



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Interacción entre especies no patógenas del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes* en biopelículas y su relación con la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Q.F.B. Manuel Alejandro Vega Iturbe

Dirigido por

D.C. Montserrat Hernández Iturriaga

Santiago de Querétaro, Querétaro. Octubre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
TESIS

“Interacción entre especies no patógenas del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes* en biopelículas y su relación con la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio”

Presenta:

Q.F.B. Manuel Alejandro Vega Iturbe

Dirigido por:

D.C. Montserrat Hernández Iturriaga

Comité Revisor

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Secretario

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Vocal

Dra. Angélica Godínez Oviedo

Suplente

Dr. Andrés Cruz Hernández

Suplente

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

MANUEL ALEJANDRO VEGA ITURBE

A handwritten signature in black ink, consisting of the letters 'M-V-L' enclosed within a simple, hand-drawn oval shape.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora **Dra. Montserrat Hernández Iturriaga**, en un principio por la confianza depositada en mi para poder integrarme en su equipo de trabajo mediante el desarrollo de este proyecto. De igual manera, por todo el apoyo incondicional durante estos dos años, por la paciencia ante mi constante insistencia, por llevarme a explotar mis capacidades al máximo, por las lecciones otorgadas en pro de mi desarrollo profesional, por sus consejos y palabras de aliento en los días difíciles en el ámbito personal.

A la **Dra. Angélica Godínez Oviedo**, por las horas de trabajo en conjunto, todos los conocimientos compartidos, los consejos que me permitieron reenfocarme cuando era necesario y todas esas críticas constructivas otorgadas durante mi estancia en el laboratorio.

A la **Dra. Sofía María Arvizu Medrano**, al **Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez** y al **Dr. Andrés Cruz Hernández**, por todo el apoyo, tiempo y dedicación en la revisión del proyecto, desde su origen y durante el desarrollo del mismo. En las reuniones de avances, seminarios de resultados y en el resultado final; todas las aportaciones permitieron mejorarlo y enriquecerlo de manera importante.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para el desarrollo profesional durante mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro**, por abrirme las puertas e incitarme a salir de la zona de confort al explorar nuevas metodologías de enseñanza y aprendizaje respecto a lo experimentado previamente.

A la **Facultad de Química**, por ser mi lugar seguro durante esta aventura, resguardarme durante las jornadas de trabajo y cobijarme en aquellos días donde todo parecía ir mal.

Al equipo de **LECRIMA** por todas las enseñanzas y los buenos momentos compartidos.

DEDICATORIAS

A mis padres **Laura** y **Sergio**, por sus palabras de aliento en los días difíciles, por esas llamadas en la distancia que me permitían despejarme. Por su apoyo y amor incondicional; por impulsarme a dar lo mejor de mí durante esta aventura y darme ese empujón de confianza cuando el miedo me quiso atrapar. Sé que al contar con ustedes jamás habrá imposibles en mi camino.

A mis hermanas **Ilse** y **Selma** por escucharme, aconsejarme, y por todo el cariño otorgado. Son dos grandes tesoros para mí; me considero bendecido y afortunado de tenerlas conmigo. Hoy más que nunca sé que siempre estaremos unidos y fuertes. Agradezco también sus diferentes visitas durante mi estancia en la maestría, ya que nos permitieron coleccionar buenos momentos.

A mi schatzi **Paula Raesfeld** por toda la paciencia, respeto y amor compartido durante este tiempo. Por escucharme, cuidarme y alentarme a siempre seguir con paso firme seguro de lo que soy. Gracias por todos esos apapachos, y por el regalo de habernos encontrado.

A mis **Tíos, Tías** y **Primos** por siempre enviarme buenas vibras, echarme porras y desearme lo mejor en todos los proyectos que he desarrollado a lo largo de mi vida.

A mis amigos del laboratorio **José Eduardo** y la Sra. **Martha** gracias por todo el apoyo en la parte técnica y metodológica durante el desarrollo del proyecto. De igual manera, agradecer su amistad desde el primer día que siempre estuvo rodeada siempre de buenos consejos y palabras de aliento cuando me resultó necesario.

A mis **Amigos**: Aarón, Christian, José, Julián y mis **Amigas**: Anaid, Bárbara, Brenda, Emilia, Jimena y Lilia porque a pesar de la distancia, el tiempo y las responsabilidades, seguimos manteniendo el lazo fuerte, además de enriquecerlo siempre que tenemos la oportunidad de volvernos a encontrar; los quiero mucho.

A mis **Roomies**: Mariana y Jimena porque a pesar de esos momentos en que el estrés parecía consumirnos, siempre salimos a flote y logramos nuestros objetivos, creando un hogar funcional. Y finalmente a todos los nuevos **amigos de la Maestría**

RESUMEN

La persistencia de bacterias del género *Listeria* en ambientes de producción de alimentos se ha asociado a la formación de biopelículas en superficies inertes y a la resistencia a desinfectantes químicos. La información respecto a la interacción en biopelículas entre especies del género *Listeria* es escasa. Por ello, el objetivo de este proyecto fue evaluar la interacción (sinergismo/antagonismo) entre especies no patógenas del género *Listeria* con *L. monocytogenes* en biopelículas y determinar si ocurre el intercambio de genes asociados con la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio (QACs). Se identificaron cepas de *Listeria* spp (119) obtenidas durante dos años (2019 y 2021) en una planta procesadora de hortalizas congeladas mediante un PCR-Múltiplex. Las especies más presentes fueron *L. monocytogenes* (75) y *L. innocua* (20), seguidas de *L. ivanovii* (10), *L. grayi* (7), *L. welshimeri* (4) y *L. seeligeri* (3). Empleando la tinción con cristal violeta en microplaca se cuantificó la producción de biopelículas a 35 °C durante 72 h midiendo la densidad óptica (DO) a 595 nm y en base a la cantidad de biopolímeros producidos se clasificaron en nulo, débil, moderado y fuerte. A las 24 (63 %) y 48 (58 %) h la mayoría de las cepas se clasificaron como débiles y a las 72 h (48 %) como moderadamente formadoras de biopelícula. Se determinó la presencia de los genes *qacH* y *bcrABC* mediante PCR. El gen *qacH* estuvo ausente en las cepas, mientras que el gen *bcrABC* se detectó en el 46 % (55/119). Posteriormente, se seleccionaron cepas de *Listeria* spp. con diferentes niveles de producción de biopelículas portadoras del gen *bcrABC*, para hacer cultivos mixtos con *L. monocytogenes* ATCC 19115; los cultivos se incubaron a 35 °C/10 días y al final del almacenamiento se evaluó el cambio en las poblaciones, la producción de biopelículas y el intercambio de genes de resistencia a QACs. En cultivos mixtos la población y capacidad formadora de biopelículas de *L. monocytogenes* disminuyó. Tres cepas de *L. innocua* transfirieron el gen *bcrABC* a *L. monocytogenes*, aunque este no se expresó fenotípicamente tras su adquisición. El antagonismo ejercido por las cepas no patógenas sobre *L. monocytogenes* permitió su supervivencia.

Palabras clave: Biopelículas, interacciones microbianas, persistencia, resistencia a desinfectantes.

SUMMARY

The persistence of bacteria from *Listeria* genus in food production environments, has been associated with biofilm formation on inert surfaces and resistance to chemical disinfectants. Information regarding the interaction in biofilm between *Listeria* genus species is scarce. Therefore, the aim of this project was to evaluate the interaction (synergism/antagonism) between non-pathogenic species of *Listeria* genus and *L. monocytogenes* in biofilms and to determine if the exchange of genes associated with resistance to quaternary ammonium compounds (QACs) occurs. *Listeria* strains (119) obtained during two years (2019 and 2021) from a frozen vegetable processing plant were identified through a PCR-Multiplex. The most prevalent species were *L. monocytogenes* (75) and *L. innocua* (20), followed by *L. ivanovii* (10), *L. grayi* (7), *L. welshimeri* (4) and *L. seeligeri* (3). Employing the crystal violet on microtiter plate staining method biofilm production at 35 °C during 72 h was quantified by measurement of optical density (OD) at 595 nm and based on the quantity of biopolymers produced strains were classified as null, weak, moderate and strong. At 24 h (63 %) and 48 h (58 %) the majority of the strains were classified as weak and at 72 h (48 %) like moderate biofilm formers. The presence of *qacH* and *bcrABC* genes was determined by PCR. *qacH* gene was absent on the strains, meanwhile *bcrABC* gene was detected on the 46 % (55/119). Subsequently *Listeria* spp. strains with different levels of biofilm production carriers of *bcrABC* gene were selected to mixed cultures with *L. monocytogenes* ATCC 19115. The cultures were incubated at 35 °C/10 days. At the end of storage changes in populations, biofilm production and QACs resistance genes exchange were evaluated. In mixed cultures the population and biofilm formation capacity of *L. monocytogenes* was decreased. Three *L. innocua* strains transferred *bcrABC* gene to *L. monocytogenes*, though it not expressed phenotypically after the acquisition. The antagonism showed by non-pathogenic strains to *L. monocytogenes* allowed it survival.

Key words: biofilm, disinfectant resistance, microbial interaction, persistence.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alimentos listos para consumo.	3
2.1.1 Hortalizas congeladas	3
2.1.2 Procesamiento	4
2.1.3 Microbiología de Hortalizas	6
2.2 Género <i>Listeria</i>	7
2.2.1 Características del género <i>Listeria</i>	7
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.2.3 Factores de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.2.4 Listeriosis	9
2.2.5 Brotes de Listeriosis	12
2.2.6 Interacciones entre especies del género <i>Listeria</i>	13
2.3 Persistencia microbiana en la industria de los alimentos.	14
2.3.1 Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el entorno de producción de alimentos.....	14
2.3.2 Biopelículas.....	16
2.3.3 Mecanismos de formación de biopelículas	18
2.3.4 Interacciones microbianas en biopelículas	19
2.4 Control de <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria de alimentos.....	21

2.4.1	Desinfección.....	22
2.4.2	Principales desinfectantes empleados en la industria de los alimentos 24	
2.5	Resistencia a los desinfectantes.....	25
2.5.1	Mecanismo de resistencia a los desinfectantes.....	26
2.5.2	Bases moleculares de la resistencia a los desinfectantes	29
2.5.3	Resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> a los desinfectantes	32
3.	JUSTIFICACIÓN.....	34
4.	OBJETIVOS.....	35
4.1	Objetivo General.....	35
4.2	Objetivos Específicos	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1	Materiales y equipos.....	36
5.2	Métodos.....	39
6.	METODOLOGÍA.....	40
6.1	Identificación de especies del género <i>Listeria</i>	40
6.1.1	Activación de cepas de <i>Listeria</i>	40
6.1.2	Identificación de especies del género <i>Listeria</i>	40
6.2	Caracterización de cepas de <i>Listeria</i> spp.....	44
6.2.1	Determinación de la capacidad formadora de biopelículas.....	44
6.2.2	Detección de la presencia de genes de resistencia a QACs.....	46
6.3	Evaluación del efecto sinérgico o antagónico sobre <i>Listeria monocytogenes</i> en biopelículas mixtas.	47
6.3.1	Cuantificación de biopolímero en biopelículas mixtas.....	48
6.3.2	Cuantificación de células en biopelículas mixtas.....	48
6.4	Evaluación de la transferencia de genes de resistencia a QACs en biopelículas mixtas.	49
6.4.1	Evaluación de la resistencia fenotípica a los QACs.....	49

