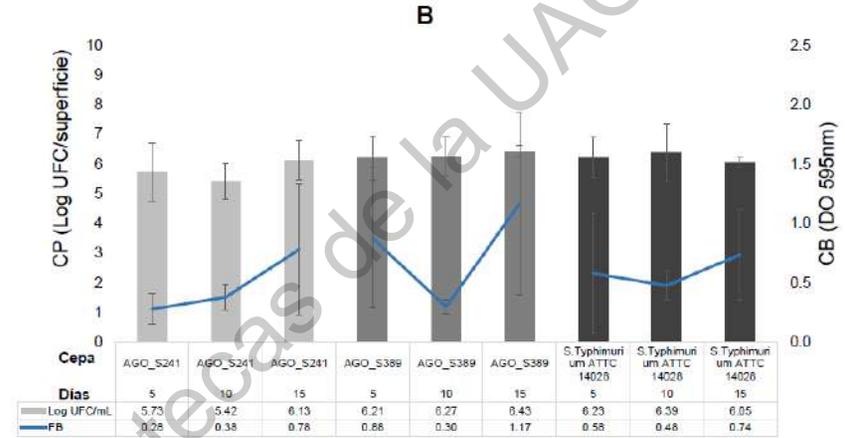
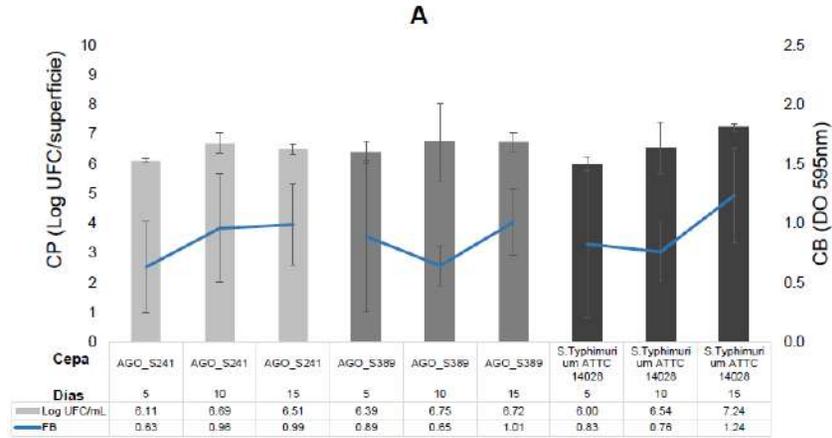


Figura 44. Formación de biopelículas de *S. enterica*, CP (barras) y CB (línea azul) en superficies inertes con remanente de EEPGR a 14 °C durante quince días. A= plástico, B= vidrio.

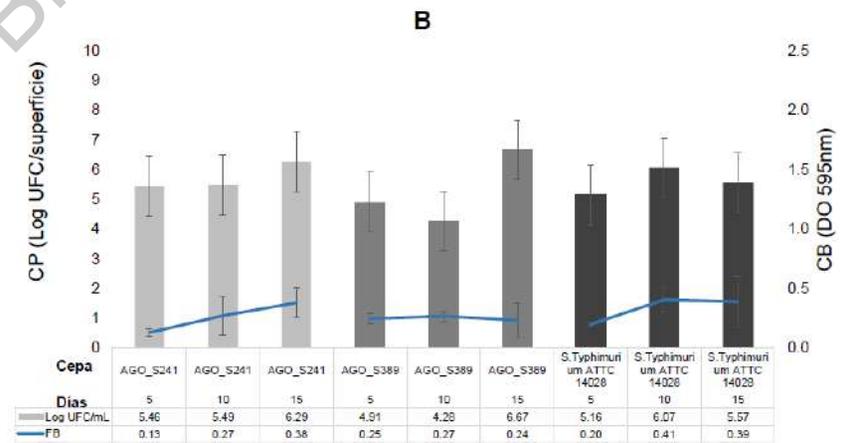
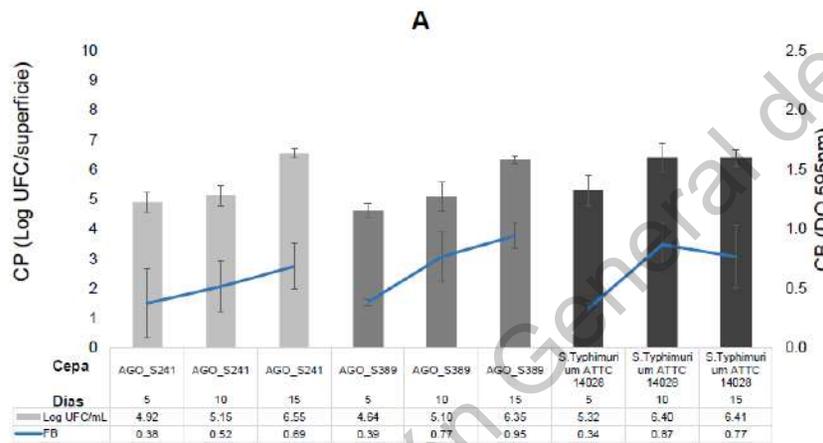


Figura 45. Formación de biopelículas de *S. enterica*, CP (barras) y CB (línea azul) en superficies inertes con remanente de EEPGR a 9 °C durante quince días. A= plástico, B= vidrio.

En el Cuadro 11 y 12 se muestra el análisis de varianza de los factores material, días y cepa, así como sus interacciones que afectan la CB y el CP a 9 y 14 °C, respectivamente.

Los factores que son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para la CB fueron: tipo de superficie y tiempo para ambas temperaturas; ninguna de las interacciones resultó significativa.

Cuadro 11. Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan la cuantificación de biopolímeros a 9 y 14 °C.

Temperatura °C	Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
9	Tipo de superficie	1	0.55	51.81	0.002*
	Tiempo	2	0.28	13.41	0.02*
	Cepa	2	0.04	1.67	0.3
	Tipo de superficie*Tiempo	2	0.07	3.3	0.14
	Tipo de superficie*Cepa	2	0.03	1.2	0.39
	Tiempo*Cepa	4	0.03	0.79	0.59
14	Tipo de superficie	1	0.31	16.3	0.02*
	Tiempo	2	0.53	13.73	0.02*
	Cepa	2	0.07	1.77	0.28
	Tipo de superficie*Tiempo	2	0.04	1.16	0.4
	Tipo de superficie*Cepa	2	0.09	2.3	0.22
	Tiempo*Cepa	4	0.2	2.64	0.19

Los factores que resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para CP a 9 °C fue el tiempo de almacenamiento, mientras que a 14 °C fueron: tipo de material (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza de factores e interacciones que afectan concentración de *S. enterica* a 9 y 14 °C.

Temperatura °C	Factor/ Interacción	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F radio	Prob>F
9	Tipo de superficie	1	0.05	0.41	0.55
	Tiempo	2	4.9	20.34	0.01*
	Cepa	2	0.76	3.16	0.15
	Tipo de superficie*Tiempo	2	0.23	0.96	0.46
	Tipo de superficie*Cepa	2	0.32	1.32	0.36
	Tiempo*Cepa	4	2.22	4.62	0.08
14	Tipo de superficie	1	0.93	6.63	0.06*
	Tiempo	2	0.49	1.74	0.29
	Cepa	2	0.46	1.65	0.3
	Tipo de superficie*Tiempo	2	0.27	0.95	0.46
	Tipo de superficie*Cepa	2	0.11	0.4	0.69
	Tiempo*Cepa	4	0.05	0.09	0.98

De manera general hubo una mayor CB en plástico que en vidrio, tanto a 14 °C como a 9 °C (Figura 49), comportamiento similar al observado a 25 °C.

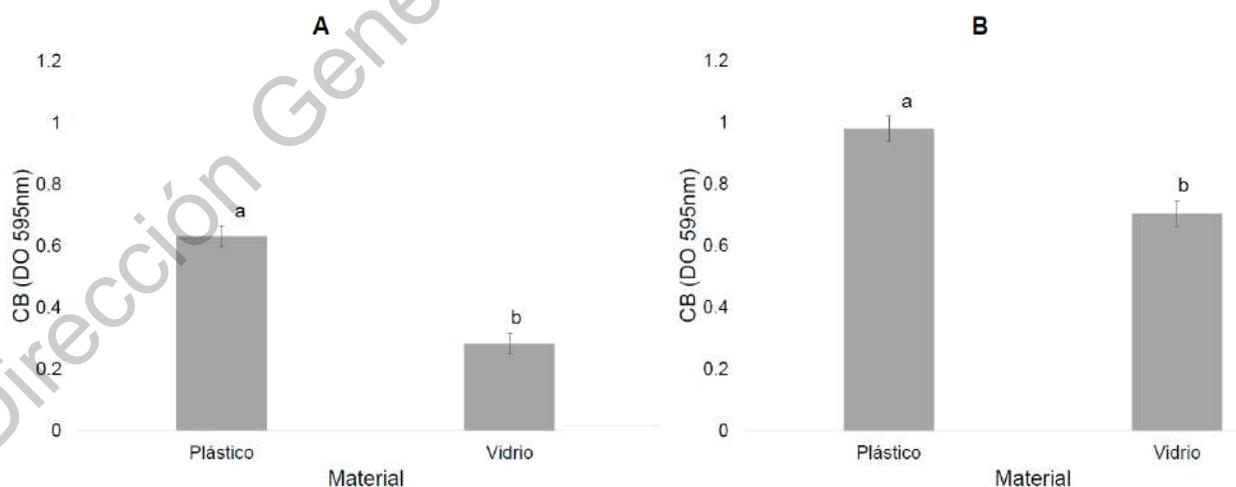


Figura 46. Efecto del tipo de superficie sobre la cuantificación de biopolímeros formados por de *S. enterica* en superficies inertes con remanente de EEPCR a 9 y 14 °C durante quince días. A= 9 °C y B= 14 °C

La CB a través del tiempo a 14 °C se incrementó de manera considerable a los 15 días de almacenamiento (Figura 47).

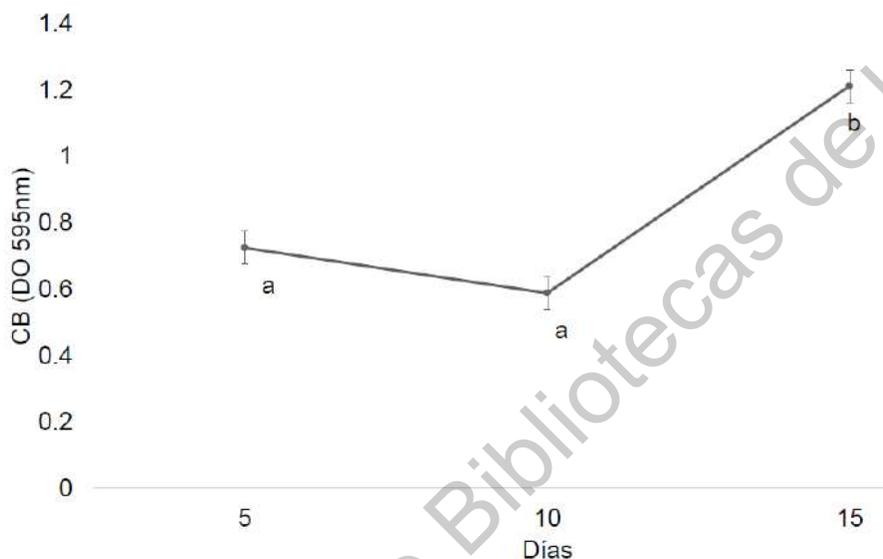


Figura 47. Efecto de tiempo sobre la cuantificación de biopolímeros formados por *S. enterica* en superficies inertes con remanente EEPCR a 14 °C durante quince días.

A 9 °C tanto la CB como la CP incrementaron con respecto al tiempo (Figura 48).