6.5	Diseño y análisis estadístico.....	50
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1	Identificación de especies del género <i>Listeria</i>	52
7.2	Caracterización de cepas de <i>Listeria</i>	56
7.2.1	Capacidad formadora de biopelículas	56
7.2.2	Presencia/ausencia de genes de resistencia a QACS en cepas de <i>Listeria</i> spp.....	65
7.2.3	Riesgo de persistencia en cepas de <i>Listeria</i> spp.....	66
7.3	Interacciones entre especies no patógenas del género <i>Listeria</i> con <i>L. monocytogenes</i> en biopelículas	72
7.3.1	Cambios en la capacidad de adhesión de <i>L. monocytogenes</i> en cultivo mixto.	73
7.3.2	Evaluación de las poblaciones de <i>L. monocytogenes</i> en biopelículas mixtas.	76
7.3.3	Cambios en la capacidad formadora de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> y las especies no patógenas de <i>Listeria</i> en cultivo mixto.....	81
7.4	Transferencia de genes de resistencia QACS en biopelículas mixtas.....	86
7.4.1	Expresión fenotípica del gen <i>bcrABC</i> asociado a la resistencia a QACs.	89
8.	CONCLUSIONES	92
9.	SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS.....	94
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
11.	ANEXOS.....	114

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Mecanismos de respuesta al estrés de <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Tabla 2. Factores que influyen en la interacción desinfectante-microorganismo....	23
Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de los desinfectantes empleados en la industria de los alimentos.	24
Tabla 4. Marca y modelo de equipos empleados.....	37
Tabla 5. Coloración de las colonias para cepas de <i>Listeria spp</i> en el agar cromogénico RLM.....	41
Tabla 6. Iniciadores utilizados para PCR-Múltiplex	41
Tabla 7. Mezclas de reacción para PCR-Múltiplex de <i>Listeria spp</i>	43
Tabla 8. Esquema de clasificación de la capacidad formadora de biopelículas. ...	45
Tabla 9. Primers empleados en la detección de genes de resistencia a QACs.	46
Tabla 10. Criterios de selección para ensayos de interacción con <i>L. monocytogenes</i>	47
Tabla 11. Clasificación de cepas de <i>Listeria spp.</i> en función del nivel de producción de biopelículas.....	58
Tabla 12. Perfil de formación de biopelículas en cepas de <i>Listeria spp.</i>	63
Tabla 13. Prevalencia del gen <i>bcrABC</i> en cepas de <i>Listeria spp.</i>	66
Tabla 14. Escala de la evaluación semicuantitativa del riesgo de persistencia de cepas de <i>Listeria spp.</i> asociado a la producción de biopelículas y a la presencia del gen <i>bcrABC</i>	68
Tabla 15. Nivel de riesgo de persistencia en cepas de <i>Listeria spp.</i>	69
Tabla 16. Cepas no patógenas de <i>Listeria spp.</i> portadoras del gen <i>bcrABC</i> seleccionadas para los ensayos de interacción.	72
Tabla 17. Porcentaje de transferencia del gen <i>bcrABC</i> de cepas de <i>Listeria spp.</i> a <i>L. monocytogenes</i>	86
Tabla 18. Poblaciones en cepas de <i>L. monocytogenes</i> receptoras del gen <i>bcrABC</i> expuestas a QACs.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de hortalizas congeladas (García et al., 2019).	5
Figura 2. Fisiopatogenia de la infección por <i>Listeria monocytogenes</i> (Olivares, 2009).	11
Figura 3. Número de brotes asociados al consumo de alimentos en Estados Unidos en el periodo 2008-2018 (CDC, 2018).	12
Figura 4. Etapas en la formación de biopelículas bacterianas (Rukavina et al., 2016).	19
Figura 5. Mecanismos de resistencia a desinfectantes en bacterias (Gnanadhas et al., 2013).	27
Figura 6. Principales mecanismos involucrados en la resistencia a desinfectantes químicos en biopelículas (Yuan et al., 2020).	28
Figura 7. Elementos genéticos movilizados por transferencia horizontal dentro de las células bacterianas (Mc-Carlie et al., 2019).	30
Figura 8. Estrategia general de trabajo	39
Figura 9. Perfiles de formación de biopelículas durante 72 h de incubación (Modificado de: Lucero-Mejía et al., 2020).	45
Figura 10. Especies de <i>Listeria</i> identificadas en cultivos provenientes de muestras colectadas en una planta procesadora de hortalizas congeladas. A) 2019, B) 2021	55
Figura 11. Correlación entre DO 595 nm y LOG UFC (72 h).	56
Figura 12. Dinámica de formación de biopelículas en cepas de <i>Listeria</i> spp. A) <i>L. grayi</i> , B) <i>L. innocua</i> , C) <i>L. ivanovii</i> , D) <i>L. monocytogenes</i> , E) <i>L. seeligeri</i> , F) <i>L. welshimeri</i>	62
Figura 13. Adhesión a superficies de acero inoxidable de cepas de <i>Listeria</i> spp. en cultivo individual y mixto.	74
Figura 14. Poblaciones de cepas de <i>Listeria</i> spp. formadas sobre acero inoxidable en cultivo individual y mixto.	77

Figura 15. Capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Listeria* spp. sobre superficies de acero inoxidable en cultivo individual y mixto.82

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos listos para consumo o *ready-to-eat* se han popularizado en las últimas décadas pues resultan una alternativa fácil y rápida para satisfacer la necesidad de alimentos en todo momento. Entre ellos el consumo de vegetales precocidos y congelados se ha incrementado ya que además del aporte nutricional, el procesamiento permite ofertar este tipo de productos en cualquier época del año y disminuir las pérdidas (Godínez-Oviedo, 2014). Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos específicamente *Listeria monocytogenes* es una problemática que aqueja constantemente a los productores (Moravkova et al., 2017).

L. monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis, una enfermedad que afecta a personas hipersensibles causando la muerte en aproximadamente el 30 % de los casos (García et al., 2019). En años recientes alimentos congelados han sido vehículos en brotes de listeriosis. De acuerdo con información del Centro para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, durante la década del 2010-2020 ocurrió un brote en donde el consumo de productos vegetales congelados fue el vehículo, afectando al menos a 10 personas y alcanzando una tasa de letalidad del 30% (CDC, 2016).

El estudio epidemiológico de los brotes ha demostrado que *L. monocytogenes* puede persistir por años en los ambientes de producción de alimentos (Ferreira et al., 2014). Este fenómeno se asocia al carácter psicrótrofo del microorganismo y a su capacidad formadora de biopelículas. Dentro de las biopelículas bacterianas se puede propiciar la resistencia a agentes desinfectantes empleados en la industria de alimentos, ya que las células inmersas dentro de estas estructuras se exponen a concentraciones subletales de los compuestos químicos, o bien pueden adquirirla mediante transferencia horizontal de material genético entre microorganismos (Mc-Charlie et al., 2019). Uno de los desinfectantes más comúnmente empleados en la industria alimentaria son los compuestos cuaternarios de amonio (QACs, por sus

siglas en inglés). Se ha reportado que en cepas de *L. monocytogenes* existe la presencia algunos determinantes genéticos que se asocian con la resistencia/tolerancia a dichos compuestos. Específicamente, el gen *qacH* altamente conservado en el transposón Tn6188 y el gen *bcrABC* presente en un casete de genes homónimo, los cuales codifican para diferentes sistemas de transporte y expulsión del desinfectante (Møretrø et al., 2017b).

El control de *L. monocytogenes* en la industria de alimentos se enfoca en el monitoreo de su presencia y el género *Listeria* suele usarse como grupo indicador, y para verificar la eficiencia de medidas de control aplicadas para el patógeno (Jagadeesan et al., 2019). La presencia de las especies no patógenas del género con capacidad para producir biopelículas podría favorecer el establecimiento de la especie patógena y el intercambio de genes de resistencia a agentes desinfectantes. La información disponible en la literatura que describa la interacción entre las especies del género *Listeria* es escasa.

Por ello, el objetivo del presente proyecto fue realizar una evaluación de las interacciones (sinergismo/antagonismo) entre especies no patógenas del género *Listeria* con *L. monocytogenes* en biopelículas, y determinar si ocurre el intercambio de genes asociados con la resistencia a QACs cuando se encuentran inmersas en estas estructuras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos listos para consumo.

En años recientes han ocurrido una serie de cambios relevantes en los hábitos de consumo de alimentos por parte de la sociedad en general. Un ejemplo de ello es el incremento en la producción masiva de alimentos listos para el consumo (RTE, por sus siglas en inglés). Estos se definen de acuerdo con el Reglamento 2073 de la Comisión Europea como aquellos productos destinados por el fabricante al consumo humano directo sin que exista la necesidad de un proceso de cocción u otro tipo de transformación que resulte eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los peligros microbianos que pudieran estar asociados (RCE, 2005)

Algunas de las ventajas de los alimentos RTE es que tienen una calidad sensorial estable, ahorran tiempo a las personas y agilizan el trabajo en el hogar. Sin embargo, el que sean sometidos a operaciones como el troceado, cortado, dosificación, envasado u otro tipo de manipulaciones incrementa los riesgos de que ocurra una contaminación accidental. Por otro lado, los principales problemas de estos productos son los de naturaleza microbiana, ya que patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, entre otros, pueden contaminar el alimento en algún punto durante su procesamiento. *L. monocytogenes*, representa uno de los principales retos para la industria, dada su ubicuidad, la resistencia a diferentes tipos de estrés, la capacidad para formar biopelículas y sobre todo por su carácter psicrótrofo. Los alimentos RTE pueden provenir de productos procesados como embutidos, pastas, mortadelas, jamón cocido, pescado ahumado, quesos; o de productos frescos como una gran diversidad de frutas y hortalizas (Ordoñez et al., 2017).

2.1.1 Hortalizas congeladas

Las hortalizas son todos aquellos productos de origen vegetal provenientes de plantas herbáceas de ciclo anual o bienal de prácticas agronómicas intensivas, caracterizadas por ser consumidos de manera directa o procesada en algunos casos. En relación con la composición, el contenido de agua suele ser mayor al 70

%, contienen compuestos antioxidantes como los carotenoides, vitamina C, calcio, hierro y otros minerales. El contenido energético generalmente es menor a las 100 kcal por cada 100 g. La vida de anaquel en este tipo de productos varía desde unos cuantos días, hasta un año como máximo dependiendo de los tratamientos que reciban (Mendoza et al., 2010).

En México por volumen de producción se considera al jitomate, chile verde, espárrago, brócoli, coliflor, elote y pepino como las principales hortalizas, ya que en el año 2021 se generaron cerca de 8.8 millones de toneladas (SIAP, 2021). Para extender la vida útil de este tipo de productos se han implementado los métodos de conservación a bajas temperaturas como la congelación y la refrigeración, lo cual ha mostrado tener muy buenos resultados en vegetales enteros, procesados, precortados, ensaladas preparadas, ocasionando cambios mínimos desde el punto de vista sensorial y sin afectar los diferentes componentes nutricionales (García et al., 2019). De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el año 2016 en México se generó un total de 280 mil toneladas de productos vegetales congelados, de los cuales el 93% son destinados a la exportación (SIAP, 2016).

2.1.2 Procesamiento

En la producción de hortalizas congeladas, la recepción de la materia prima es una etapa bastante importante, ya que representa la principal vía de entrada de microorganismos patógenos al entorno de producción en caso de estar contaminadas, lo que hace necesario el establecimiento de criterios de aceptación y rechazo tomando en cuenta las características que presenten. Una vez que los productos se seleccionan, se someten a una serie de tratamientos. En la Figura 1 se muestra de manera esquematizada algunos de los principales pasos, ya que pueden presentarse variaciones en función de la hortaliza que se esté procesando (García et al., 2019).