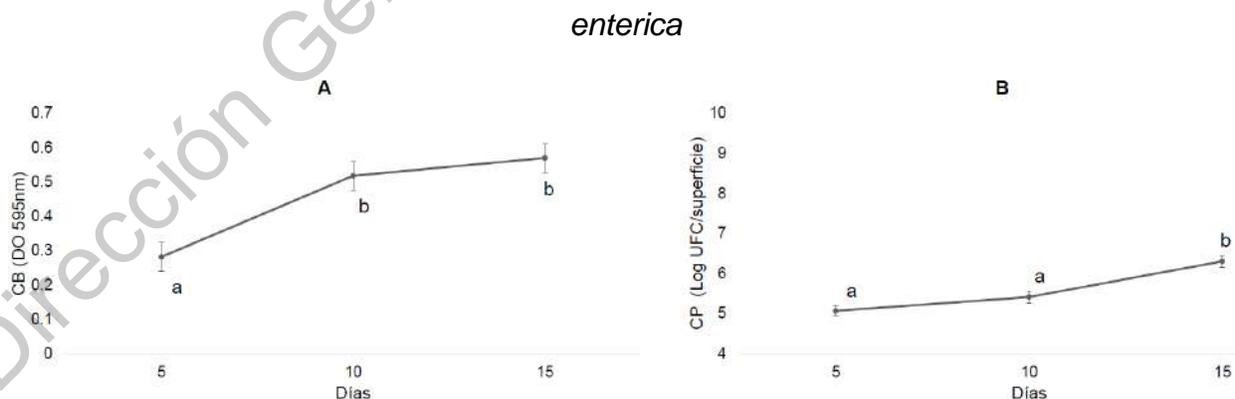


Figura 48. Efecto del tiempo sobre la cuantificación de biopolímeros de *S. enterica* (A=CB y B=CP) en superficies inertes con remanente EEPCR a 9 °C durante quince días.

Por último, se realizó un análisis de las correlaciones entre la CB y CP y no se encontró ninguna relación entre estos dos factores (Figura 48 y 49).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

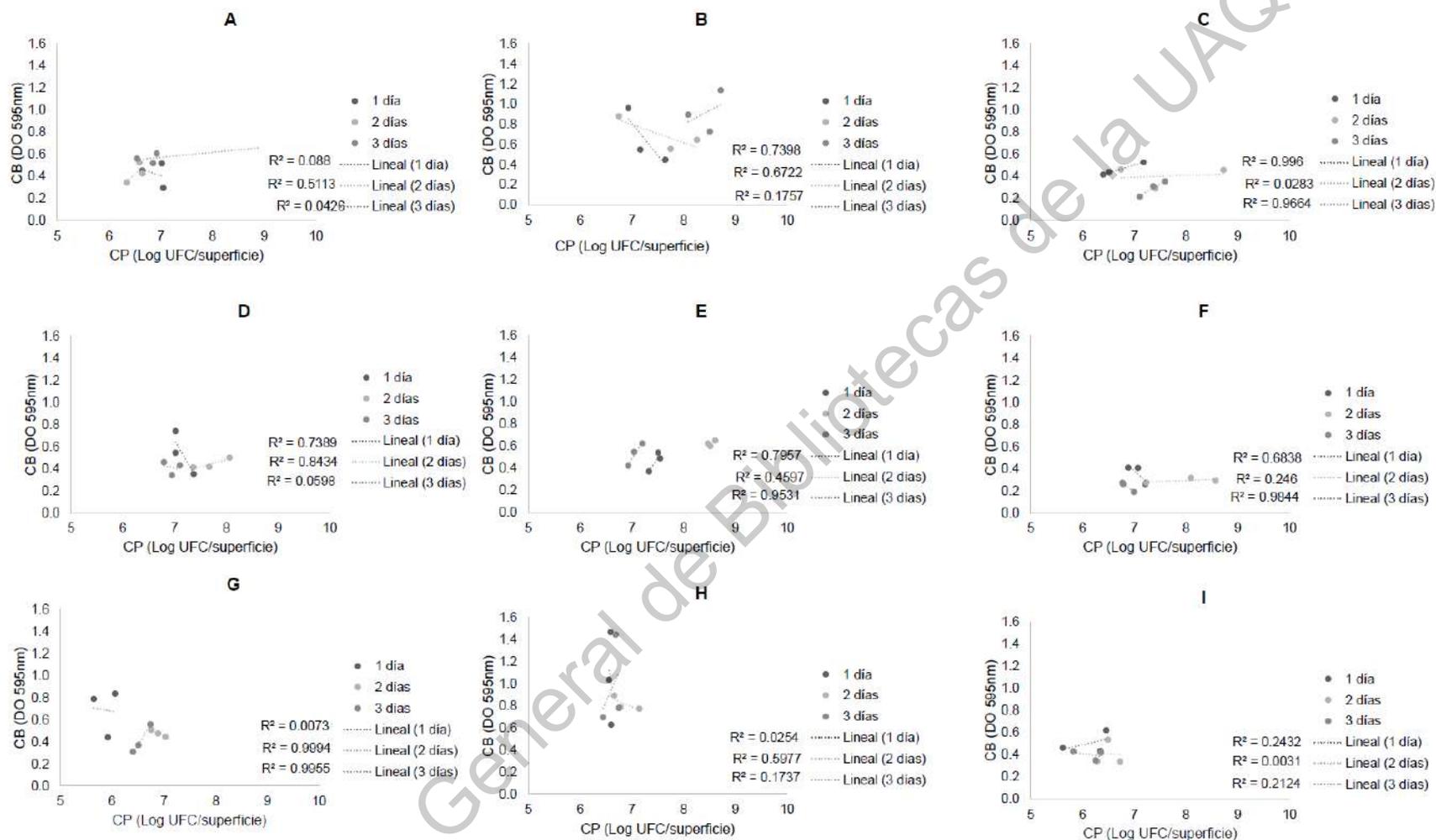


Figura 49. Correlación de la formación de biopelículas de *S. enterica* (CB y CP) en remanentes de extractos de pollo en superficies inertes a 25 °C durante tres días. A= Acero inoxidable en EEPKO, B=Plástico en EEPKO, C= Vidrio en EEPKO, D= Acero inoxidable en EEPKR, E= Plástico en EEPKR, F=Vidrio en EEPKR, G= Acero inoxidable en EEP, H= Plástico en EEP, I= Vidrio en EEP.

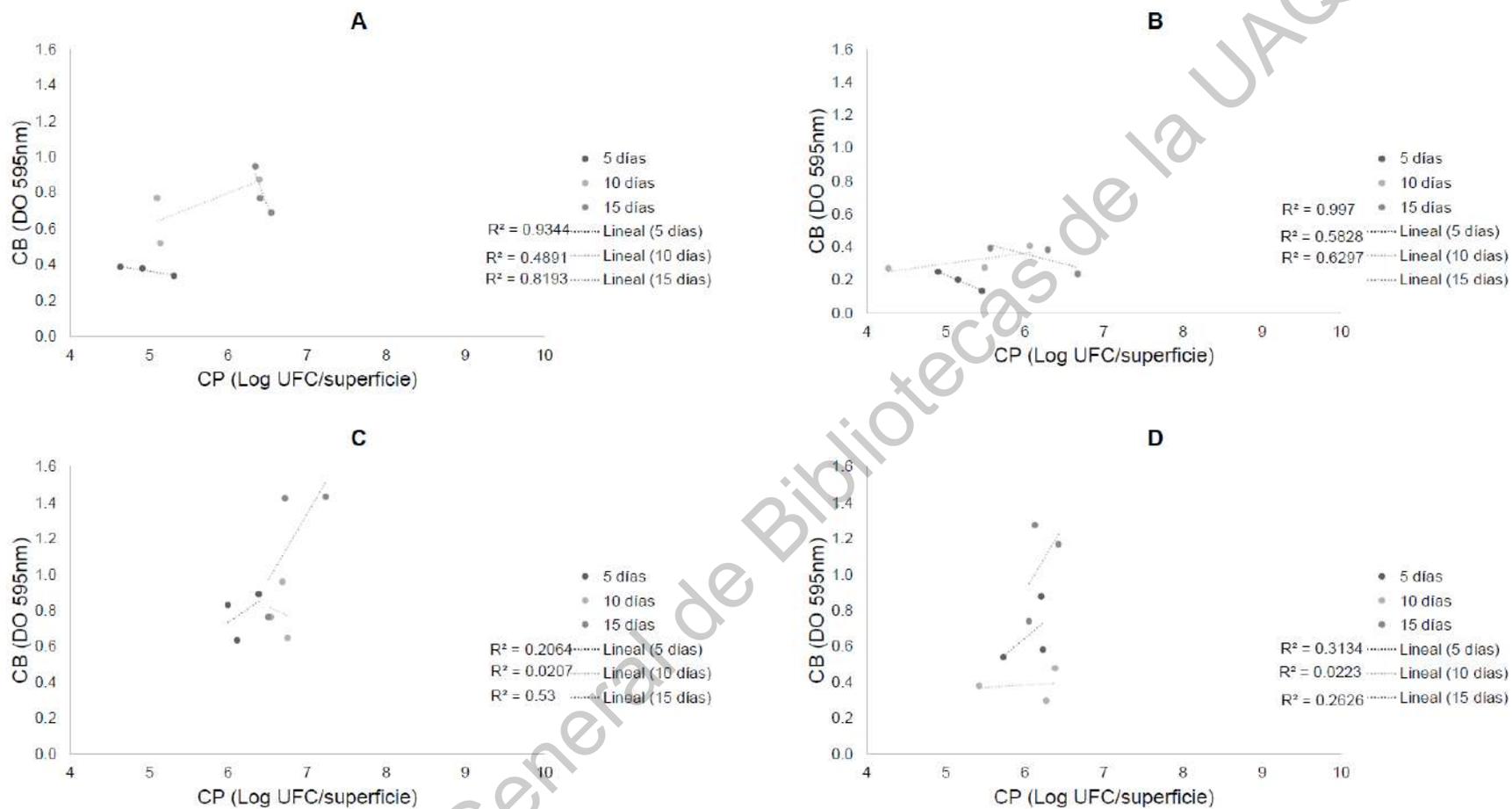


Figura 50. Correlación de la formación de biopelículas de *S. enterica* (CB Y CP) en remanentes EEPQR en superficies inertes a 14 y 9 °C durante quince días. A= Plástico a 14 °C, B= Vidrio a 14 °C, B= Plástico a 9 °C, D= Vidrio a 9 °C.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa en el centro de México.

La importancia del hogar como punto de origen de ETAs nos llevó a realizar encuestas para evaluar aspectos que promuevan la contaminación, persistencia y multiplicación bacteriana en el entorno doméstico (Redmond y Griffith, 2003). *S. enterica* puede sobrevivir o contaminar alimentos durante la manipulación de estos en el hogar, debido a varios factores, como la conservación inadecuada de los alimentos durante el almacenamiento, la cocción insuficiente y la contaminación cruzada entre los alimentos e instrumentos utilizados para su procesamiento como de las tablas de cortar (Carrasco y col., 2012; Soares y col., 2012; Dantas y col., 2018).

La entrada de alimentos al hogar, puede ser la primera fuente de contaminación en la cocina. En el caso del pollo, se ha encontrado que en la piel hay una mayor cantidad de bacterias que en la carne (Tan y Dykes, 2014) y la incidencia de patógenos es más alta (Gonçalves-Tenório, 2018); por lo tanto, el adquirir este producto con piel puede incrementar el riesgo de la entrada de microorganismos patógenos y contaminación cruzada que origine alguna ETAs. Sin embargo, en el centro del país se tiende a comprar el pollo principalmente sin piel, lo que podría reducir la exposición a patógenos.

A su vez la temperatura de almacenamiento de los alimentos es de gran importancia para evitar el crecimiento de bacterias (Ebert, 2018). La mayoría de los alimentos de origen animal debe ser almacenado a temperaturas de 7 °C o por debajo, para evitar la multiplicación de bacterias. La carne de aves como el pollo o aves silvestres requieren mantenerse temperaturas de 4 °C o menores para evitar la replicación de *S. enterica*. (European Parliament and Council, 2004). Sin embargo, diversos estudios, así como el presente han reportado que los refrigeradores en todo el mundo funcionan a temperaturas superiores a las recomendadas (James, Evans y James, 2008). En la actualidad, el almacenamiento doméstico de alimentos refrigerados parece ser el eslabón más débil de toda la cadena de frío (James,

Evans y James, 2008), ya que las altas temperaturas en los refrigeradores podrían favorecer el crecimiento de bacterias patógenas y no patógenas tanto en los alimentos almacenados como en las superficies internas de refrigeradores y, en consecuencia, aumentar el riesgo de promover ETAs (Macías-Rodríguez y col., 2013). Algunas investigaciones indican que hasta el 50% de las ETAs en casa puede atribuirse a un almacenamiento inadecuado de alimentos, incluido el almacenamiento en frío ineficaz y la gestión del refrigerador (Ryan y col., 1996), diferentes autores indican que las temperaturas más comunes de los refrigeradores domésticos son entre los 4 a 8 °C (James, Evans y James, 2008; Pouillot y col., 2010; Macías-Rodríguez y col., 2013), dato similar a lo obtenido en el presente estudio.

Por otro lado, los controles de temperatura de los refrigeradores domésticos son preajustados de fábrica; para el refrigerador suelen ir de 1 hasta los 8 °C, mientras que para los congeladores entre -21 a -14 °C (G.E., 2004), además cuentan con un regulador de la potencia de enfriamiento de acuerdo con la cantidad de alimentos almacenados. El nivel máximo (más frío) se debe utilizar cuando el congelador o refrigerador se encuentra lleno de alimentos, entre el nivel máximo y mínimo cuando se almacena una cantidad media de comida y el mínimo cuando está vacío. La capacidad de enfriamiento del refrigerador puede verse comprometida cuando la cámara de refrigeración está sobrecargada y la sobrecarga podría contribuir a las altas temperaturas operativas (James, Evans y James, 2008), este podría ser el caso de las personas a las cuales sus refrigeradores se encuentran a temperaturas mayores de las adecuadas para el almacenamiento de alimentos, y de igual forma esto puede contribuir al desarrollo de bacterias patógenas y no patógenas, como se ha mencionado anteriormente.

Además, los refrigeradores cuentan con una clasificación específica para colocar los alimentos para promover su inocuidad y conservación de los mismos (Figura 51). Es de importancia mantener el orden y limpieza dentro de los refrigeradores, ya que las bacterias de los alimentos sin lavar o crudos, los paquetes con fugas, las superficies de los recipientes sucios que se introducen en los refrigeradores

domésticos pueden contaminar directamente otros alimentos almacenados y persistir en las superficies internas del refrigerador (Michaels y col., 2001). Esto, a su vez, puede generar el riesgo de contaminación cruzada a largo plazo durante la posterior preparación y almacenamiento de alimentos (Michaels y col., 2001).



Figura 51. Forma correcta de colocar los alimentos en el refrigerador (López-Atl, 2017).

Según los resultados de la encuesta, las personas que congelan el pollo lo colocan de forma adecuada en el refrigerador. En el caso de la refrigeración, la mayoría lo coloca en la parte superior (B) donde van los alimentos listos para su consumo, y al almacenarlo ahí puede haber escurrimientos hacia otros alimentos y ocasionar contaminación cruzada; otras personas colocan el pollo crudo en la parte correcta que es la (C), y una minoría lo coloca dentro de las cámaras para frutas y verduras (D y E) o incluso en las puertas del refrigerador (F y G) donde se colocan condimentos y bebidas, lo que al ser una parte móvil del refrigerador podría causar con mayor frecuencia escurrimientos o derrames de jugo de la carne cruda del pollo, de igual manera, al colocar alimentos de manera aleatoria en el refrigerador puede favorecer contaminación cruzada de los mismos. Por otro lado, el almacenamiento cercano de alimentos crudos y cocidos representa un riesgo de contaminación

cruzada de los alimentos por patógenos. Por esta razón, se recomienda almacenar ambos tipos de alimentos por separado en recipientes cerrados y adecuados (Lando y Fein, 2007). En un estudio realizado por Macías-Rodríguez y col. (2013) donde se evaluaron prácticas domésticas de almacenamiento en refrigeradores, resultó que el 43% de los refrigeradores muestreados contenían productos almacenados de manera inadecuada, como alimentos en latas, platos y / o sartenes y ollas a menudo descubiertos. Esta falta de organización podría verse agravada por la falta de limpieza y desinfección, lo que a su vez aumenta la probabilidad de contaminación con bacterias patógenas y la probabilidad de contraer ETAs.

Como se mencionó anteriormente la parte de preparación de alimentos es de importancia para la inocuidad de los mismos. La forma en que los consumidores manipulan los alimentos en la cocina afecta el riesgo de multiplicación de patógenos y la contaminación cruzada con otros productos (Redmond y Griffith, 2003).

El tipo de material y la facilidad para limpiar los instrumentos que se utilizan para la manipulación y/o preparación de los alimentos también es importante pues se sabe que los materiales que componen las superficies de contacto con los alimentos tienen un gran efecto sobre el nivel de adhesión de bacterias y la FB (Srey, Jahid y Ha, 2013). Como observamos en los resultados de la encuesta el segundo material más empleado en tablas de picar es la madera, y se ha demostrado que las tablas de madera son las más difíciles de lavar y desinfectar debido a su porosidad (Moore y col., 2007; Carrasco y col., 2012). En los últimos años, ha habido una disminución en el uso de tanto de tablas y otras superficies de madera porque es un material poroso, absorbente y orgánico que puede ser fácilmente penetrado por bacterias, lo que promueve incidentes de contaminación cruzada al actuar como un vehículo importante para la propagación de microorganismos patógenos responsables de las infecciones transmitidas por los alimentos (Adetunji e Isola, 2011). Sin embargo, aún es de los materiales más empleados en México.

Por tanto, durante la preparación diaria de alimentos potencialmente contaminados, como es el pollo crudo, en las cocinas domésticas, es necesario que los consumidores apliquen procedimientos de higiene para lograr la reducción del

número de organismos viables a un nivel que ya no constituya una amenaza para la salud (Redmond y Griffith, 2003). Otro de los riesgos durante la manipulación de los alimentos es la contaminación cruzada entre alimentos crudos y procesados por contacto con la superficie, ya que bacterias patógenas como *Salmonella enterica* pueden adherirse a la superficie y formar una biopelícula, lo que resulta en una fuente de contaminación (Adetunji y Isola, 2011; Carrasco y col., 2012). Se sabe que lavar los utensilios con una combinación de agua y detergente disminuye el riesgo de contaminación microbiológica (Cogan y col., 1999; Barker, Naeeni y Bloofield, 2003); sin embargo, en un estudio realizado por Dantas y colaboradores (2018), donde se evaluó el proceso de contaminación cruzada de *S. Enteritidis* desde carne de pollo cruda a pepino a través de tablas de cortar (madera, plástico y vidrio), antes y después de la FB, se lograron recuperar células de la bacteria en todas las tablas (lavadas y no lavadas con agua y jabón después del contacto con la carne cruda de pollo); además la recuperación fue mayor en las tablas de madera, lo que coincide con lo antes mencionado.

Finalmente, la encuesta permitió conocer cuáles son los materiales más empleados en el hogar, tanto para el pollo crudo como para cocido, lo que permitirá crear escenarios en el laboratorio más reales para realizar estudios.

## 6.2 Evaluación del efecto de la MN, el tipo de extracto de pollo y las condiciones de almacenamiento sobre la formación *in vitro* de biopelículas de *S. enterica*.

La FB es un fenómeno complejo influenciado por diversos factores, incluyendo propiedades de la superficie del material como su rugosidad, hidrofobicidad y porosidad; propiedades intrínsecas de las células bacterianas como estado fisiológico e historia previa de la célula, así como las propiedades del medio que los rodea como el pH, los niveles de nutrientes y temperatura (Frank, 2001; Donlan, 2002; Srey y col., 2013).

En este estudio se observó que en los EE, la FB es baja y que existe una mayor variabilidad entre las cepas, en cambio en los ENE se observó una mayor FB en todas las condiciones de almacenamiento, lo cual puede ser atribuido principalmente a la MN del pollo. En el pollo, además de las bacterias mesófilas,

también existen bacterias psicrótrofas que ya están adaptadas a este sustrato (Jia y col., 2020). Se ha encontrado que, a bajas temperaturas, la tasa de crecimiento de *S. enterica* es menor que la tasa de crecimiento de organismos tolerantes al frío presentes en la MN de pechugas de pollo, esto puede ser en consecuencia del agotamiento de nutrientes por parte de los competidores de más rápido crecimiento a bajas temperaturas que impide que *S. enterica* logre una alta densidad como sucede en condiciones estériles (Oscar y col., 2006). Este mismo comportamiento puede suscitarse durante la FB, siendo la MN la principal responsable de la producción de polímeros. En ENEPCO donde hay una menor concentración de bacterias también se observó una menor FB.

Asimismo, la mayoría de las biopelículas en su ambiente natural suele consistir en un consorcio de especies que se influyen entre si ya sea de manera sinérgica o antagonista (Burmolle y col., 2006). El pollo crudo contiene una gran cantidad de MN ya adaptada a este sustrato, por lo cual puede ocurrir una competencia entre ésta y las cepas de *S. enterica*, afectando tanto su crecimiento en este medio (Jia y col., 2020) como la FB. En un estudio realizado por Moller y colaboradores (2013) donde se desarrollaron modelos matemáticos para describir el crecimiento e interacción entre *S. enterica* y la MN de jugo de carne, se encontró que a 25, 30 y 33 °C, *S. enterica* crece más rápido que la MN alcanzando el mismo nivel que ésta, mientras que en un estudio realizado por Jia y colaboradores (2020) donde también desarrollaron modelos matemáticos para describir el crecimiento e interacción entre *S. enterica* y la MN en carne de pollo, se encontró que por encima de los 20 °C una vez que la MN alcanza su máxima concentración comienza a inhibir el crecimiento de *S. enterica* mientras que debajo de 12 °C, únicamente se observa crecimiento de la MN. El efecto antagónico del crecimiento del patógeno en presencia de MN se puede asociar a lo obtenido en este estudio con la FB, ya que en algunos casos se observó que al estar interactuando las cepas de *S. enterica* y la MN del pollo hay una menor FB.

Los resultados obtenidos destacan la importancia de desarrollar experimentos en condiciones más cercanas a la realidad, ya que el desarrollo de experimentos en

alimentos estériles no siempre da predicciones realistas debido a la interferencia que puede haber de la MN del alimento (Davey y O'Toole, 2000; Jia y col., 2020).

Por otro lado, en el caso de los EE, la FB se puede atribuir principalmente a la cuestión de la disponibilidad de nutrientes. El desarrollo microbiano se ve afectado principalmente por la composición general del alimento, es decir, por la fuente de energía, por la presencia de agua, minerales, antioxidantes, ácidos orgánicos, entre otros (Lasagabaster y col., 2012). En ENEPCO fue donde se encontró una mayor FB, esto se puede deber a que a pesar de tener una menor concentración de proteínas que la pechuga cruda (Cuadro 14), al elevar la temperatura para su cocción las proteínas se desnaturalizan estando más disponibles para su metabolismo, por lo cual las bacterias podrían metabolizar más rápido los nutrientes. En el caso EEP, donde la cantidad de proteínas es menor, y el contenido de grasa es más alto, podría ser más complicado tener nutrientes disponibles y esto puede interferir FB. En un estudio realizado por Tan, Lee y Dykes (2014), donde se investigó si la presencia de grasa juega un papel en la supervivencia de *S. enterica* en la carne y la piel de pollo tratada con ácido acético, encontraron que la diferencia en la composición de la grasa entre estas dos puede afectar la vulnerabilidad de las células debido a que estas se encuentran potencialmente atrapadas en la estructura irregular de la grasa.