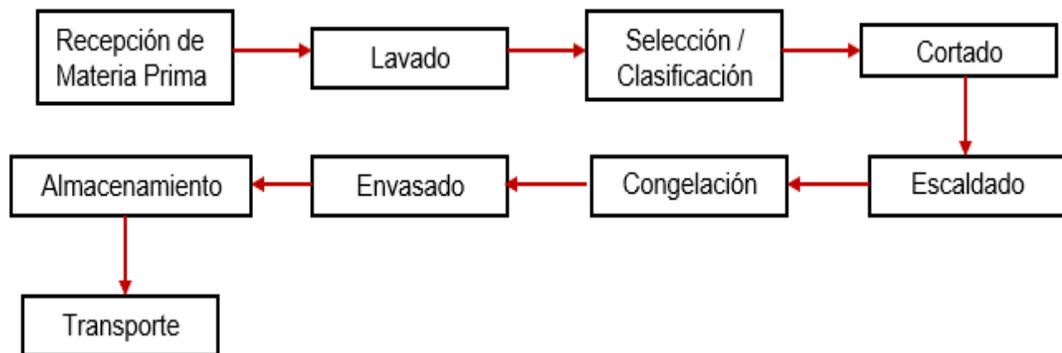


Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de hortalizas congeladas (García et al., 2019).

El escaldado o blanqueamiento, es una operación preliminar que consiste en un tratamiento térmico por tiempos cortos y temperaturas de entre 90-100 °C. Su objetivo primordial es inhibir a las enzimas presentes con el fin de minimizar cambios de textura y color. A pesar de que esta etapa no está diseñada para eliminar peligros microbianos en los alimentos, esta operación correctamente realizada permite la disminución de células vegetativas microbianas en el producto. Sin embargo, si el tratamiento empleado resulta deficiente, algunos microorganismos tienen la capacidad de generar resistencia al estrés propiciando su sobrevivencia y potencia su proliferación y persistencia en el producto y el ambiente (Casp et al., 2003; Tigeros et al., 2021).

Finalmente, la congelación es uno de los procesos más empleados para la conservación de hortalizas, aunque mucha de la calidad de estos productos se encuentra determinada por los diferentes pretratamientos que reciban. Durante esta etapa básicamente se somete al producto a temperaturas de entre -25 °C y -40 °C, incrementando la vida útil al menos un año y disminuyendo la pérdida de los nutrientes. Una vez ocurrida la congelación el límite superior para el almacenamiento de las hortalizas congeladas es de -18 °C; a esta temperatura el desarrollo microbiano se ve detenido (Gómez-Sánchez et al., 2007).

2.1.3 Microbiología de Hortalizas

El microbioma asociado a las hortalizas constituye un sistema complejo y diverso. Está constituido por bacterias Gram negativas como *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas*; y algunos Gram positivos tal es el caso de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Clostridium* (Jay et al., 2008). Como consecuencia del elevado contenido acuoso en combinación con la presencia de microheridas, daños por enfriamiento, maduración en ambientes modificados, presencia de zonas necróticas y el crecimiento cercano al suelo, se incrementa la susceptibilidad del producto a sufrir infecciones que lleven al deterioro por diferentes grupos microbianos destacándose los hongos filamentosos *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Alternaria*; y las levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Colletotrichum*, y *Saccharomyces*. Las bacterias ácido lácticas constituyen una parte importante del microbioma al encontrarse ampliamente distribuidas en la superficie de las hortalizas; además de que tienen participación activa en el deterioro ya que algunas poseen enzimas capaces de degradar la celulosa y las pectinas, ocasionando un reblandecimiento, siendo los géneros más relevantes *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Carrillo et al., 2007).

Una investigación exhaustiva en materia de brotes asociados al consumo de hortalizas congeladas permitió la identificación y categorización de los principales patógenos involucrados de acuerdo con su hábitat. Las bacterias asociadas al suelo fueron: *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus*; las relacionadas con contaminación fecal: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7. En el caso de los parásitos estos suelen asociarse mayormente a los productos frescos y entre los virus se consideran relevantes a Hepatitis A, Rotavirus y Norovirus. Muchos de estos patógenos son diseminados vía persona-persona o por zoonosis, de modo que la manipulación por trabajadores o preparadores enfermos, la contaminación cruzada, el uso de agua contaminada, el uso de estiércol inadecuadamente compostado como material de abono y el contacto con

suelo contaminado suelen ser los mecanismos comunes de diseminación de patógenos humanos a los alimentos (Sapers et al., 2005).

Concretamente se ha asociado una baja carga microbiológica a las hortalizas congeladas, debido principalmente a las bajas temperaturas durante el almacenamiento y a los pretratamientos que recibe el producto en la cadena de procesamiento. En mezclas de hortalizas congeladas el número de microorganismos usualmente está entre 4-6 Log UFC/g. Las bacterias ácido lácticas se han encontrado altamente asociadas, aunque también se ha descrito que microorganismos pertenecientes al microbioma del entorno de producción también pueden encontrarse (Godínez-Oviedo; 2014).

2.2 Género *Listeria*.

El género *Listeria* pertenece al filo *Firmicutes* y al orden de los *Bacillales*. Originalmente desde el año 1984, estaba constituido por seis especies: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*. Sin embargo, para el año 2009 fueron descritas 11 especies nuevas (Orsi et al., 2016). Teniendo como base la relación de las especies con *L. monocytogenes* se subclasifican en dos grupos: *Listeria* sensu strictu que incluye a *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. monocytogenes* y el grupo *Listeria* sensu lato donde se encuentra *L. grayi* junto a las otras 10 especies descritas recientemente (Chiara et al., 2015). A pesar de que la información epidemiológica ha revelado que *L. monocytogenes* es la única especie patógena para el hombre y que *L. ivanovii* tiene la capacidad de causar enfermedad en animales rumiantes y (FDA, 2012), esta última se ha visto implicada también en enfermedades en humanos (Guillet et al., 2010).

2.2.1 Características del género *Listeria*

Las especies de *Listeria* son bacilos Gram positivos que al observarse en microscopía se disponen de forma individual o en ocasiones formando cadenas cortas. La distribución es considerada cosmopolita al tener una gran capacidad de adaptación a diferentes nichos ecológicos tales como el suelo, agua, plantas y

ambiente en general. Son bacterias no esporuladas, anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas. La temperatura óptima de crecimiento está entre 30-37 °C, sin embargo, pueden crecer a 4 °C. El contenido de guanina-citocina presente en su ADN se encuentra en el rango de 36-38 % (Materke et al., 2020).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria con capacidad de crecimiento anaerobio facultativo, exhibe tolerancia a un rango amplio de temperaturas que va por debajo de los 0 °C hasta los 45 °C, presentando el óptimo de desarrollo a 37 °C (Castañeda-Ruelas et al., 2014). Por lo tanto, es considerado un microorganismo psicrótrofo al haberse demostrado la capacidad de desarrollo incluso en refrigeración con temperaturas de hasta -1.5 °C. Dicha facultad que ha permitido distinguirla respecto a otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos tales como *Salmonella* y *S. aureus* cuyo desarrollo se inhibe bajo esas condiciones (Schöbitz et al., 2009; Pereira et al., 2018). En cuanto al pH el crecimiento puede ocurrir en niveles que abarcan ambas direcciones de la escala, siendo los límites en condiciones ácidas de 4.0 y en alcalinas de 9.6. Presenta tolerancia al cloruro sódico (NaCl) en concentraciones mayores al 20 %, sin embargo, el desarrollo se inhibe por arriba del 10 % (Castañeda-Ruelas et al., 2014).

Se le considera una bacteria de vida libre ampliamente distribuida en suelos, agua y vegetación; los principales reservorios son animales domésticos, fauna silvestre, aves de corral y el hombre (PAHO, 2018). A pesar de que la frecuencia de aislamiento a partir de los alimentos es relativamente baja, ningún producto se encuentra exento de contaminarse con esta bacteria durante toda la cadena de producción dado que presenta una gran capacidad de supervivencia dentro de los entornos de producción (Moravkova et al., 2017). Algunos de los alimentos a los que más se ha asociado esta bacteria son los RTE, además de productos cárnicos crudos de pollo, res o pescado y diferentes lácteos como leche, helado, mantequilla y quesos (Buchanan et al., 2017).

2.2.3 Factores de virulencia de *Listeria monocytogenes*

Esta bacteria es intracelular facultativa capaz de invadir y sobrevivir en células de diferentes mamíferos. En el caso de los humanos ha mostrado predilección hacia los hepatocitos cuando no logra ser contrarrestada por la respuesta inmunológica, aunque también invade macrófagos, fibroblastos y células epiteliales. (Olivares, 2009). Presenta una proteína de superficie denominada internalina, de la que se han identificado las variantes InIA e InIB codificadas por los genes homónimos, las cuales interactúan con los receptores E-Cadherina y Met que están presentes en las células del huésped, por lo que median la adhesión e internalización del patógeno mediante el proceso de fagocitosis (Vera et al., 2013).

Una vez dentro del fagosoma, inicia la producción de una hemolisina llamada Listerolisina O codificada por el gen *hyl*, la cual se encarga de inducir la formación de poros en el fagosoma. Además, ocurre la síntesis de dos fosfolipasas, una específica para el fosfatidilinositol codificada por el gen *plcA* y la otra de amplio rango por la presencia del gen *plcB*, las cuales le permiten escapar del fagosoma antes de que ocurra la fusión lisosómica (Johansson et al., 2019). Otra proteína relevante es la codificada por el gen *actA* y recibe el mismo nombre, ya que favorece el reclutamiento y posterior polimerización de actina a nivel intracelular cuando se encuentra a nivel citoplasmático, lo cual es indispensable para el mecanismo que la bacteria emplea para invadir células adyacentes, consiguiendo de esa manera evadir la respuesta inmunológica (Materreke et al., 2020).

2.2.4 Listeriosis

L. monocytogenes es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA). Puede manifestarse de manera localizada como un cuadro gastrointestinal en pacientes inmunocompetentes, mientras que, en embarazadas, ancianos y pacientes con sistemas inmunitarios debilitados se incrementa la posibilidad de desarrollarse una forma invasiva más peligrosa; las principales manifestaciones suelen ser la bacteriemia y la meningitis, resultando importante que la población perteneciente a estos grupos limite el consumo de

alimentos de alto riesgo (OMS, 2018). Se han identificado 13 serovariedades que conforman cuatro linajes con diferencias en cuanto a vías de transmisión y capacidad de ocasionar enfermedad entre los consumidores. En menos del 95 % de los casos ocurridos en humanos se han asociado las variedades 1/2a, 1/2b y 4b, identificándose a este último como el principal causante de brotes, de modo que a los otros dos se les atribuyen casos esporádicos. La dosis infectante se reconoce en 100 células aunque es imprescindible tener en cuenta la variabilidad de la sensibilidad de la persona hacia el patógeno, la virulencia de la cepa, el alimento, entre otros factores (PAHO, 2018).

Los síntomas de la enfermedad varían según el curso que tome, siendo determinante el estado inmune del paciente. En los cuadros de tipo no invasivo se presenta diarrea, fiebre, dolor de cabeza y dolores musculares, los cuales aparecen tras un periodo de incubación variable en días posterior al consumo del alimento contaminado. Cuando se desarrolla la forma invasiva, dicho periodo presenta una variabilidad mayor que oscila entre 1 o 2 semanas, aunque puede llegar a postergarse hasta los tres meses, apareciendo los síntomas del cuadro no invasivo con la incorporación de algunos más graves que conducen a la ocurrencia de enfermedades como la septicemia y la meningitis (OMS, 2018).