Cuadro 13. Composición de macronutrientes de piel, pechuga cruda y pechuga cocida de pollo y pH de extractos.

Macronutrientes	Piel	Pechuga cruda	Pechuga cocida
Agua (%)	39.96	64.1	62.8
Proteína (%)	20.19	30.22	22.5
Grasa (%)	40.34	3.52	5.2
Carbohidratos (%)	-	-	-
pH	6.58	7.02	6.37

(USDA, 2015).

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan la FB de *S. enterica* (Iliadis y col., 2018). En este estudio se observó que es más visible este efecto cuando el patógeno se encuentra en ausencia de la micorbiota nativa. Por otro lado, de forma general la FB se incrementó conforme al tiempo. Sin embargo, la interacción cepa/tiempo mostró que algunas cepas tienen una mayor FB a tiempos menores. La FB es un proceso dinámico con diferentes fases que son la adhesión inicial o reversible, la adhesión irreversible, la formación de microcolonias, la maduración y dispersión (Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018) y puede ser que algunas cepas pasen por estas etapas de manera más rápida que otras.

Hasta el momento, existen pocos estudios respecto a la FB por diferentes cepas de *S. enterica* en diferentes medios (Stepanović y col., 2003; Whiting y Golden, 2002). Sin embargo, en los que existen, se ha encontrado una importante variabilidad intra-especie independientemente del medio, como también se pudo ver en el presente estudio. Resultados similares también fueron encontrados por Nilsson y colaboradores (2001) para cepas de *L. monocytogenes*, quienes mencionaron que tanto la cepa como las condiciones ambientales determinan el nivel de producción de biopelículas, sugiriendo que el medio ambiente puede generar una presión de selección compleja. De la misma forma Hood y Zottola (1997) encontraron que el medio que inducía la producción de las mayores cantidades de biopelícula no era el mismo para especies diferentes.

Por último, la ausencia de correlación entre la FB y el desarrollo microbiano se puede deber a que el crecimiento planctónico bajo las mismas condiciones ambientales es diferente al crecimiento bacteriano en biopelículas (Jain y Chen, 2007; Díez-García y Alonso-Calleja, 2012; Lianou y Koutsoumanis, 2012), es decir, las bacterias en su estado libre crecen de forma diferente a aquellas que están dentro de la biopelícula. La información encontrada en este estudio en cuanto a la correlación entre desarrollo y FB es similar a lo obtenido por Díez-García y Alonso-Calleja (2012) quienes estudiaron la cinética de crecimiento y la capacidad FB de aislados de *S. enterica* de aves de corral a diferentes condiciones de temperatura y pH, no encontrando correlación alguna. Explicaron que esto podría deberse a que después de un cierto tiempo durante la incubación, la superficie alcanzó un nivel de saturación, donde un mayor número de células planctónicas no implicaba un mayor número de células adheridas ni embebidas en la matriz polimérica.

### 6.3 Evaluación de la formación de biopelículas de *S. enterica* en superficies inertes (acero inoxidable, plástico y vidrio) en contacto con extractos estériles de pollo a diferentes condiciones de almacenamiento.

Como se describió anteriormente, la adhesión es el primer paso en la contaminación bacteriana y es la primera fase de la FB en la que las células se adhieren a una superficie luego de haber sido expuestas a ellas (Chía y col., 2009; Srey, Jahid y Ha, 2013; Dantas y col., 2018). La adhesión de bacterias a una superficie está influenciada por una serie de factores fisicoquímicos como la composición de la superficie, la rugosidad (topografía), el área de contacto carga e hidrofobicidad tanto de la superficie como de las células, así como características del sustrato y condiciones ambientales (Tresse y col., 2007; Van Houdt y Michiels, 2010; Nguyen, Yang y Yuk, 2014; Iliadis y col., 2019). Las superficies sólidas pueden tener varias características que son importantes en el proceso de adhesión, Characklis y colaboradores (1973) observaron que la cantidad bacterias adheridas parece aumentar a medida que aumenta la rugosidad de la superficie, esto coincide con los resultados obtenidos ya que el material donde hubo mayor FB fue el plástico, luego

acero inoxidable y finalmente vidrio, y su rugosidad se presenta en el mismo orden, siendo el plástico (tabla para picar) el más rugoso y el vidrio el más liso.

Estudios confirman que los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas no polares como el plástico que a los materiales hidrófilos como el vidrio o los metales (Donlan, 2002; Chia y col., 2009) ya que la mayoría de las superficies bacterianas tienen carga negativa pero aún contienen componentes superficiales hidrófobos (Rosenberg y Kjelleberg, 1986). Sinde y Carballo (2000) y Joseph y colaboradores (2001) quienes evaluaron la capacidad de adhesión a diferentes materiales de cepas de *S. enterica* sugirieron que esta bacteria tiende a adherirse en mayor medida a materiales hidrofóbicos que superficies hidrofílicas y por lo tanto podría haber una mayor FB, lo que coincide con nuestros resultados obtenidos, y con los datos de Stepanovic y colaboradores (2004) quienes evaluaron la capacidad de FB de cepas de *S. enterica* con el mismo procedimiento y encontraron una cantidad elevada de biopelículas en superficies plásticas. También Dantas y colaboradores (2018) estudiaron la FB de *S. Enteritidis* en superficies de madera, plástico y vidrio, observando una mayor FB en madera y plástico comparado con el vidrio, y los resultados demostraron que el vidrio es la superficie de contacto con alimentos preferida debido a su superficie lisa y propiedades resistentes a la corrosión. Sin embargo, en otro estudio realizado Chia y colaboradores (2009) evaluaron la capacidad de adhesión de diferentes cepas, y encontraron que *S. enterica* se adhiere mejor al teflón, seguido del acero inoxidable y el vidrio, luego el nitrilo Buna-N y por último al poliuretano lo que sugiere que la adhesión de *S. enterica* además de ser dependiente de la cepa, hay varios factores fisicoquímicos y biológicos que están implicados, y para comprender mejor el proceso de unión, es necesario investigar estructuras como las proteínas de la pared celular, así como las fimbrias y los flagelos.

En las biopelículas las bacterias controlan su propia densidad de población (Daniels y Michiels, 2004) ya que son entidades dinámicas que cambian con el tiempo a medida que cambia la situación con los nutrientes; es decir, cuando las biopelículas cuentan con una gran población se encuentra con una disponibilidad limitada de los

nutrientes, por lo cual comienza el proceso de *quorum sensing* (Ćirić y col., 2018). Este proceso puede explicar porque en algunas cepas con el tiempo cambia la concentración de células (aumento y posterior disminución), ya que es posible que lleguen a una concentración crítica y las bacterias tengan que abandonar la biopelícula sin necesidad de que esta desaparezca.

A su vez, la superficie celular bacteriana también juega un rol esencial en el proceso de adhesión ya que sus propiedades fisicoquímicas y estructurales como la carga superficial, estructuras como flagelos, fimbrias, pili, curli, lipopolisacáridos de superficie, etc., pueden ser diferentes entre cepas (Li y McLandsborough, 1999; Van Houdt y Michiels, 2010). Los flagelos y las fimbrias (apéndices no flagelares) pueden afectar la adherencia y la formación de biopelículas a través de diferentes mecanismos según el tipo de bacteria (Li y McLandsborough, 1999; Bishop y col., 2008; Van Houdt, y Michiels, 2010).

Estas propiedades pueden variar entre especies, serotipos o cepas, en influir la FB tal como se muestra en los resultados, y puede cambiar con la variación de factores ambientales como la temperatura o el pH, y la composición del medio o sustrato, que puede afectar la expresión de genes para producir estas estructuras (Li y McLandsborough, 1999; Bishop y col., 2008; Van Houdt y Michiels, 2010).

Finalmente, se observó en este estudio, como en otros, que no existe una relación entre CB y CP (Chae y Schraft, 2000; Pan, Breidt y Gorski, 2010; Simões, Simões y Vieira, 2010;), lo que sugiere que la cantidad de bacterias embebidas no determina la cantidad de matriz polimérica que pueden producir, si no que puede ir más relacionado con su capacidad de FB.

## **7. CONCLUSIONES**

Los habitantes de la zona centro de México, en el entorno doméstico emplean con frecuencia prácticas durante el almacenamiento y preparación de alimentos, que resultan inseguras. La mayoría de las prácticas inseguras observadas en este estudio están asociadas con un inadecuado almacenamiento y un incorrecto uso de instrumentos de cocina. Por lo tanto, es importante crear programas educativos para

mejorar las conductas de manipulación de alimentos de los consumidores en el entorno doméstico y reducir el riesgo de contraer ETAs.

La capacidad de *S. enterica* para formar biopelículas es variable entre las diferentes cepas aisladas de pollo.

La MN del pollo tiene una alta capacidad para formar biopelículas, sin embargo, en conjunto con algunas cepas de *S. enterica* producen una menor cantidad de polímeros en comparación cuando se encuentra sin estas.

Las cepas de *S. entérica* demostraron tener mayor capacidad de formación de biopelículas en el plástico respecto al acero inoxidable y vidrio.

Dirección General de Bibliotecas de la UNQ

## BIBLIOGRAFÍA

**Ackermann**, M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, **2015** 13:497–508,2015

**Adelantado-Faura**,C., Arosema-Angulo, L., Angeles-Calvo, M., Manteca-Masdeu, L., Ordóñez-Ordóñez,G., Ponsa-Musarra, F., Pontes-Pontes, M. y Zekaria, D. Un patógeno con historia. En: La *Salmonella*, de actualidad desde siempre. Primer Edición. Editorial Real Escuela de Avicultura. España, **2008**:6-11.

**Adetunji**, V. O., y Isola, T. O. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. *Global Veterinarian*, **2011**; vol. 6 (1).

**Althouse**, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., y Isaacson, R. E. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*, **2003**; vol. 71(11): 6446–6452.

**Arslan**, S. y Eyi, A. Occurrence and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Species in Retail Meat Products. *Journal of Food Protection*, **2010**; vol. 3(9): 1613–1617.

**Barker** , J., Naeeni, M., Bloofield, S. L. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *Journal of Applied Microbiology*, **2003**; vol. 95:1351–1360.

**Barreto**, M., Castillo-Ruiz, M. y Retamal, P. *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Infectología al día*, **2016**; vol 33(5):547-557.

**Berghaus**, R. D., Thayer, S. G., Law, B. F., Mild, R. M., Hofacre, C. L., y Singer, R. S. Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in Environmental Farm Samples and Processing Plant Carcass Rinses from Commercial Broiler Chicken Flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, **2013**; vol. 79 (13): 4106–4114.

**Beshiru**, A., Igbinosa, I. H., y Igbinosa, E. O. Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains isolated from ready-to-eat shrimps. PLOS ONE, **2018**; vol.13 (9): 1-22.

**Bhunja**, A. K. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. New York: Springer, **2008**: 201-215.

**Bishop**, A., House, D., Perkins, T., Baker, S., Kingsley, R. A., y Dougan, G. Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. Microbiology, **2008**; vol.154 (7), 1914–1926.

**Burmolle**, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sorensen, S. J. y Kjelleberg, S. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. Applied and Environmental Microbiology, **2006**; vol. 72 (6): 3916–3923.

**Campbell**, J. V., Mohle-Boetani, J., Reporter, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. The Journal of Infectious Diseases, **2001**; vol., 183 (6): 984–987

**Carrasco** E, Morales-Rueda y Garcí'a-Gimeno, R.M. Crosscontamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Food Research International **2012**; vol. 45:545–556.

**Chae**, M. S. y Schraft, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. International Journal of Food Microbiology, **2000**; vol- 62 (1-2), 103–111.

**Characklis**, W.G. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. Water Res **1973**; vol. 7:1249–58

**Chia**, T., Goulter, R., McMeekin, T., Dykes, G., y Fegan, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. Food Microbiology, **2009**; vol. 26 (8), 853-859.

**Chmielewski**, R. A. N. y Frank, J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2003**; vol.2 (1): 22–32.

**Ćirić**, A. D., Petrović, J. D., Glamočlija, J. M., Smiljković, M. S., Nikolić, M. M., Stojković, D. S., y Soković, M. D. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*, **2019**; vol. 120:65-80

**CMC** (Consejo Mexicano de la Carne. Compendio estadístico 2019. [monografía en internet]. México:CMC, **2019**. [consultado 2020 octubre 18]. Disponible en: [https://comecarne.org/wp-content/uploads/2020/07/Compendio\\_Estad%C3%ADstico\\_2019\\_-\\_Comecarne.pdf](https://comecarne.org/wp-content/uploads/2020/07/Compendio_Estad%C3%ADstico_2019_-_Comecarne.pdf)

**COFEPRIS**. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). [monografía en internet]. Aguascalientes, México: COFEPRIS, 2015. [consultado 2019 agosto 22]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334653/11\\_ETAS-Ma\\_Eugenia\\_Jim\\_nez-DGE.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334653/11_ETAS-Ma_Eugenia_Jim_nez-DGE.pdf).

**Cogan**, T.A, Bloomfield, S.F., Humphrey, T.J. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology*, **1999**; vol. 29:354–358.

**Conrad**, J. C. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Research in Microbiology*, **2012**; vol.163 (9-10): 619–629.

**Corpe**, W., A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: Bitton G, Marshall KC, editors. *Adsorption of microorganisms to surfaces*. New York: John Wiley & Sons; **1980**; vol.105–44.

**Daniels**, R., Vanderleyden, J., y Michiels, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **2004**; vol. 2 (3), 261–289.

**Dantas**, S. T. A., Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C. R., Castilho, I. G., Hernandez, R. T., Fernandes, A., y Rall, V. L. M. Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. *Foodborne Pathogens and Disease*, **2018**; vol.15 (2): 81–85.

**Davey**, M.E. y O'Toole, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2000**; vol. 64 (4):847-867.

**Dawoud**, T. M., Shi, Z., Kwon, Y. M., y Ricke, S. C. Overview of Salmonellosis and Food-borne *Salmonella*. *Producing Safe Eggs*, **2017**; 113–138.

**Dias**, M. R., Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Lanna, F. G. P. A., Pinto, P. S. de A., Bersot, L. dos S., y Nero, L. A. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. *Journal of Food Science and Technology*, **2015**; vol. 53 (2): 1084–1091.

**Díez-García**, M., Capita, R., y Alonso-Calleja, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, **2012**; vol; 31(2).

**Donlan**, R. MBiofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **2002**; vol. 8 (9), 881–890.

**European Council**. Directive 89/108/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Quick-Frozen Foodstuffs for Human Consumption. **1989**. OJ L 40/34.

**European Parliament and Council**. Regulation (EC) No 853/2004 Laying Down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin. **2004b** L 226/22

**Frank**, J. F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*, **2001**; vol.: 319–370.

**GE**. Refrigeradores Side-by-Side de Doble Evaporador con Controles de Tacto Electrónicos. [monografía en internet]. General Electric. **2004**. [consultado 2020 diciembre 21]. Disponible en:

[https://visualizador.serviplus.com.mx/datos\\_pt/refr/manuales/MANUAL\\_DE SERVICIO DUAL EVAP.pdf](https://visualizador.serviplus.com.mx/datos_pt/refr/manuales/MANUAL_DE_SERVICIO_DUAL_EVAP.pdf)

**Gkana**, E., Lianou, A., y Nychas, G.-J. E. Transfer of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Beef to Tomato through Kitchen Equipment and the Efficacy of Intermediate Decontamination Procedures. *Journal of Food Protection*, **2016**; vol. 79 (7): 1252–1258.

**Godínez-Oviedo**, A., Sampedro-Parra, F., Machuca-Vergara, J. J., Gutiérrez-González, P. y Hernández-Iturriaga, M. Food Consumer Behavior and *Salmonella* Exposure Self-Perception in the Central Region of Mexico. *Journal of Food Science*, **2019**, (paper accepted).

**Gonçalves-Tenório**, A., Silva, B., Rodrigues, V., Cadavez, V., y Gonzales-Barron, U. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. *Foods*, **2018**; vol. 7 (5):69

**Gong**, J., Wang, C., Shi, S. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Indiana clinical isolates recovered from broilers and poultry workers with diarrhea in China. *Antimicrob Agents Chemother*, **2016**; vol. 60:1943-1947.

**Gonzalez-Fernandez**, Fernandez Mastache, E., y Lorenzo Abalde, S. Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, **2005**; vol. 9 (33): 2162–2173.

**Guo**, X., Chen, J., Brackett, R. E., y Beuchat, L. R.. Survival of *salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**; vol. 67(10): 4760–4764.

**Haiko**, J., y Westerlund-Wikström, B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology*, **2013**; vol. 2 (4):1242–1267.

**Hamidi**, A., Irsigler, H., Jaeger, D., Muschaller, A., y Fries, R. Quantification of water as a potential risk factor for cross-contamination with *Salmonella*, *Campylobacter* and *Listeria* in a poultry abattoir. *British Poultry Science*, **2014**; vol. 55 (5): 585–591.

**Han**, N., Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., y Ha, S.-D. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control*, **2016**; vol. 70:161–166.

**Henry**, I., Granier, S., Courtillon, C., Lalande, F., Chemaly, M., Salvat, G., y Cardinale, E. *Salmonella entérica* subsp. *entérica* isolated from chicken carcasses and environment at slaughter in Reunion Island: prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility. *Tropical Animal Health and Production*, **2012**; vol. 45 (1), 317–326.

**Hillers**, V. N., Medeiros, L., Kendall, P., Chen, G., y DiMascola, S. Consumer food-handling behaviors associated with prevention of 13 foodborne illnesses. *Journal of Food Protection*, **2003**; vol. 66 (10): 1893–1899.

**Hood**, S. K. y Zottola, E. A. Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* Cells to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, **1997**; vol.60 (9):1034

**Iannetti**, L., Neri, D., Santarelli, G. A., Cotturone, G., Podaliri Vulpiani, M., Salini, R. y Messori, S.). Animal welfare and microbiological safety of poultry meat: Impact of different at-farm animal welfare levels on at-slaughterhouse *Campylobacter* and *Salmonella* contamination. *Food Control*, **2020**; vol.109:106921.

**Iliadis**, I., Daskalopoulou, A., Simoes, M. y Giaouris, E. Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*, **2018**; vol. 107: 10-18.

**Iñiguez-Moreno**, M., Gutiérrez-Lomelí, M., y Avila-Novoa, M. G. Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. *International Journal of Food Microbiology*, **2019**; vol. 303: 32-41

**Jain, S.**, y Chen, J.. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *Journal of Food Protection*, **2007**; vol;70 (11), 2473–2479.

**James, S. J.**, J. Evans, y C. James. A review of the performance of domestic refrigerators. *J. Food Eng.* **2008**; vol.87:2–10

**Jia, Z.**, Peng, Y., Yan, X., Zhang, Z., Fang, T. y Li, C. One-step kinetic analysis of competitive growth of *Salmonella* spp. and background flora in ground chicken. *Food Control*, (**2020**).

**Joseph, B.**, Otta, S. K., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, **2001**; vol. 64 (3):367–372.

**Kennedy, M.**, Villar, R., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Farley, M. M., Pass, M. Hospitalizations and Deaths Due to *Salmonella* Infections. *Clinical Infectious Diseases*, **2004.**, vol., 38(s3): S142–S148.

**Kimura, A. C.**, Reddy, V., Marcus, R., Cieslak, P. R., Mohle-Boetani, J. C., Kassenborg, H. D. Chicken Consumption Is a Newly Identified Risk Factor for Sporadic *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Infections in the United States: A Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, **2004**; vol. 38(s3): S244–S252.

**Klerks, M. M.**, Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C., y van Bruggen, A. H. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant–microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal*, **2007**; vol.1 (7): 620–631.

**Kurtz, J. R.**, Goggins, J. A., y McLachlan, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters*, **2017**; vol:190, 42–50.

**Lambertini, E.**, Ruzante, J., Chew, R., Apodaca, V. L. y Kowalcyk, B. B. The Public Health Impact of Different Microbiological Criteria Approaches for *Salmonella* in Chicken Parts. *Microbial Risk Analysis*, **2019**; vol.12: 44-59.

**Lando**, A., y Fein, S. Consumer decisions on storage of packaged foods. *Food Prot. Trends*, **2007**; vol. 27:307–313.

**Lapointe**, C., Deschênes, L., Ells, T. C., Bisailon, Y., y Savard, T. Interactions between spoilage bacteria in tri-species biofilms developed under simulated meat processing conditions. *Food Microbiology*, **2019**.

**Larock**, D. L., Chaudhary, A., y Miller, S. I. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, **2015**; vol.13 (4): 191–205.

**Li**, J., y McLandsborough, L. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology*, **1999**; vol. 53 (2-3), 185–193.

**Lianou**, A. y Koutsoumanis, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **2012**; vol 160 (2):171–178.

**Löfström**, C., Hansen, T., Maurischat, S., y Malorny, B. *Salmonella*: Salmonellosis. *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**; 701–705.

**López-Atl**., K.J., *The Food Lab: How to Organize Your Refrigerator for Better Food Storage*. [monografía en internet]. United States of America. **2004**. [consultado 2020 diciembre 21. Disponible en: <https://www.seriousseats.com/2017/07/how-to-organize-refrigerator-efficient-safe-food-storage.html>]

**Macías-Rodríguez**, M. E., Navarro-Hidalgo, V., Linares-Morales, J. R., Olea-Rodríguez, M. A., Villarruel-López, A., Castro-Rosas, J. y Torres-Vitela, M. R. Microbiological Safety of Domestic Refrigerators and the Dishcloths Used To Clean Them in Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Journal of Food Protection*, **2013**; vol. 76 (6): 984–990.

**Mahon**, B. E., Ponka, A., Hall, W. N., Komatsu, K., Dietrich, S. E., Siitonen, A., *et al.* An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997; vol.175 (4): 876–882.

**Majdalani**, N., y **Gottesman**, S. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, **2005**, vol. 59: 379–405.

**Majowicz**, S.E., **Musto**, J., **Scallan**, E., **Angulo**, F.J., **Kirk**, M., **O'Brien**, S.J., **Jones**, T.F., **Fazil**, A. y **Hoekstra**, R.M. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Food Safety*, **2010**; vol. 50:882-889.

**Majumdar**, A., **Pradhan**, N., **Sadasivan**, J., **Acharya**, A., **Ojha**, N., **Babu**, S. y **Bose**, S. Food Degradation and Foodborne Diseases: A Microbial Approach. Microbial Contamination and Food Degradation. 1er edición. **2018**; 109–148.

**Mattick**, J. S. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, **2002**; vol.56(1): 289–314.

**Merino**, L., **Procura**, F., **Trejo**, F.M., **Bueno**, D.J. y **Golowczyc**, M. A. Biofilm formation by *Salmonella* spp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research*, **2019**; vol. 119:530-540

**Michaels**, B., **Ayers**, T., **Celis**, M. y **Gangar**, V. Inactivation of refrigerator biofilm bacteria for application in the food service environment. *Food Service Technology*, **2001**; vol.,(3-4), 169–179.