En algunos órganos como el hígado y el bazo, la respuesta inmune ante la presencia de *L. monocytogenes* es mediada por las células T que consiguen limitar la infección en gran medida; aunque también pueden involucrarse anticuerpos, complemento y neutrófilos (PAHO, 2018). De manera general la fisiopatogenia de la listeriosis se encuentra descrita en la Figura 2. La bacteria atraviesa la barrera intestinal ocurriendo la internalización por fagocitosis derivado de la interacción de las internalinas A y B con sus respectivos receptores en la superficie celular. Se inicia la formación del fagosoma que tras la síntesis y concentración del principal factor de invasión la Listeriolisina O, se lisa permitiendo la llegada de la bacteria a nivel citoplasmático. Una vez alcanzada esa zona, se sintetiza y expresa la proteína actA que induce la polimerización de la actina para permitir la movilidad dentro de la

célula huésped; ocurriendo posteriormente su translocación hacia la superficie de la membrana donde se generan proyecciones similares a los pseudópodos que son capturados por células circundantes, que permiten así el desplazamiento de la bacteria en los diferentes tejidos del hospedador sin que se exponga al sistema inmunitario (Olivares et al., 2009).

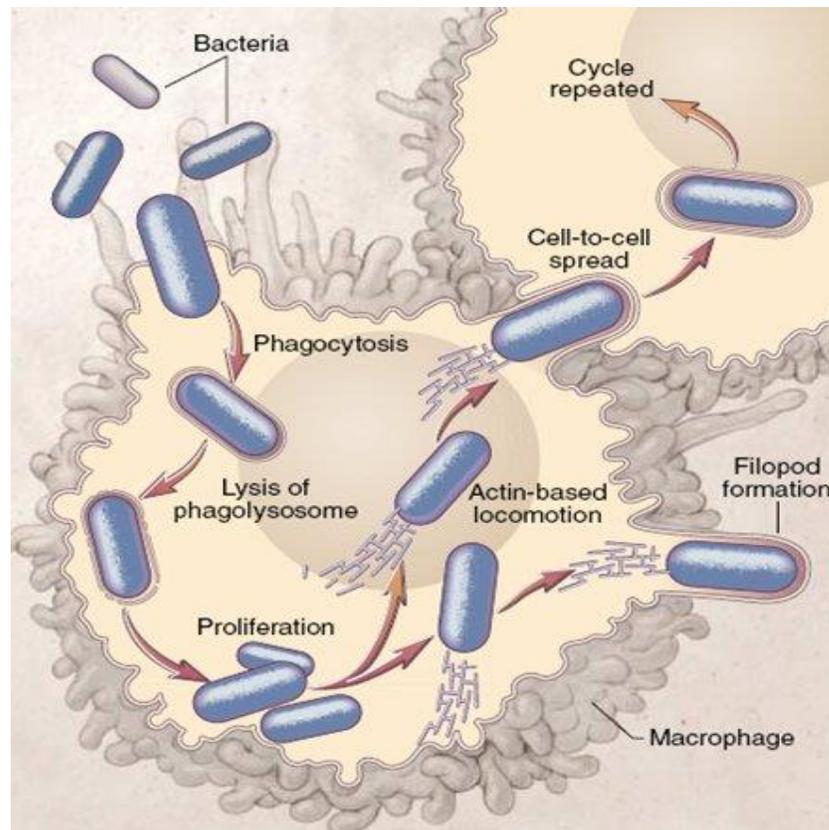


Figura 2. Fisiopatogenia de la infección por *Listeria monocytogenes* (Olivares, 2009).

La frecuencia de la listeriosis es de 1-10 casos anuales por millón de personas dependiendo del país y la región. Sin embargo, el que ocasione la muerte del paciente en promedio del 20-30 % de los casos la transforma en un importante problema de salud pública (Schöbitz et al., 2009; CDC 2017). El CDC reporta al menos 1600 casos de listeriosis en los Estados Unidos cada año (CDC, 2017)

2.2.5 Brotes de Listeriosis

Durante la década de 2008 al 2018 ocurrieron un total de 74 brotes en donde el agente etiológico identificado fue *L. monocytogenes*, a partir de los cuales se derivaron 769 enfermedades y 669 hospitalizaciones; consumándose el deceso del paciente en al menos 121 casos, es decir el 15.73% con respecto al total enfermedades. En la Figura 3 se muestra el número de brotes por año en la década citada indicándose el origen de los mismos. El consumo de alimentos contaminados con esta bacteria fue el principal medio para contraer la enfermedad, ya que este fue el origen en poco más del 97 % de los brotes registrados, mientras que el porcentaje restante se clasificó como desconocido o indeterminado, habiendo descartado de manera previa la posibilidad de transmisión de persona a persona, por contacto con animales o cuestiones medio ambientales (CDC, 2018).

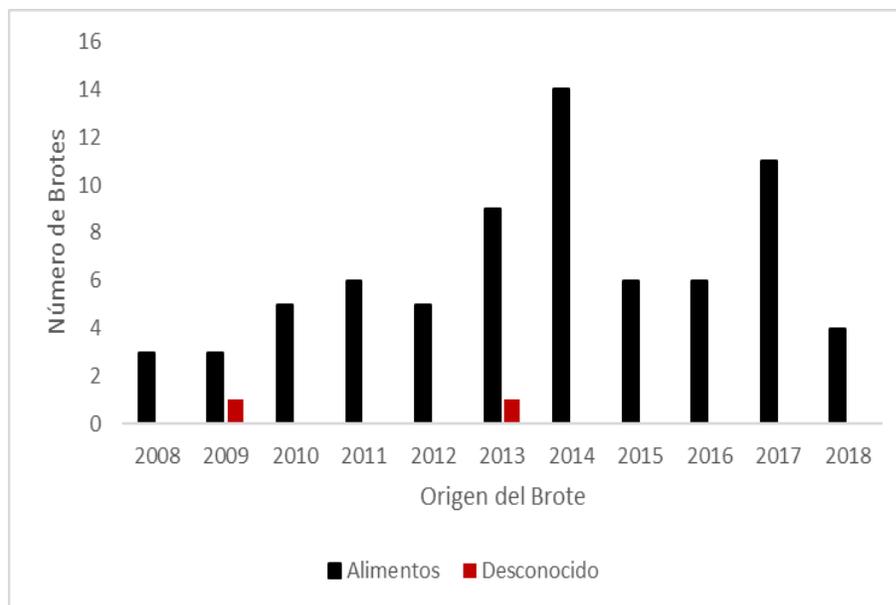


Figura 3. Número de brotes asociados al consumo de alimentos en Estados Unidos en el periodo 2008-2018 (CDC, 2018).

En México, debido a la ausencia de la investigación de brotes, no se cuentan con información respecto a la incidencia de listeriosis entre la población, así como el costo económico que representa para el país. En una revisión que cubrió los años

de 1982 a 2006, se encontró que solamente se notificaron 14 casos en pacientes pertenecientes a distintos grupos de edad. La sintomatología presentada fue variable, aunque la enfermedad se manifestó mayormente como una meningoencefalitis en población del género femenino con una tasa de letalidad del 50 % (Castañeda-Ruelas et al., 2014).

2.2.6 Interacciones entre especies del género *Listeria*

Las especies del género *Listeria* tienen la capacidad de formar biopelículas y por tanto podrían colonizar el entorno en donde se producen alimentos, siendo de mayor relevancia desde el punto de vista de la inocuidad aquellos denominados como RTE. La similitud en el comportamiento, la tolerancia y el origen entre *L. monocytogenes* y las especies no patógenas han permitido que *Listeria* spp. se considere como grupo índice de la presencia del patógeno *L. monocytogenes* (Hasani et al., 2020). Dentro de las validaciones de tratamientos que se llevan a cabo en la industria de alimentos, se ha utilizado a *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes* debido a la similitud genética y a la capacidad de formar biopelículas en diversos materiales (Agustín et al., 2018).

Algunos estudios sugieren que *L. innocua* ejerce una actividad antagonista que limita la supervivencia y desarrollo de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable, ya que la primera causa una disminución en la capacidad de adherencia y formación de biopelículas del patógeno como consecuencia de una diferencia de las cargas presentes en la superficie de ambos microorganismos. En trabajos en donde se ha estudiado el crecimiento dual entre estas dos cepas, se ha observado una reducción de *L. monocytogenes* incluso en medios selectivos, lo que ha sido atribuido en gran medida a la capacidad de absorción y agotamiento de los recursos nutricionales en el medio que ejerce *L. innocua*, lo cual ocasiona un incremento en la síntesis y concentración de metabolitos similares a las bacteriocinas por parte de la especie no patógena (Zilelidou et al., 2018).

2.3 Persistencia microbiana en la industria de los alimentos.

El concepto de persistencia de los microorganismos puede referirse a la supervivencia por un largo periodo de tiempo de un microorganismo en un huésped, generalmente como consecuencia de la resistencia a los antibióticos administrados durante el tratamiento de una enfermedad. En el contexto de la inocuidad de alimentos, se denomina persistencia a la presencia o viabilidad de los microorganismos típicamente sin crecimiento por un largo periodo de tiempo en una matriz definida, que puede ser un alimento o una superficie inerte de diversa composición, en el ambiente o el entorno de producción de los mismos (Ferreira et al., 2014).

De manera general esta capacidad de persistencia se determina en proporción variable por la habilidad que exhiben los diferentes grupos microbianos para adaptarse a diferentes tipos de estrés ligados a variaciones en factores físicos como son la presión osmótica, temperatura y humedad relativa; así como a factores químicos tales como el pH, cantidad de nutrientes y la concentración de especies oxidativas resultado del metabolismo propio del microorganismo. Otro factor que hoy en día se considera importante es la exposición previa del microorganismo a concentraciones subletales de los diferentes desinfectantes empleados en las operaciones durante el procesamiento de un alimento; lo cual ha contribuido al aumento en la resistencia a estos compuestos (Matereke et al., 2020).

2.3.1 Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en el entorno de producción de alimentos

La presencia de *L. monocytogenes* en el entorno de producción de alimentos que conduce a la contaminación de los productos que se elaboran en él, ha resultado ser la causa raíz de un gran número de brotes de listeriosis. La situación resulta crítica ya que se ha demostrado que la persistencia del patógeno en ambientes de producción de alimentos puede ser por años e incluso décadas (Ferreira et al., 2014). En estos sitios, el crecimiento bacteriano se encuentra fuertemente ligado a la presencia de nutrientes y condiciones de elevada humedad. Específicamente, *L.*

monocytogenes suele encontrarse en el suelo, aguas estancadas, una gran diversidad de equipos y utensilios, bandas transportadoras, cámaras de refrigeración, túneles de congelación, por citar algunos ejemplos (Townsend et al., 2021). La prevalencia de este microorganismo se ha estimado mayor al 9 % en plantas procesadoras de jamón curado español, carne cruda, salmón ahumado en frío y lácteos (Alía et al., 2020). En el caso específico de la industria de las hortalizas congeladas Godínez-Oviedo (2014) realizó un estudio en el que durante un año se analizaron muestras de producto, de superficies de contacto directo y no contacto con el producto para la búsqueda de *L. monocytogenes*, la prevalencia del patógeno en producto, superficies de contacto directo y superficies de no contacto fue de 6.69 %, 5.58 %, y 27.27 % respectivamente.