**Moller**, C. O. A., **Aabo**, S., **Christensen**, B. B., **Dalgaard**, P., y **Hansen**, T. B. Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork – A predictive microbiology approach. *Food Microbiology*, **2013**; 34(2), 284–295.

**Nilsson**, R.E., **Ross**, T., **Bowman**, J.P., Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **2011**. Vol. 150, 14–24.

**Ofek** I, **Doyle** RJ. Bacterial adhesion to cells and tissues. In: **Ofek** I, **Doyle** RJ, editors. New York: Chapman & Hall; 1994

**OMS**. Enfermedades transmitidas por alimentos. [monografía en internet]. Estados Unidos de América: Washington, Dc: Organización Mundial de la Salud, 2019. [consultado 2019 agosto 23]. Disponible en:

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es)

**OMS.** Estimates of the global burden of foodborne diseases. [monografía en internet]. Geneva, Switzerland: Organización Mundial de la Salud, 2015. [consultado 2019 agosto 22]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/infographics\\_combined\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/infographics_combined_en.pdf?ua=1).

**Oscar, T. P.** Initial Contamination of Chicken Parts with *Salmonella* at Retail and Cross-Contamination of Cooked Chicken with *Salmonella* from Raw Chicken during Meal Preparation. *Journal of Food Protection*, **2013**; vol. 76(1): 33–39.

**Oscar, T. P.** Validation of a Tertiary Model for Predicting Variation of *Salmonella* Typhimurium DT104 (ATCC 700408) Growth from a Low Initial Density on Ground Chicken Breast Meat with a Competitive Microflora. *Journal of Food Protection*, **2006**; vol. 69(9), 2048–2057.

**Pan, Y., Breidt, F., y Gorski, L.** Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **2010**; vol. 76(5), 1433–1441.

**Pouillot, R., Lubran, M. B., Cates, S., C., Dennis, S.** Estimating parametric distributions of storage time and temperature of ready-to-eat food for U.S. households. *Journal of Food Protection*, **2010**; vol. 73:312–321.

**Procura, F., Bueno, D. J., Bruno, S. B. y Rogé, A. D.** Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of methods for the isolation of *salmonella* in chicken liver from Argentina. *Food Research International*, **2017**; vol. 119:541-546.

**Prouty, A. M., y Gunn, J. S.** Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, **2003**; 71(12): 7154–7158.

**Redmond, E. C. y Griffith, C. J.** Consumer Food Handling in the Home: A Review of Food Safety Studies. *Journal of Food Protection*, **2003**; vol. 66(1): 130–161.

**Ricke**, S. C. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella enteritidis* colonization in molting hens. Poultry Science, **2003**; vol. 82(6): 1003–1007.

**Rosenberg** M. y Kjelleberg S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology 1986; vol. 9:353–93.

Rostagno, M. H. Can Stress in Farm Animals Increase Food Safety Risk? Foodborne Pathogens and Disease, **2009**; vol. 6 (7):767–776.

**Ryan**, M. J., P. G. Wall, R. J. Gilbert, M. Griyn, B. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. Commun. Dis. Rep. CDR Rev. **1996**; vol. 6:179–182.

**Sánchez-Jiménez**, M. M. y Cardona Castro, N. M. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Infectio: Revista de La Asociación Colombiana de Infectología, 2003; vol., 7 (1): 23–29.

**Simões**, L. C., Simões, M., y Vieira, M. J. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, **2010**; vol. 98(3), 317–329.

**Sinde**, E., y Carballo, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology, **2000**; vol. 17 (4), 439–447.

**Soares**, V.M, Pereira J.G., Viana, C., Izidoro, T.B., Bersot, L.S. Y Pinto, J.P.A.N. Transfer of *Salmonella Enteritidis* to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. Food Microbiology, **2012**; vol. 30:453–456.

**Solano**, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M. y Gamazo, C. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. Molecular Microbiology, **2002**; 43 (3):793–808.

**Srey**, S., Kabir-Jahid, I. y Ha, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food control, **2013**; vol. 31:572-585.

**SSA (Secretaría de Salud).** Boletín Epidemiológico. [monografía en internet]. México, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), 2019. [consultado 2019 octubre 02]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMANAL\\_52.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMANAL_52.pdf)

**SSA (Secretaría de Salud).** Boletín Epidemiológico. [monografía en internet]. México, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), 2020. [consultado 2020 enero 04]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/604098/Boletin\\_2020\\_SE52.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/604098/Boletin_2020_SE52.pdf)

**Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. y Keersmaecker, S.** *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International, **2012**; vol. 45: 502-531.

**Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. y Svabic-Vlahovic, M.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, **2004**; 38 (5), 428-432.

**Tan, S. M., Lee, S. M. y Dykes, G. A.** Fat contributes to the buffering capacity of chicken skin and meat but enhances the vulnerability of attached *Salmonella* cells to acetic acid treatment. Food Research International, **2014**; vol. 66: 417-423.

**Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M. y Midelet-Bourdin, G.** Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. J. Food Prot, **2007**; vol. 70, 1569-1578.

**Tsolis, R. M., Young, G. M., Solnick, J. V., y Baumler, A. J.** From bench to bedside: Stealth of enteroinvasive pathogens. Nature Reviews. Microbiology, **2008**; vol. 6 (12): 883-892.

**Ünüvar, S.** Microbial Foodborne Diseases. En: Foodborne Diseases, Handbook of Foodbioengineering . 1er. edición. Editorial Academic Press. Turquía: Malatya. **2018**: 1-31.

**Urdaneta, V. y Casadesús, J.** Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. Frontiers in Medicine, **2017**; 4.

**USDA.** Refrigeration and Food Safety. [monografía en internet]. United States of America. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, **2015**. [consultado 2020 diciembre 14]. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/refrigeration-and-food-safety/ct\\_index](https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/refrigeration-and-food-safety/ct_index)

**Van Houdt,** R., y Michiels, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 2010; Vol.109 (4), 1117–1131.

**Wigley,** P.Y Barrow, P. *Salmonella* in Preharvest Chickens. Producing Safe Eggs. 1er. Edición. 2017; 139–159.

**Wu,** D., Alali, W. Q., Harrison, M. A. y Hofacre, C. L. Prevalence of *Salmonella* in Neck Skin and Bone of Chickens. *Journal of Food Protection*, **2014**; vol. 77 (7): 1193–1197.

**Yang,** X., Huang, J., Zhang, Y., Liu, S., Chen, L., Xiao, C. y Wu, Q. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. *Science of The Total Environment*, **2020**;136385.

**Zaidi,** M.B., López-Macías, C. y Calva, E. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revisa Latinoamericana de Microbiología*. **2006**; Vol 48 (2):121-125

## ANEXOS

### Anexo I. Encuesta de hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa



**Hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa**

Esta encuesta tiene como finalidad recaudar información sobre hábitos de manipulación, almacenamiento y preparación de pollo en casa para el desarrollo de una investigación en el área de inocuidad de alimentos.

**\*Obligatorio**

Dirección de correo electrónico \*

Tu dirección de correo electrónico

Entidad Federativa \*

Elegir

Sexo \*

Femenino

Masculino

Edad (años) \*

<14

15 a 19

20 a 24

25 a 29

30 a 34

35 a 39

40 a 44

45 a 49

50 a 54

55 a 59

60 a 64

> 65

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

1. ¿Cuándo compras pollo, pides que le retiren la piel?.\*

- Sí
- No
- Me es indiferente

2. ¿A qué temperatura almacenas el pollo crudo antes de consumirlo?. (Puedes seleccionar más de una opción).\*

- Nunca lo almaceno, lo consumo el mismo día
- Refrigeración
- Congelación

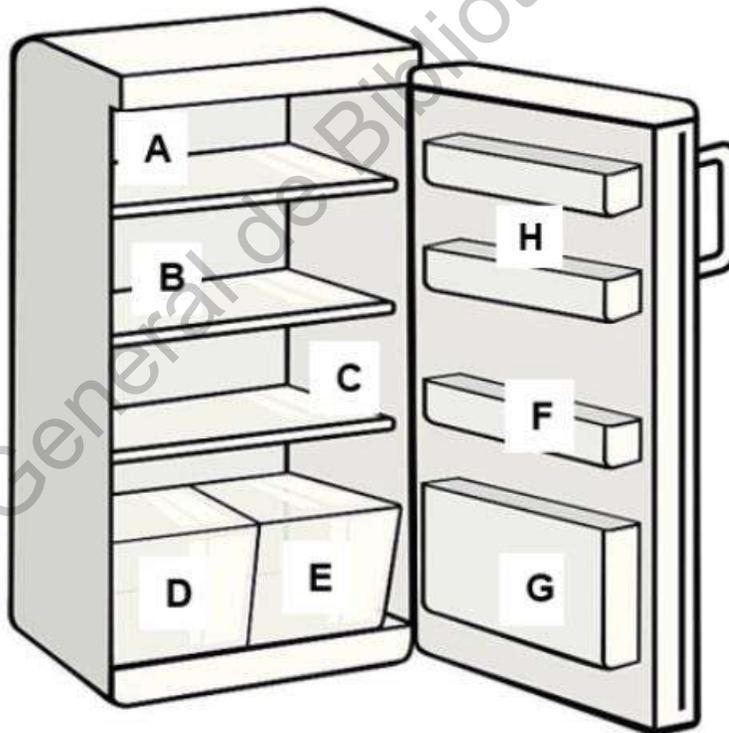
3. ¿En qué almacenas el pollo crudo?. (Puedes seleccionar más de una opción).\*

- No lo almaceno
- Bolsa
- Recipiente de plástico
- Recipiente de vidrio
- Otros: \_\_\_\_\_

4. Si almacenas el pollo crudo en refrigeración, ¿cuánto tiempo tardas en cocinarlo ?.

- Máximo un día
- De 2 a 3 días
- De 4 a 5 días
- Más de 5 días

5. En caso de almacenarlo, ¿en qué parte del refrigerador colocas el pollo crudo?.  
(Puedes seleccionar más de una opción).



- A (Congelación)
- B
- C
- D
- E
- F
- G
- H (Congelación)

6. ¿Sabes a qué temperatura se encuentra tu refrigerador? \*

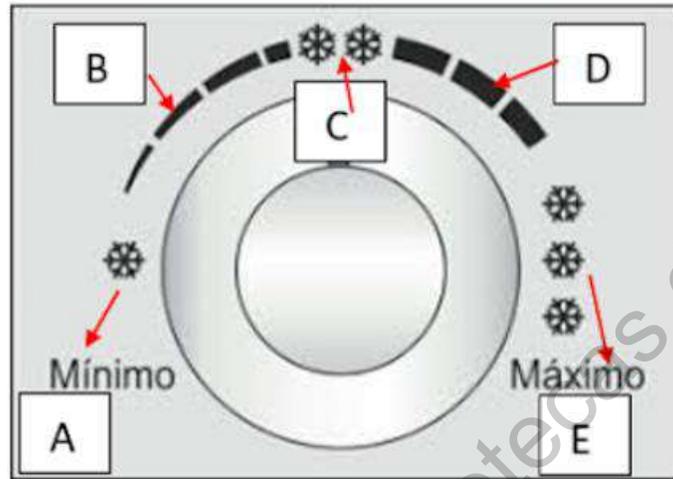
- Si
- No

7. Si contestaste "Si" en la pregunta anterior, escribe la temperatura de tu refrigerador en grados centígrados °C.

Tu respuesta

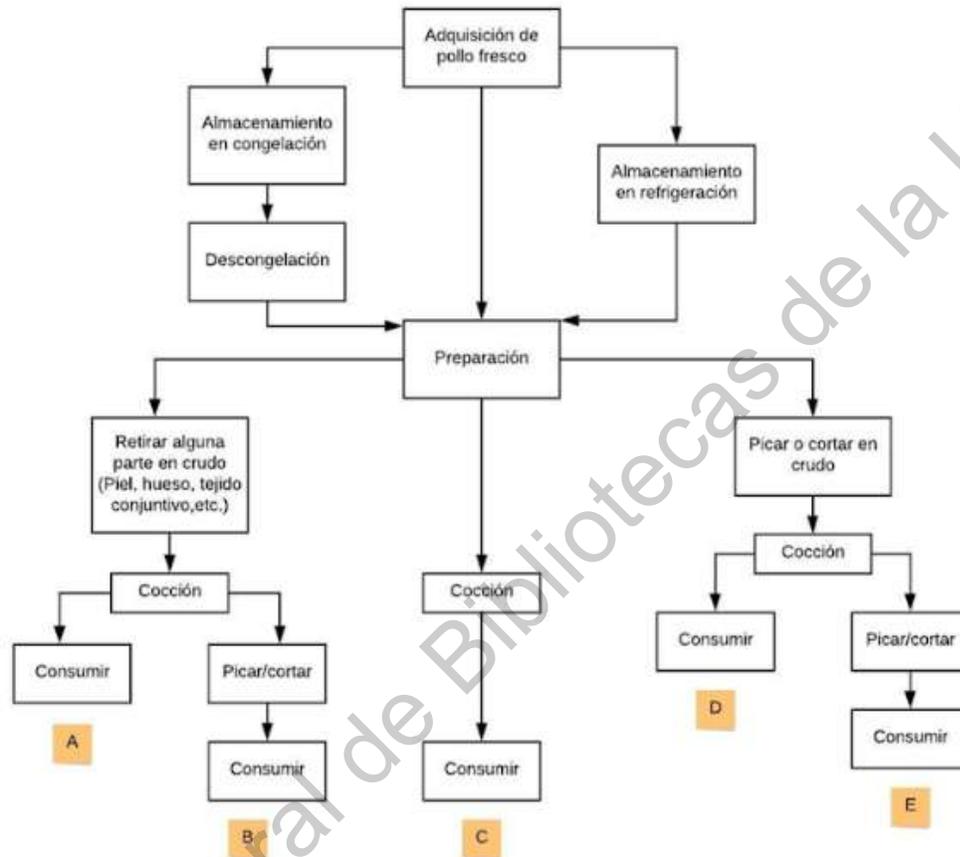
---

8. ¿En qué nivel de temperatura se encuentra ajustado tu refrigerador? Si el esquema no concuerda con el de tu refrigerador, selecciona el nivel entre el mínimo y el máximo que más se le parezca. \*



- A
- B
- C
- D
- E

9. Selecciona la o las rutas que sigues para la preparación de pollo (se puede seleccionar más de una opción) \*



- A
- B
- C
- D
- E

10. ¿Qué tipo de tablas de picar tienes en tu casa? (Se puede seleccionar más de una opción) \*

- Madera
- Plástico
- Vidrio
- Acero inoxidable
- Otros: \_\_\_\_\_

11. ¿Usas de manera indiferente las tablas de picar, o las clasificas de acuerdo al alimento que vas a picar? \*

- Solo tengo una tabla
- Uso indistintamente las tablas
- Clasifico las tablas de acuerdo al alimento

12. Si seleccionaste que las clasificas, ¿puedes decirnos como?.

Tu respuesta \_\_\_\_\_

13. ¿Sobre que superficies preparas (contener, picar, marinar) el pollo crudo en tu casa, antes de cocinar (se puede seleccionar más de una opción). \*

Madera

Plástico

Vidrio

Acero inoxidable

Cerámica

Otros: \_\_\_\_\_

14. Cuando quieres reducir el tamaño del pollo crudo previo a cocinar, ¿qué objeto utilizas?. \*

Cuchillo

Manos

Ambos

Otros: \_\_\_\_\_

15. Cuando empleas alguna superficie para colocar el pollo crudo (para contener, cortar, marinar, etc.), ¿qué tan frecuentemente usas la misma superficie para colocarlo ya cocido?. Nota: Tomar en cuenta que esta superficie puede ser previamente lavada o enjuagada antes de colocar nuevamente el pollo cocido. \*

- Nunca
- Rara vez (hasta dos veces de diez)
- Algunas veces (hasta cinco veces de diez)
- Frecuentemente (hasta siete veces de diez)
- Casi siempre (hasta nueve de diez veces)
- Siempre

16. Si usas la misma superficie para colocar el pollo cocido y crudo, ¿qué haces?.

\*

- La lavo con agua y jabón
- La enjuago únicamente con agua
- Nada
- No uso la misma superficie entre pollo crudo y cocido
- Otros: \_\_\_\_\_

17. Cuando empleas una tabla para picar o retirar alguna parte del pollo crudo, y la utilizas posteriormente para picar vegetales, ¿qué haces?. \*

- Uso una tabla limpia
- La lavo en ese momento con agua y jabón
- La enjuago en ese momento únicamente con agua
- Uso el o la misma tabla sin lavar o enjuagar

18. Cuando empleas un cuchillo para picar o retirar alguna parte del pollo crudo, y lo utilizas posteriormente para picar vegetales, ¿qué haces?. \*

- Uso un cuchillo limpio
- Lo lavo en ese momento con agua y jabón
- Lo enjuago en ese momento únicamente con agua
- Uso el mismo cuchillo sin lavar o enjuagar

19. Una vez cocido el pollo, ¿lo almacenas?. (Puedes seleccionar más de una opción). \*

- Lo consumo el mismo día
- Lo almaceno de 1 a 2 días
- Lo almaceno de 3 a 4 días
- Lo almaceno por más de 5 días

20 Cuando llegas a almacenar el pollo cocido, ¿a qué temperatura lo haces?. \*

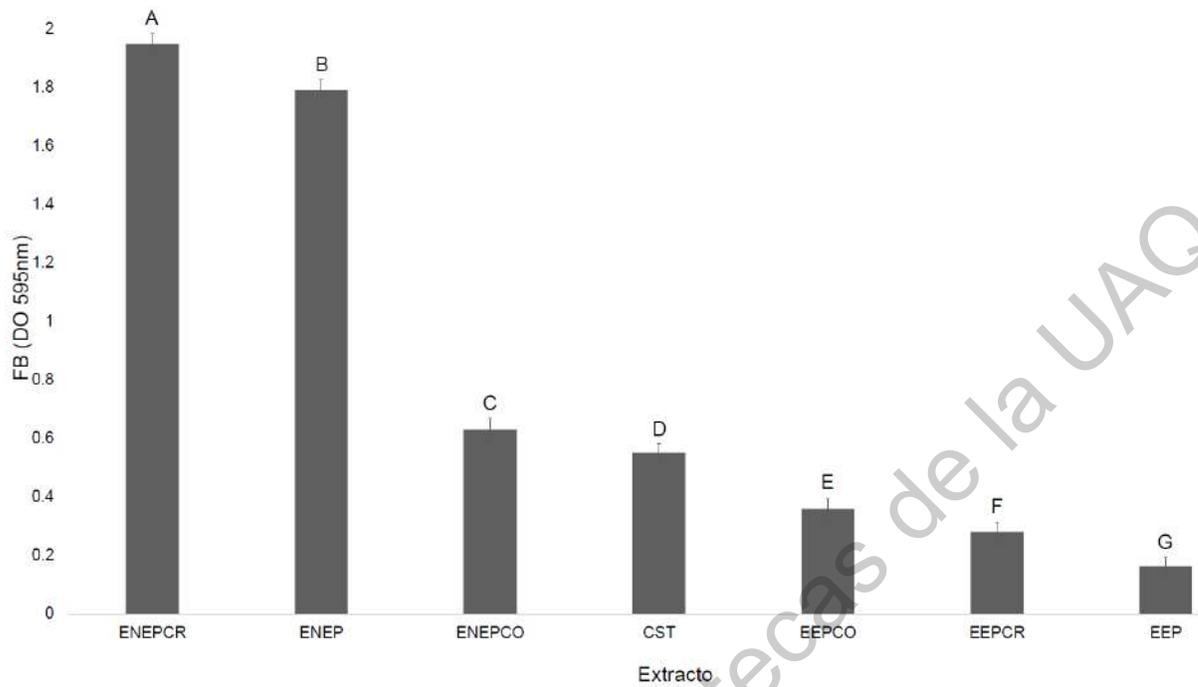
- Nunca lo almaceno
- Ambiente
- Refrigeración
- Congelación

21. Cuando llegas a almacenar el pollo cocido, ¿en que recipientes lo haces?.  
(Puedes seleccionar más de uno). \*

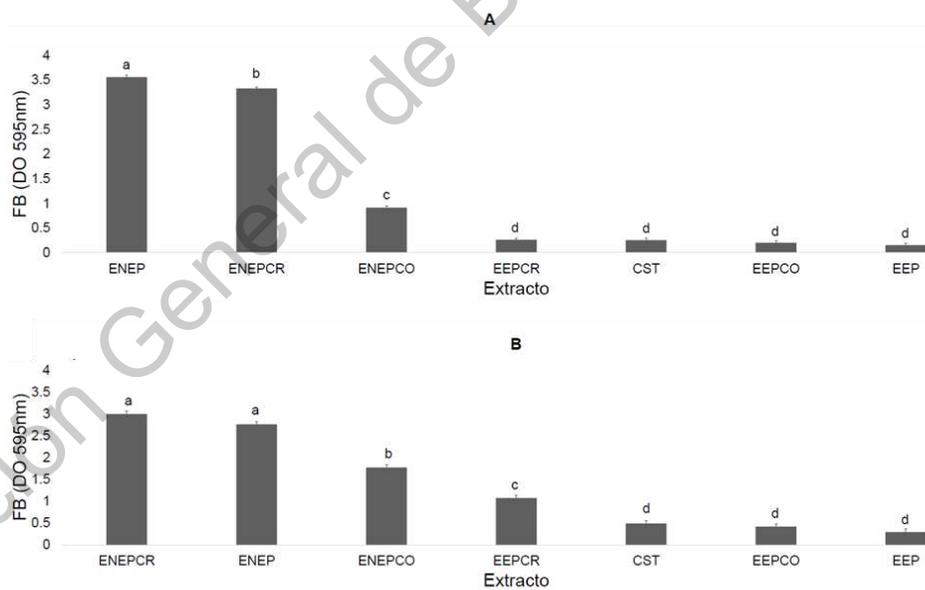
- Nunca lo almaceno
- Plástico
- Vidrio
- Cerámica
- Otros: \_\_\_\_\_

**Gracias**

Cualquier duda o aclaración contactarme al correo [peguerosa983@gmail.com](mailto:peguerosa983@gmail.com)  
Claudia Alejandra Pegueros Valencia. Estudiante de Ing. Química en Alimentos. UAQ



Anexo II. Formación de biopelículas de *S. enterica* en extractos de pollo almacenados a 25 °C durante tres días.



Anexo III. Formación de biopelículas de *S. enterica* en extractos de pollo a 9 y 14 °C. A= 14 °C, B= 9 °C.

Anexo IV. Prueba de Dunnett de la formación de biopelículas en diferentes extractos de pollo no estériles en ausencia y presencia de diferentes cepas de *S. enterica* 25 °C.