La prevalencia de *L. monocytogenes* puede deberse a la capacidad de algunas cepas para sobrevivir y desarrollarse en nichos establecidos dentro de las plantas procesadoras cuyos procesos de limpieza y desinfección pueden tornarse complicados, tal es el caso de grietas o hendiduras de diferentes superficies (Buchanan et al., 2017). La gran capacidad de adaptación y respuesta al estrés ambiental por parte de este microorganismo puede considerarse la segunda causa que detona su elevada persistencia y prevalencia en la industria alimentaria. Otra característica que favorece la persistencia del patógeno es su capacidad para adherirse a las superficies inertes y formar biopelículas (Materreke et al., 2020). Se han descrito diversos mecanismos que emplea *L. monocytogenes* para contrarrestar el estrés que puede presentarse en el ambiente de producción de alimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Mecanismos de respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes*

Causa de estrés	Mecanismos de respuesta	Referencia
Temperatura	Expresión de proteínas de choque por frío (CSPs) o de choque por calor (HSPs) según sea el caso, las cuales	Kocaman et al., 2016 Materreke et al., 2020

	actúan como chaperonas permitiendo desde la replicación hasta el plegamiento proteico en las distintas temperaturas.	
Acidez	Respuesta de tolerancia al ácido (ATR), arginina desaminasa (ADI) y glutamato descarboxilasa (GAD).	Kocaman et al., 2016 Matereke et al., 2020
Alcalinidad	Estimulación de sistema de transporte de protones y solutos.	Kocaman et al., 2016
Sustancias oxidantes	Desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante catalasa, alquilhidroperoxidasa y superóxido dismutasa.	Kocaman et al., 2016 Matereke et al., 2020
Alta presión osmótica	Ingreso de potasio y glutamato a la célula; seguido de la captación de osmoprotectores como glicina, betaina y carnitina.	Matereke et al., 2020

2.3.2 Biopelículas

Conforme las células bacterianas se desarrollan en diversas superficies, forman agrupaciones que se adhieren y se encuentran embebidas a una matriz adhesiva formada por restos de células muertas y diferentes excreciones celulares, la cual recibe el nombre de biopelícula o *biofilm* (Mandigan et al., 2015b). Estas sustancias poliméricas extracelulares o EPS son la matriz de la biopelícula y generalmente la constituyen polisacáridos, fosfolípidos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos entre otras; las cuales favorecen la unión entre células (Flemming et al., 2016).

Un gran número de brotes de ETA se han asociado a la formación de biopelículas por diferentes patógenos en diversas plantas productoras, reconociéndose como una fuente importante de contaminación en las industrias de la cerveza, lácteos,

mariscos, carne y pollo (Srey et al., 2013). Tanto la adhesión microbiana como la formación de biopelículas son de gran importancia para la industria de los alimentos, ya que pueden ocurrir en diferentes superficies que entran en contacto con los productos. Los microorganismos que se encuentran ahí presentes muestran una mayor resistencia ante los agentes desinfectantes, detergentes, desecación, luz ultravioleta y conservadores (Carrillo et al., 2010). Se ha reportado que tanto los equipos de acero inoxidable como los utensilios son sitios que favorecen la formación de estas estructuras, adquiriendo de esta manera la capacidad de transferir microorganismos al entrar en contacto con los alimentos. Lo anterior es denominado como potencial de biotransferencia, y ha de ocurrir independientemente de si el número de microorganismos presente es pequeño o muestra variaciones dentro de un área en particular (Oliveira et al., 2010).

L. monocytogenes presenta una gran capacidad de adhesión a las superficies, incluidas las compuestas por plástico, polipropileno, acero inoxidable, gomas, caucho e incluso vidrio. Lo anterior ha facilitado de manera considerable su persistencia incluso en lugares inaccesibles dentro de la cadena de procesamiento de los alimentos, obligando a los productores a modificar o emplear nuevas técnicas de desinfección para eliminarlos (Bonsaglia et al., 2014). Los factores ambientales como la temperatura, el pH y el grado de hidrofobicidad de la superficie han demostrado tener un efecto sobre el proceso de motilidad bacteriana que tiene un rol importante en la adhesión de este microorganismo (Cappitelli et al., 2014).

Es indispensable que la superficie en donde se realice la adhesión permita la viabilidad y desarrollo de los diferentes microorganismos para garantizar la formación de la biopelícula. Se ha observado que el microbioma residente en el entorno de producción de alimentos es capaz de interactuar con microorganismos transitorios, lo que lleva en ocasiones a la supervivencia, colonización y formación de biopelículas por microorganismos patógenos incluido *L. monocytogenes* (Agustín et al., 2018).

2.3.3 Mecanismos de formación de biopelículas

La formación de biopelículas se ha descrito en cinco fases (Figura 4). Las primeras dos fases corresponden a los procesos de adhesión reversible e irreversible respectivamente, seguidas del desarrollo y crecimiento temprano del microorganismo que al alcanzar niveles adecuados permite el inicio de la fase de maduración de la biopelícula en la que se da el desarrollo final y posterior dispersión de las células colonizadoras (Rukavina et al., 2016).

Algunos autores integran las etapas de adhesión en una sola, por la proximidad con la que ocurren *in vivo*. La reversible puede ser activa o pasiva en función de la motilidad o el transporte gravitacional con que se produzca la llegada de la bacteria a la superficie, ocurriendo poco tiempo después de la fijación; el éxito en esta etapa es dependiente de las propiedades físicas y químicas de la superficie celular bacteriana y la de contacto. Tras un tiempo que oscila entre los 20 minutos y las 4 horas ocurre la adhesión irreversible favorecida sobre todo a temperaturas de entre 4 y 20 °C asociado a la producción de un polímero extracelular (Oliveira et al., 2010).

En la tercera etapa se inicia la formación de microcolonias como resultado del incremento y acumulación en el número de los microorganismos adheridos, de modo que, al alcanzar un estado fisiológico óptimo, se inicia la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), lo cual fortalece el enlace entre las bacterias e incrementa la estabilidad ante el estrés ambiental (Srey et al., 2013)

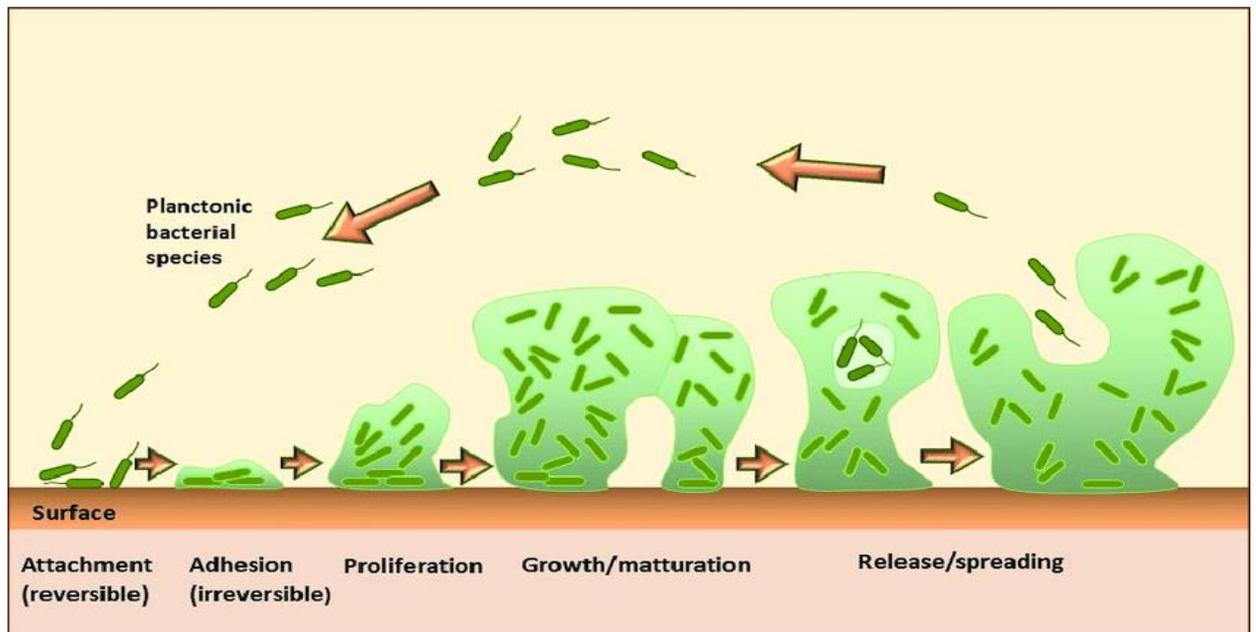


Figura 4. Etapas en la formación de biopelículas bacterianas (Rukavina et al., 2016).

El que la biopelícula alcance la etapa de maduración dependerá de la disponibilidad de los nutrientes dentro del sistema, de tal forma que después de aproximadamente 10 días se va transformando en una estructura bastante más organizada donde las bacterias forman microcolonias heterogéneas en la superficie de contacto pudiendo ser complejas y dispersas con canales de agua abiertos. La dispersión es la última etapa del ciclo de formación de la biopelícula, permite que las células regresen a su forma planctónica, como consecuencia de procesos intrínsecos desarrollados en la estructura, como actividad enzimática, aumento o disminución en la liberación de EPS y degradación de las proteínas de unión a superficie, lo que puede llevar al desprendimiento de las células de la superficie de adhesión inicial, permitiendo la posterior colonización de nuevos nichos (Srey et al., 2013).

2.3.4 Interacciones microbianas en biopelículas

El concepto de comunicación entre células de diferentes poblaciones microbianas surgió durante la década de los 60's, y se propuso que los factores ambientales estaban involucrados y que algunos compuestos excretados por las propias

bacterias eran fundamentales en la comunicación (Krämer et al., 2009). Diferentes estudios *in vivo* han evidenciado la importancia de este sistema de comunicación en la formación de biopelículas, resultando crítico en la tercera etapa donde la acumulación de los microorganismos podría incluir algunas bacterias reclutadas del medio circundante mediante señalizaciones (Srey et al., 2013). Este sistema de señalizaciones químicas permite el desarrollo y maduración del *biofilm* es denominado como *quorum sensing* (QS), el cual además favorece el mantenimiento de un alto nivel de organización entre las comunidades presentes en esta (Rukavina et al., 2016). El QS juega un rol importante en el caso de las bacterias patógenas, pues se encuentra directamente ligado a la activación de la virulencia y al desarrollo de resistencia a antibióticos (Saxena et al., 2019).

Los procesos controlados por el QS incrementan su efectividad y son optimizados al haber dos o más especies bacterianas conviviendo en el entorno, a diferencia de cuando solamente se encuentra presente una especie (Krämer et al., 2009). Las diferentes señales desencadenan alteraciones en la expresión génica, lo que conduce a modificaciones de las características fenotípicas que participan de forma relevante en la interacción dentro de la biopelícula como son el desarrollo, competencia, motilidad y virulencia. Además, factores ambientales pueden ser regulados determinantemente mediante este QS teniendo como ejemplo el pH y la disponibilidad de nutrientes (Saxena et al., 2019).

Una de las técnicas que se emplean actualmente para evitar la formación de las biopelículas es la inhibición del QS. Por ejemplo, el plasma frío de nitrógeno se utilizó con *L. monocytogenes* y se demostró que se propicia la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en la expresión genética lo que genera una disminución del 16 al 53 % en la expresión de los genes involucrados en el QS (Cui et al., 2020). No se han desarrollado estudios que expliquen adecuadamente la interacción del patógeno *L. monocytogenes* con los distintos grupos microbianos que integran el microbioma del entorno de producción de alimentos. Conocer los mecanismos de interacción empleados por estos

microorganismos sería de gran relevancia para poder implementar estrategias que permitan disminuir la probabilidad de formación de las biopelículas o en todo caso limitar la presencia del patógeno cuando se lleguen a formar (Martínez-Rivera, 2014).

2.4 Control de *Listeria monocytogenes* en la industria de alimentos

Durante mucho tiempo se consideró que la aplicación de procesos térmicos tradicionales era la única forma para garantizar la ausencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, a pesar de la alteración de los productos desde el punto de vista sensorial y nutricional (Magalhães et al., 2016). Estas desventajas condujeron a que en años recientes con el propósito de controlar a *L. monocytogenes* se hayan implementado nuevas tecnologías tales como altas presiones hidrostáticas, sonicación, microondas, irradiación, calentamiento óhmico, ozonización, campos eléctricos pulsados y el plasma frío (Bahrami et al., 2020). Por otro lado, la implementación rigurosa y estricta de las buenas prácticas de manufactura (BPM), procedimientos estandarizados de saneamiento (POES), buenas prácticas de higiene (BPH), es una estrategia efectiva para evitar el establecimiento de los microorganismos en los ambientes de producción de alimentos (Ferreira et al., 2014).

Durante los últimos años se ha documentado la capacidad de supervivencia que tiene *L. monocytogenes* ante agentes biocidas, así como la habilidad que presenta para formar comunidades multiespecie. Lo anterior ha propiciado el incremento en la prevalencia del microorganismo en los entornos de producción, incluso de cepas que no son altamente productoras de biopelículas. Algunas investigaciones han demostrado que la fijación de células del patógeno es mayor en superficies que se encuentran precolonizadas por otros géneros bacterianos (Rodríguez-López et al., 2018). Se ha documentado que las biopelículas de *Listeria* son altamente resistentes a los procesos de limpieza y desinfección, y que la combinación de métodos físicos y químicos es una buena estrategia para mejorar su efectividad; por

ejemplo, el caso del ultrasonido como pretratamiento a la aplicación de agentes antimicrobianos, favorece su penetración (Shao et al., 2020).

Actualmente se encuentran en evaluación métodos alternativos para el control de *L. monocytogenes* que involucran enzimas, bacteriófagos, otros microorganismos y sus metabolitos. Estos métodos son costosos, aunque presentan la ventaja de generar menos componentes tóxicos asociados a la desinfección química (Rodríguez-López et al., 2018). En un estudio realizado por Shao et al. (2020) quedó de manifiesto la eficiencia del probiótico *Leuconostoc mesenteroides* obtenido a partir de kimchi para inhibir la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en un sobrenadante libre de células, relacionándose con la generación de metabolitos que podrían ser una herramienta interesante en el control del patógeno.

2.4.1 Desinfección

La desinfección es una operación que busca reducir o eliminar la presencia de microorganismos patógenos en una superficie u objeto mediante el uso de métodos físicos o químicos (Skowron et al., 2018). Los agentes empleados en esta operación reciben el nombre de desinfectantes; los más comunes son: halógenos y sus derivados, yodóforos, ozono, tensioactivos, compuestos nitrogenados, compuestos cuaternarios de amonio, ácidos orgánicos e inorgánicos, compuestos de metales pesados, alcoholes, formaldehído y compuestos tipo peróxidos (Baranowska et al., 2014).

Dependiendo de la concentración, los desinfectantes pueden clasificarse como bactericidas cuando provocan la muerte del microorganismo y bacteriostáticos en aquellos que limitan el desarrollo sin ocasionar la muerte. Los mecanismos de acción involucran la destrucción de la pared celular, daños a nivel citoplasmático, oxidación de diversos componentes tales como membrana celular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Puede ocurrir también una inhibición del transporte activo a través de la membrana, la desnaturalización e inhibición de la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo microbiano (Skowron et al., 2018).

La eficiencia de la desinfección se ve limitada por la forma en que ocurre la interacción entre el desinfectante y el microorganismo, siendo importante la definición adecuada de la concentración del agente y el tiempo de exposición al mismo durante el tratamiento. De igual manera, participan en forma destacada tres tipos de factores: los asociados al propio desinfectante, los asociados al ambiente y los que involucran las características del microorganismo que se encuentra embebido a la superficie (Tabla 2) (Hernández-Navarrete et al., 2014). Un problema relevante para los procesos de desinfección en la industria es la formación de biopelículas, lo que aporta a los microorganismos resistencia a diferentes factores tornando complicada la tarea de su erradicación (Rodríguez-Melcón et al., 2019). Se ha demostrado que las células bacterianas que se encuentran inmersas en la matriz de una biopelícula pueden ser de 10 a 1000 veces más resistentes a los desinfectantes químicos en comparación con sus respectivas células planctónicas (Acker et al., 2014).

Tabla 2. Factores que influyen en la interacción desinfectante-microorganismo.

Dependientes del desinfectante	Dependientes del ambiente	Dependientes del microorganismo
<ul style="list-style-type: none"> • Composición química • Concentración • Mecanismo de acción 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo • Temperatura • pH • Sustancias interferentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de microorganismo • Grado de agregación • Tamaño del germen • Afinidad por los lípidos

Fuente: Hernández-Navarrete et al., 2014.

2.4.2 Principales desinfectantes empleados en la industria de los alimentos

Para procurar la inocuidad y alargar la vida útil de los alimentos, a nivel industrial se han utilizado diferentes desinfectantes comerciales entre los que se encuentran: hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ozono, agua electrolizada y compuestos cuaternarios de amonio (QACs, por sus siglas en inglés) (Yuan et al., 2020). Tomar en cuenta las ventajas y desventajas de los desinfectantes, resultan ser valiosos criterios de selección (Tabla 3). A excepción de los QACs, el mecanismo de acción de estos compuestos se asocia con su capacidad para oxidar de distintos componentes celulares en diferentes proporciones, mientras que los QACs se clasifican como detergentes catiónicos, presentando interacciones con los fosfolípidos presentes en la membrana bacteriana ocasionando su ruptura (Mandigan et al., 2015a).

Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de los desinfectantes empleados en la industria de los alimentos.

Desinfectante	Ventajas	Desventajas
Hipoclorito de sodio	Económico, ampliamente disponible y efectivo a bajas concentraciones.	Corrosivo, genera productos tóxicos, afectado por el pH y materia orgánica.
Dióxido de cloro	Menos corrosivo, efectividad a un amplio rango de pH y a bajas concentraciones, poca interacción con materia orgánica, menos subproductos dañinos.	Sumamente inestable y explosivo.
Peróxido de hidrogeno	Amigable con el ambiente, fácil de usar.	Costo relativamente alto, inestable.
Ácido peracético	Efectividad a bajas temperaturas, y baja concentración en un amplio	Corrosivo, inestable, costo relativamente alto.

	rango de pH, poca interacción con materia orgánica.	
Compuestos cuaternarios de amonio	Estables, no corrosivos, amigable con el ambiente, inodoro y efectivo a un amplio rango de pH.	Afectado por materia orgánica.
Ozono	Alta efectividad a bajas concentraciones, no forma residuos.	Costo elevado, corrosivo en acero, goma y plástico.
Agua electrolizada	Fácil de operar, bajo costo, desinfección efectiva, amigable con el ambiente, amplio espectro bactericida.	Corrosivo, baja vida de anaquel, efecto negativo en propiedades organolépticas, afectado por materia orgánica.

Referencia: modificado de Yuan et al., 2020.

2.5 Resistencia a los desinfectantes

Actualmente una de las mejores estrategias para erradicar la presencia de bacterias indeseables en la industria de alimentos y el área hospitalaria, es el empleo de desinfectantes (Bragg et al., 2018). Dichos compuestos han sido herramientas de uso destacado en la industria de los alimentos, el sector agrícola, entornos hospitalarios, la industria de cosméticos y de productos farmacéuticos, y en el hogar. La acelerada aparición de resistencia de los microorganismos a los agentes desinfectantes se atribuye principalmente al mal uso y abuso de los mismos (Mc-Carlie et al., 2019).

El uso de desinfectantes por debajo de los niveles adecuados (concentración mínima inhibitoria), promueve la aparición de la resistencia en los microorganismos. En consecuencia, su manejo inadecuado conlleva de manera directa a un incremento en el riesgo de la propagación de bacterias resistentes a los

desinfectantes, así como la aparición de resistencia cruzada con los antibióticos, sobre todo cuando los microorganismos emplean los mismos mecanismos para la supervivencia; por ejemplo, las bombas de flujo que participan en ambos procesos (Yuan et al., 2020). Para evitar que los microorganismos generen resistencia a los desinfectantes en la industria se recurre a la rotación de desinfectantes de manera programada, para garantizar una adecuada desinfección y evitar que los microorganismos formen biopelículas, tal es el caso de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Cronobacter sakazakii* (Gnanadhas et al., 2013).

2.5.1 Mecanismo de resistencia a los desinfectantes

Se describen dos mecanismos principales en materia de resistencia a los desinfectantes: 1. Resistencia intrínseca. Se refiere a una reducción en la susceptibilidad a un desinfectante como consecuencia de propiedades naturales mostradas por la célula y se encuentra presente mayormente en microorganismos Gram negativos.

2. Resistencia extrínseca o adquirida. Es aquella que resulta de mutaciones en genes codificados cromosómicamente, la adquisición de plásmidos o transposones (Bragg et al., 2018).

En la Figura 5 se presentan varios mecanismos de resistencia a desinfectantes empleados por las bacterias (Gnanadhas et al., 2013). Dentro de la resistencia intrínseca se encuentran alteraciones fenotípicas, bombas de expulsión, alteración de la diana y la inactivación del desinfectante, mientras que la resistencia extrínseca se basa en la transferencia horizontal de material genético (Mc-Carlie et al., 2019).

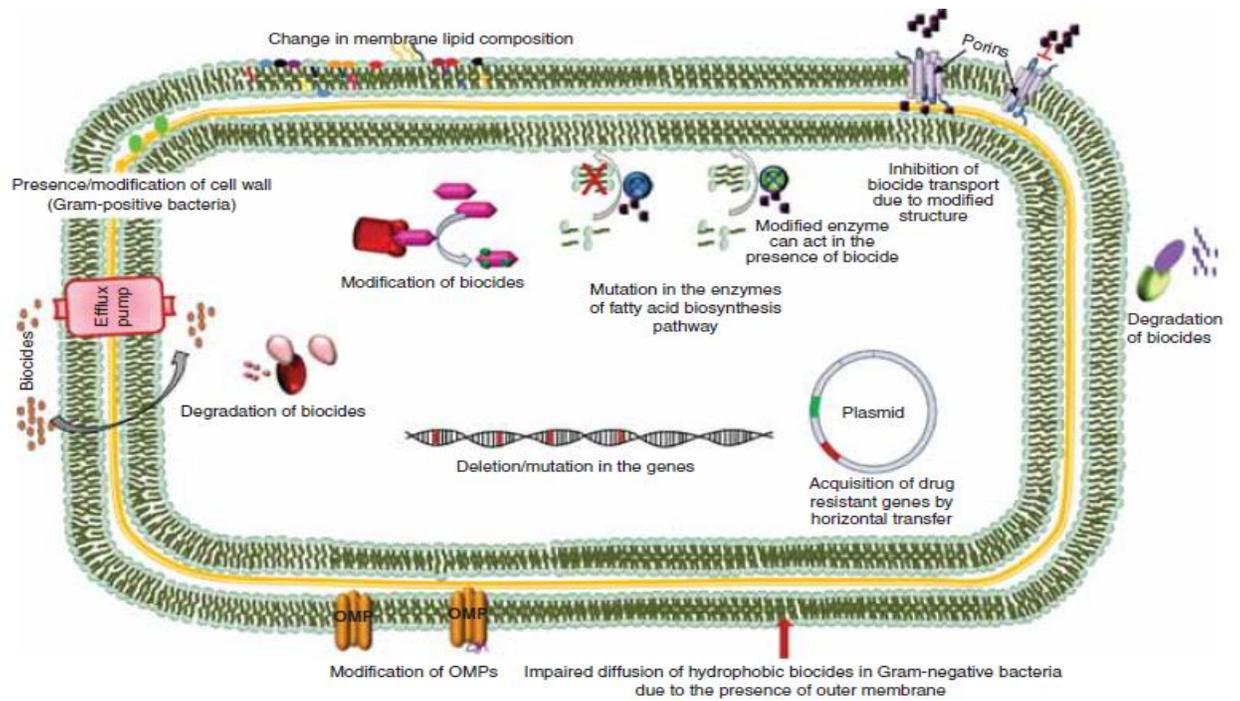


Figura 5. Mecanismos de resistencia a desinfectantes en bacterias (Gnanadhas et al., 2013).