Extracto	Días	Cepa	ABS (LSD DIF)	P valor
ENEPCO	1	MN	-0.619	1.000
	1	AGO_S241R	1.858	<0.0001
	1	AGO_S247R	1.854	<0.0001
	1	AGO_S275R	1.864	<0.0001
	1	AGO_S319R	1.875	<0.0001
	1	AGO_S335R	1.880	<0.0001
	1	AGO_S336R	1.887	<0.0001
	1	AGO_S345R	1.869	<0.0001
	1	AGO_S389R	1.833	<0.0001
	1	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	1.658	<0.0001
ENEPCR	1	MN	-0.858	1.000
	1	AGO_S275R	-0.816	1.000
	1	AGO_S345R	-0.761	1.000
	1	AGO_S241R	-0.731	1.000
	1	AGO_S336R	-0.716	0.999
	1	AGO_S389R	-0.714	0.999
	1	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	-0.664	0.994
	1	AGO_S319R	-0.530	0.873
	1	AGO_S247R	-0.456	0.719
ENEP	1	MN	-0.386	1.000
	1	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	-0.289	0.988
	1	AGO_S345R	-0.110	0.271
	1	AGO_S241R	-0.043	0.103
	1	AGO_S247R	0.154	0.002
	1	AGO_S275R	0.145	0.003
	1	AGO_S319R	0.017	0.037
	1	AGO_S335R	0.031	0.029
	1	AGO_S336R	0.051	0.019
ENEPCO	2	MN	-1.212	1.000
	2	AGO_S241R	0.724	0.000

	2	AGO_S247R	0.982	<0.0001
	2	AGO_S275R	0.602	0.001
	2	AGO_S319R	0.960	<0.0001
	2	AGO_S335R	0.956	<0.0001
	2	AGO_S336R	1.003	<0.0001
	2	AGO_S345R	0.933	<0.0001
	2	AGO_S389R	0.609	0.001
	2	ATTC S. Typhimurium	0.556	0.001
ENEPCR	2	MN	-0.947	1.000
	2	ATTC S. Typhimurium	-0.780	0.999
	2	AGO_S241R	-0.275	0.278
	2	AGO_S336R	-0.212	0.196
	2	AGO_S345R	-0.130	0.120
	2	AGO_S389R	-0.123	0.115
	2	AGO_S275R	-0.116	0.110
	2	AGO_S335R	0.007	0.048
	2	AGO_S319R	0.011	0.046
	2	AGO_S247R	0.076	0.028
	3	MN	-1.527	1.000
	3	389R	-0.626	0.477
	3	ATTC S. Typhimurium	-0.585	0.426
	3	AGO_S241R	-0.287	0.162
	3	AGO_S247R	0.260	0.015
	3	AGO_S275R	0.116	0.029
	3	AGO_S319R	0.290	0.013
	3	AGO_S335R	0.709	0.001
	3	AGO_S336R	1.003	0.000
	3	AGO_S345R	0.506	0.004
ENEPCO	3	MN	-2.608	1.000
	3	ATTC S. Typhimurium	-2.163	1.000
	3	AGO_S247R	-1.683	0.933
	3	AGO_S241R	-1.680	0.931
	3	AGO_S319R	-1.660	0.922
	3	AGO_S335R	-1.634	0.910
	3	AGO_S389R	-1.599	0.892
	3	AGO_S275R	-1.520	0.844
	3	AGO_S345R	-1.482	0.818
	3	AGO_S336R	-1.356	0.724
ENEPCR	3	ATTC S. Typhimurium	-1.645	0.999
ENEP	3	ATTC S. Typhimurium	-1.645	0.999

3	AGO_S389R	-1.970	.
3	MN	-1.990	1.000
3	AGO_S247R	-1.945	.
3	AGO_S336R	-1.880	1.000
3	AGO_S319R	-1.821	1.000
3	AGO_S275R	-1.711	1.000
3	AGO_S241R	-1.686	1.000
3	AGO_S345R	-1.494	0.988
3	AGO_S335R	-1.309	0.925

Anexo V. Prueba de Dunnett de la formación de biopelículas en diferentes extractos de pollo no estériles en ausencia y presencia de diferentes cepas de *S. enterica* a 14 y 9 °C.

Temperatura °C	Extracto	Días	Cepa	ABS (LSD DIF)	p-Valor
14	ENEPCO	5	MN	-1.63	1.000
		5	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	-1.61	.
		5	389R+	-1.50	1.000
		5	AGO_S275	-0.99	0.857
		5	AGO_S241	-0.90	0.760
		5	AGO_S319	-0.62	0.420
		5	AGO_S345	-0.60	0.400
		5	AGO_S335	-0.55	0.349
		5	AGO_S336	-0.46	0.270
		5	AGO_S247	-0.38	0.205
	ENEPCR	5	MN	-2.81	1.000
		5	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	-2.76	.
		5	389R+	-2.59	1.000
		5	AGO_S345	-2.37	1.000
		5	AGO_S241	-2.37	1.000
		5	AGO_S335	-2.34	0.999
		5	AGO_S275	-2.28	0.998
		5	AGO_S336	-2.27	0.998
		5	AGO_S319	-2.26	0.998
	ENEPCO	5	AGO_S247	-1.82	0.915
ENEP	5	ATTC <i>S. Typhimurium</i>	-2.28	1.000	

		5	MN	-2.52	1.000
		5	AGO_S319	-2.17	1.000
		5	AGO_S389	-2.14	1.000
		5	AGO_S275	-2.09	0.999
		5	AGO_S345	-2.03	0.998
		5	AGO_S335	-1.98	0.996
		5	AGO_S241	-1.83	0.977
		5	AGO_S247	-1.64	0.915
		5	AGO_S336	-1.60	0.896
	ENEPCO	10	AGO_S389	1.17	0.000
		10	AGO_S345	1.07	0.000
		10	ATTC S. Typhimurium	0.65	0.000
		10	AGO_S247	0.47	0.001
		10	AGO_S335	-0.03	0.040
		10	AGO_S241	-0.06	0.076
		10	AGO_S336	-0.58	0.866
		10	AGO_S319	-0.82	1.000
		10	AGO_S275	-0.85	1.000
	10	MN	-0.94	1.000	
	ENEPCR	10	MN	-1.95	1.000
		10	AGO_S241	-1.72	1.000
		10	AGO_S319	-1.68	1.000
		10	AGO_S275	-1.65	1.000
		10	AGO_S389	-1.63	0.999
		10	AGO_S336	-1.62	0.999
		10	AGO_S335	-1.41	0.977
		10	ATTC S. Typhimurium	-1.39	0.972
		10	AGO_S345	-1.12	0.799
	ENEP	10	AGO_S247	-1.02	0.706
		10	AGO_S319	-1.51	0.978
		10	ATTC S. Typhimurium	-1.63	0.995
		10	AGO_S241	-1.65	0.997
		10	AGO_S389	-1.86	1.000
10		MN	-2.08	1.000	
10		AGO_S247	-2.07	.	
10		AGO_S335	-1.87	1.000	
10		AGO_S336	-1.86	1.000	
10	AGO_S345	-1.86	1.000		
10	AGO_S275	-1.69	0.998		

	ENEPCO	15	MN	-0.95	1.000
		15	AGO_S336R	-0.39	0.475
		15	ATTC S. Typhimurium	-0.23	0.216
		15	AGO_S241	-0.11	0.103
		15	AGO_S389	-0.01	0.052
		15	AGO_S335	0.08	0.028
		15	AGO_S275	0.05	0.036
		15	AGO_S345	0.13	0.018
		15	AGO_S247	0.13	0.020
		15	AGO_S319	0.23	0.008
	ENEPCR	15	MN	-1.45	1.000
		15	AGO_S389	-1.06	0.982
		15	ATTC S. Typhimurium	-0.51	0.375
		15	AGO_S319	-0.49	0.350
		15	AGO_S241	-0.46	0.315
		15	AGO_S336	-0.36	0.227
		15	AGO_S335	-0.29	0.170
		15	AGO_S275	-0.19	0.117
		15	AGO_S247	-0.09	0.075
		15	AGO_S345	0.33	0.009
	ENEP	15	AGO_S241	-0.55	0.584
		15	AGO_S389	-0.92	0.994
		15	AGO_S247	-0.99	0.999
		15	AGO_S275	-1.01	1.000
		15	ATTC S. Typhimurium	-1.08	1.000
		15	AGO_S336	-1.15	.
		15	MN	-1.19	1.000
		15	AGO_S335	-1.18	.
		15	AGO_S319	-1.05	1.000
		15	AGO_S345	-0.80	0.941
9	ENEPCR	5	MN	-0.76	1.000
	ENEPCO	5	AGO_S275	-0.62	1.000
		5	ATTC S. Typhimurium	-0.56	0.996
		5	AGO_S336	-0.55	0.994
		5	AGO_S389	-0.52	0.984
		5	AGO_S241	-0.49	0.955
		5	AGO_S345	-0.47	0.923
		5	AGO_S335	-0.45	0.886
		5	AGO_S247	-0.43	0.848

		5	AGO_S319	-0.42	0.814
	ENEPCR	5	MN	-1.60	1.000
		5	AGO_S389	-0.59	0.426
		5	ATTC S. Typhimurium	-0.56	0.397
		5	AGO_S275	-0.50	0.328
		5	AGO_S336	-0.42	0.260
		5	AGO_S345	-0.35	0.203
		5	AGO_S241	-0.29	0.160
		5	AGO_S335	-0.18	0.107
		5	AGO_S319	-0.16	0.099
		5	AGO_S247	-0.03	0.058
		ENEP	5	MN	-0.75
	5		ATTC S. Typhimurium	-0.51	0.976
	5		AGO_S389	-0.12	0.014
	5		AGO_S241	0.18	0.008
	5		AGO_S345	0.18	0.007
	5		AGO_S336	0.21	0.006
	5		AGO_S319	0.21	0.006
	5		AGO_S335	0.24	0.004
	5		AGO_S275	0.29	0.002
	5		AGO_S247	0.34	0.001
	ENEPCR	10	MN	-1.76	1.000
		10	AGO_S241	-1.07	0.915
		10	AGO_S345	-0.91	0.742
		10	AGO_S336	-0.62	0.398
		10	AGO_S335	-0.60	0.379
		10	AGO_S275	-0.45	0.251
		10	AGO_S389	-0.45	0.248
		10	ATTC S. Typhimurium	-0.43	0.233
		10	AGO_S247	-0.12	0.081
	ENEP	10	AGO_S319	-0.12	0.081
		10	ATTC S. Typhimurium	0.25	0.015
		10	AGO_S241	-0.23	0.132
		10	AGO_S345	-0.65	0.539
		10	AGO_S319	-0.67	0.562
		10	AGO_S389	-0.77	0.705
		10	AGO_S275	-0.81	0.755
		10	AGO_S335	-0.85	0.818
		10	AGO_S336	-0.92	0.888

		10	AGO_S247	-0.93	0.905
		10	MN	-1.55	1.000
	ENEPCO	15	AGO_S319	0.65	0.000
		15	AGO_S335	0.52	0.000
		15	AGO_S389	-0.35	0.948
		15	AGO_S241	-0.34	0.974
		15	AGO_S247	-0.41	1.000
		15	AGO_S275	-0.41	1.000
		15	AGO_S336	-0.46	1.000
		15	AGO_S345	-0.43	1.000
		15	MN	-0.50	1.000
		15	ATTC S. Typhimurium	-0.45	1.000
		ENEPCR	15	MN	-1.34
	15		AGO_S241	-1.00	0.998
	15		AGO_S336	-0.83	0.925
	15		AGO_S275	-0.60	0.589
	15		ATTC S. Typhimurium	-0.50	0.444
	15		AGO_S247	-0.49	0.423
	15		AGO_S345	-0.47	0.396
	15		AGO_S335	-0.43	0.350
	15		AGO_S389	0.19	0.017
	15		AGO_S319	0.32	0.008
	ENEP	15	AGO_S319	-0.82	.
		15	MN	-0.93	1.000
		15	AGO_S275	-0.78	1.000
		15	AGO_S335	-0.67	0.994
		15	AGO_S345	-0.66	0.990
15		AGO_S389	-0.66	0.989	
15		ATTC S. Typhimurium	-0.59	0.940	
15		AGO_S241	-0.47	0.712	
15		AGO_S247	-0.47	0.712	
15	AGO_S336	-0.25	0.260		