Los cambios fenotípicos ocasionan variaciones en la sensibilidad a los desinfectantes, como consecuencia de las diferencias entre la composición celular y la fisiología. Tal como ocurre en la tinción de Gram en materia de afinidad a los colorantes, al enfrentarse a estos agentes antimicrobianos las bacterias de Gram negativas exhiben una resistencia intrínseca dada la presencia de una capa de lipopolisacárido que restringe el acceso a la membrana externa (Bragg et al., 2018). La formación de biopelículas constituye otra forma de la resistencia intrínseca, y se identifican mecanismos como la reducción de la penetración del desinfectante, alteraciones fisiológicas en las células, producción de enzimas o compuestos neutralizantes, protección en biopelículas mixtas, la aparición de células persistentes y la interacción del propio desinfectante con la biopelícula (Figura 6) (Yuan et al., 2020).

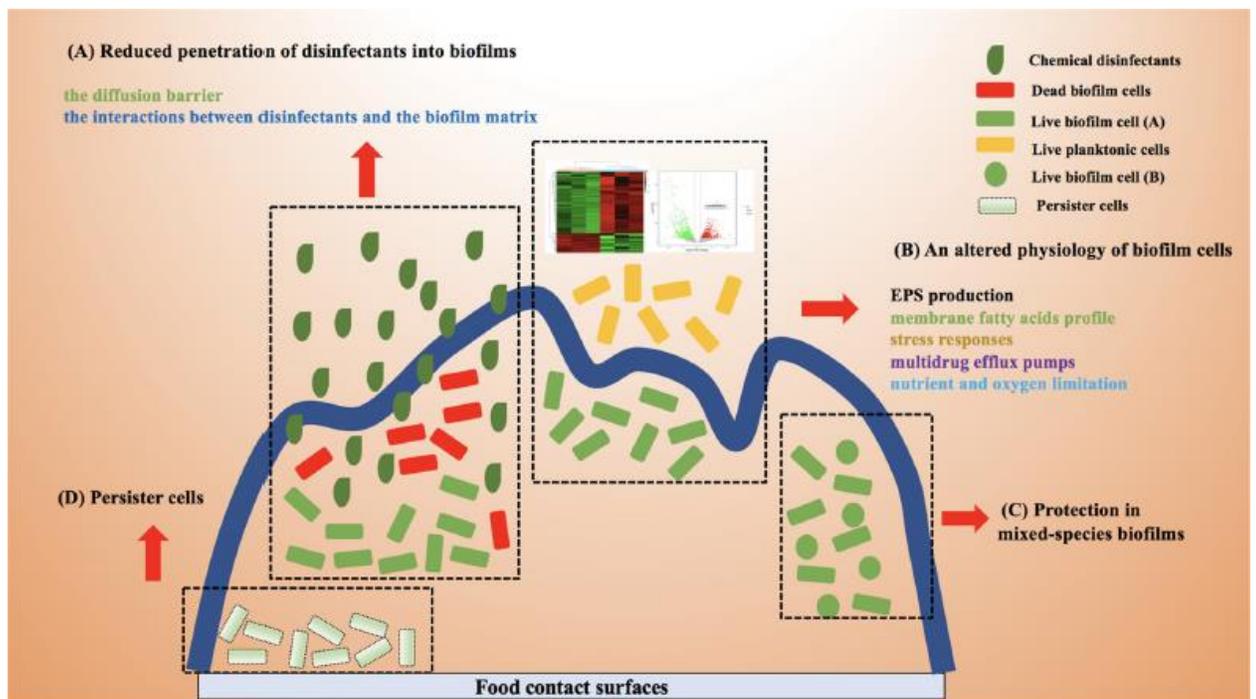


Figura 6. Principales mecanismos involucrados en la resistencia a desinfectantes químicos en biopelículas (Yuan et al., 2020).

Las bombas de expulsión se encuentran presentes a nivel de membrana y actúan básicamente captando al antimicrobiano desde el nivel citoplasmático, para expulsarlo hacia el exterior de la célula, con lo que se evita la llegada al sitio de acción. Este mecanismo se encuentra tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas, aunque está mayormente expresado en las primeras (Tafur et al., 2008).

En cuestión de la diana u objetivo del desinfectante además de sus modificaciones o alteraciones, los microorganismos han mostrado de igual manera la capacidad para su total inactivación o supresión. Dichas modificaciones en general se deben a mutaciones a nivel genómico que ocasionan cambios en el sitio de acción mayoritariamente la estructura y función proteica, lo que limita la efectividad del desinfectante dada la supresión de la interacción entre este y la superficie celular. El último de los mecanismos intrínsecos del que se valen las bacterias es la

inactivación del desinfectante por efecto de procesos enzimáticos, siendo un ejemplo lo que ocurre en el caso de los antibióticos β -Lactámicos por efecto de las β -lactamasas. En el caso de los desinfectantes las enzimas involucradas se pueden dividir en aquellas que transfieren grupos realizando reacciones de nitración, alquilación, etc. y las que exhiben la capacidad de metabolizar al compuesto hacia intermediarios no tóxicos (Gnanadhas et al., 2013).

La transferencia horizontal de material genético representa consecuentemente la aparición de bacterias resistentes. Desde los años 60 se tenía dilucidado el hecho de que los plásmidos podían conferir resistencia a los antibióticos, desinfectantes, metales pesados. Algunos de estos elementos móviles codifican para o-fosfotransferasas, o-adeniltransferasas y n-acetiltransferasas que son enzimas que han sido reportadas como degradadoras de diferentes componentes de características biocidas (Rodríguez-Blanco et al., 2012).

2.5.2 Bases moleculares de la resistencia a los desinfectantes

La relevancia de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los desinfectantes radica en manejarlos a favor con el fin de limitar la propagación de elementos genéticos móviles para salvaguardar la eficacia de estos compuestos. En perspectiva general poco se sabe de la estructura de los genes que se asocian a la resistencia a los desinfectantes, aunque respecto al comportamiento de estos elementos móviles se ha visto que algunos se transfieren o pueden moverse dentro del mismo ADN tal es el caso de los de transposones, secuencias de inserción, integrones y casete de genes. Por otro lado, los elementos integrales conjugativos y los plásmidos son transferidos de una bacteria a otra. En algunos estudios se sabe que el movimiento genómico asociado a esta resistencia puede estar acoplado al de los antibióticos, lo cual en todo caso reafirma el concepto de la posibilidad de una resistencia cruzada (Kim et al., 2018) En la Figura 7 se muestran algunos de estos elementos genéticos movilizados mediante transferencia horizontal intracelular e intercelular, entre una célula donante y una célula receptora (Mc-Carlie et al., 2019).

Los transposones y las secuencias de inserción, se caracterizan por tener la capacidad de moverse casi al azar hacia nuevas posiciones dentro del mismo ADN o diferentes moléculas de ADN dentro de una misma célula, transportando de esta manera diversos genes de resistencia. Las secuencias de inserción pueden además formar transposones compuestos e influir en la expresión génica incorporando fuertes promotores río arriba del sitio de inserción. Otro tipo de transposones son los unitarios que suelen ser de mayor tamaño que las secuencias de inserción y se encuentran flanqueados por repeticiones de inversión, en materia de resistencia a los antimicrobianos se han asociado las super familias Tn3 y Tn7 (Partridge et al., 2018).

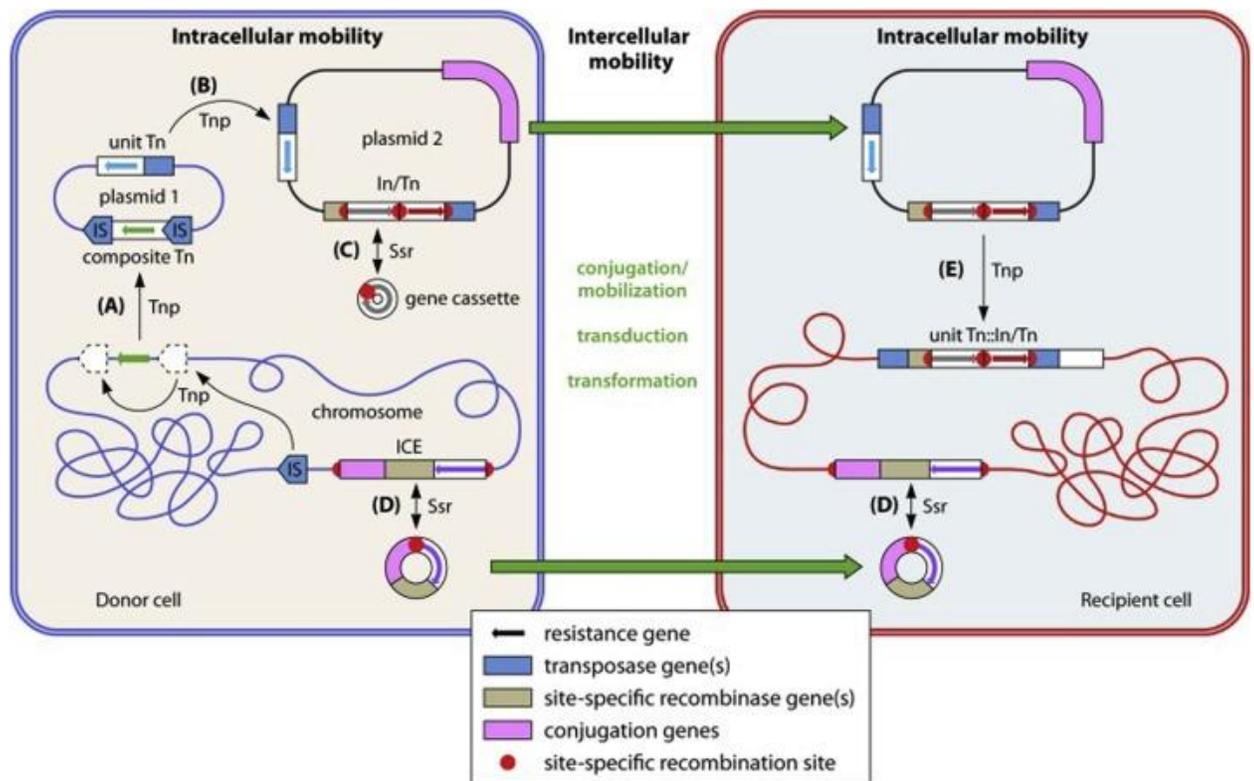


Figura 7. Elementos genéticos movilizados por transferencia horizontal dentro de las células bacterianas (Mc-Charlie et al., 2019).

Existen pequeños fragmentos de ADN que se encuentran asociados a un integrón o a una estructura circular denominados como casetes de genes, que suelen

constar de uno o dos genes que carecen de un sitio de recombinación y un promotor. Los integrones son elementos caracterizados por un gen intl, un promotor y un sitio de recombinación, lo que permite el movimiento de los diferentes genes de resistencia hacia sitios definidos donde son sometidos a un proceso de recombinación específica de sitio. A menudo estos integrones se pueden hallar en múltiples copias a lo largo de todo el genoma lo que facilita también la recombinación de tipo homóloga (Mc-Carlie et al., 2019).

Los plásmidos han sido mayormente estudiados en las enterobacterias, definiéndose en la mayoría de los casos una función. Los primeros en ser descubiertos fueron los F o factor de fertilidad; en estos pueden estar presentes varios sistemas de partición y toxina-antitoxina, además de conjuntar varios genes de resistencia y virulencia, lo que ocasiona la formación de un vasto grupo de plásmidos con estructura de mosaico. Los de tipo H dan lugar a pili asociándose a resistencias de tipo fenotípica a los metales pesados, bacteriófagos, colicina y antibióticos. Los plásmidos L/M portan genes de resistencia a los antimicrobianos en la región de inhibición de transferencia, lo que ocasiona una mayor eficiencia en la conjugación. Finalmente, los de tipo N y P también han mostrado la capacidad de conferir resistencia a diversos antimicrobianos, exhibiendo una región de control central que permite regular de manera estricta los procesos de replicación y conjugación (Partridge et al., 2018).

Los elementos de integrales conjugativos se acoplan a estructuras conocidas como islas genómicas, que constituyen una parte del cromosoma bacteriano que no es nativo y su transferencia horizontal está mediada por fagos. Dichos elementos se integran en el genoma del huésped donde se expresan para posteriormente ser eliminados, aunque también pueden auto transmitirse mediante la conjugación, confiriendo de esta manera fenotipos ventajosos para la célula hospedadora tal es el caso de la resistencia a los desinfectantes (Mc-Carlie et al., 2019).

2.5.3 Resistencia de *Listeria monocytogenes* a los desinfectantes

Las diferentes especies del género *Listeria* muestran la capacidad de intercambiar determinantes de resistencia con otras bacterias, sirviendo de ejemplo la identificación del gen TetM de resistencia a las tetraciclinas en dos cepas de *L. monocytogenes* que fue análogo al presente en *S. aureus*, aunque no se descarta la posibilidad de que además de obtener resistencia a los antibióticos por transferencia horizontal, también lo puedan hacer hacia los desinfectantes. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios en donde se identifiquen los genes involucrados en dicho intercambio para este género (Matereke et al., 2020).

En relación con la resistencia y tolerancia hacia los QACs, las bombas de eflujo son consideradas el principal mecanismo expresado por *Listeria*, siendo la bomba MdrL la mayormente encargada de la expulsión de los agentes antimicrobianos y los metales pesados hacia el exterior. Esta bacteria ha mostrado contener al menos dos determinantes genéticos que favorecen la tolerancia a estos compuestos siendo el *qacH* que se encuentra altamente conservado en el transposón Tn6188, el que ocasiona un incremento en la expresión de bombas de flujo lo que contribuye en gran medida a su persistencia. Otros componentes son los codificados por el gen *bcrABC*, que son transportadores que pertenecen a una pequeña familia de proteínas de multirresistencia a fármacos (Møretrø et al., 2017b).

Distintos compuestos a base de cloro tal como el hipoclorito de sodio o el dióxido de cloro gaseoso han demostrado ser eficaces en contra de *L. monocytogenes*. Hasta el momento no se ha descrito tolerancia hacia este tipo de compuestos por parte del patógeno. Sin embargo, en un estudio desarrollado por Lundén et al. (2003) evidenció la posibilidad de que exista, ya que en experimentos que realizó con cultivos del patógeno en presencia de distintas concentraciones del desinfectante, observó un aumento en la concentración mínima inhibitoria previamente determinada.

Los desinfectantes ácidos como el ácido peracético causan daños a nivel de membrana que consecuentemente llevan a la muerte de la célula. Para el caso de

L. monocytogenes está más que demostrada su supervivencia a bajas condiciones de pH, lo que no solo favorece la supervivencia, sino que genera un incremento en la virulencia de las cepas. Los mecanismos de resistencia involucrados se basan en el mantenimiento de la homeostasis a nivel intracelular siendo el que involucra a la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) codificada por los genes *gadD1*, *gadD2* y *gadD3* uno de los principales, realizando la conversión irreversible de glutamato en un compuesto neutro denominado γ -Aminobutirato (GABA) mediante una reacción de descarboxilación a nivel citosólico. La producción de GABA tiene una doble función protectora ya que en primer lugar consume protones a nivel intracelular generando un incremento del pH y mediante su expulsión contribuye a la neutralización de pH fuera de la célula (Feehily et al., 2014).

Se ha demostrado que, para los tres desinfectantes abordados previamente, la formación de biopelículas por un microorganismo patógeno involucra diferentes factores y respuestas que promueven la resistencia a desinfectantes. En los QACs, al ocurrir cambios en la fluidez de membrana por efecto de la disminución de la proporción de los ácidos grasos de cadena ramificada y un aumento significativo en la cantidad de ácidos grasos saturados, se traduce en un incremento en la hidrofobicidad y la adherencia a las diferentes superficies. Por otro lado, en los compuestos a base de cloro, se ha observado un efecto relevante de la superficie donde se encuentra embebida la biopelícula, así como la presencia de otras bacterias en la biopelícula que pudieran contribuir a la persistencia del patógeno. Finalmente, la tolerancia a los ácidos orgánicos depende de la cepa, la edad de la biopelícula y la superficie en donde se esté produciendo, aunque se ha observado un incremento en la adherencia cuando existen condiciones ácidas en el entorno, así como el efecto protector que ejercen las bacterias ácido lácticas en biopelículas mixtas (Rodríguez-López et al., 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos denominados listos para el consumo o “ready-to-eat”, incluidas las frutas y hortalizas congeladas, han tomado importancia en los últimos años. Desafortunadamente este tipo de alimentos han sido implicados en brotes de listeriosis, la cual es una enfermedad con una elevada letalidad y que afecta a grupos vulnerables de la población.

La persistencia de *L. monocytogenes* en los ambientes de producción de los alimentos se ha asociado con su capacidad para formar biopelículas y la resistencia a compuestos empleados en la desinfección, convirtiéndose en uno de los factores críticos para la contaminación de los productos. En el caso de los compuestos cuaternarios de amonio (QACs) los cambios en el perfil lipídico a nivel membranal cuando las células están inmersas en biopelículas, así como la expresión de determinantes genéticos como los genes *qacH* y *bcrABC* limitan la efectividad del desinfectante para erradicar al patógeno en el entorno de producción.

Las especies no patógenas del género *Listeria* también suelen estar presentes en los ambientes de producción de alimentos. Sin embargo, la información acerca de la interacción entre las especies no patógenas del género *Listeria* y *L. monocytogenes* en biopelículas es escasa.

Se especula, que la presencia de las especies del género no patógenas con capacidad para producir biopelículas podría favorecer la persistencia de la especie patógena y el intercambio de genes de resistencia a desinfectantes. Esto representaría un grave problema, ya que podría considerarse otro factor medular en la persistencia del patógeno en los entornos de producción, implicando una profunda reflexión sobre la aceptación del establecimiento de especies no patógenas en el mismo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar las interacciones (sinergismo/antagonismo) entre especies no patógenas del género *Listeria* y *L. monocytogenes* en biopelículas y determinar si ocurre el intercambio de genes asociados con la resistencia a QACs cuando se encuentran inmersas en biopelículas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar cepas de *Listeria* spp. aisladas a partir de muestras ambientales colectadas en una planta procesadora de hortalizas congeladas.
2. Caracterizar las cepas de *Listeria* spp. con base a su capacidad formadora de biopelículas y a la presencia de genes asociados con la resistencia a QACs.
3. Determinar el efecto sinérgico o antagónico de cepas de *Listeria* spp. sobre *L. monocytogenes* en biopelículas formadas en cultivo mixto.
4. Evaluar la transferencia de genes asociados con la resistencia a QACs de cepas de *Listeria* spp. a *L. monocytogenes* en biopelículas mixtas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales y equipos.

- Material biológico:
 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
 - *Listeria innocua* ATCC 33090
 - *Listeria seeligeri* ATCC 35967
 - *Listeria ivanovii* ATCCC 19119
 - *Listeria welshimeri* ATCC 43550
 - *Listeria grayi* ATCC 700545
 - Suspensiones celulares de *Listeria* spp.

- Medios de cultivo:
 - Caldo soya tripticaseína (CST), Dibico®
 - Agar soya tripticaseína (AST), Dibico®
 - Caldo neutralizante (CN), Dibico®
 - Diluyente de peptona (DP), Bioxon®
 - Rapid' *L.mono* (RLM), Biorad®
 - Extracto de Levadura (EL), BD Bioxon®

- Reactivos:
 - Ácido acético glacial, Reactivos Meyer®
 - Ácido bórico, Reactivos Meyer®
 - Agarosa ultrapura, Bioline®
 - Agua libre de nucleasas, IDT®
 - Alcohol etílico absoluto, Reactivos Meyer®
 - Alcohol metílico absoluto, Reactivos Meyer®
 - Cloruro de sodio, Karal®
 - Cristal violeta (CV), Reactivos Meyer®
 - EDTA, Invitrogen®
 - Glicerol, Reactivos Golden Bell®

- Gotaq Green PCR Master Mix, Promega®
- Marcador de peso molecular 100 pb, Biorad®
- Rapid' *L.mono* agar supplement 1, Biorad®
- Rapid' *Listeria* supplement 2, Biorad®
- Rifampicina, Sanofi-Aventis®
- Sybr safe gel DNA stain, Invitrogen®
- Tris, Invitrogen®
- Servi-Quirofenol, ServiHigiene®
- Equipos: Los equipos empleados se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Marca y modelo de equipos empleados.

Equipo	Marca	Modelo	Lugar y País
Agitador mecánico	Daigger 2	G-560	Buffalo Grove, IL, USA
Aqualab	Aqualab	CX-2	Pullman, WA, USA
Autoclave	All American	1915x	Manitowoc, WI, USA
Balanza analítica	Denver Instrument	APX-602	Arvada, CO, USA
Campana de flujo laminar	BSC/18000 II B2/X	N/A	Benito Juárez, CDMX, México
Cámara de electroforesis	BioRad	CHEF-DR-II	Hercules, CA, USA
Centrifuga	Dynamica	Dynam-D3-V15U-110	Livingstong, WL, UK.

Cuenta colonias	Quebec Reichert	3327	Depew, NY, USA
Fotodocumentador	Enduro GDS	Enduro GDS	Edison, NJ, USA
Incubadora	Precision Scientific	815	Buffalo, NY, USA
Lector de microplacas	Thermo Scientific	Multiskan 60	Waltham, MA, USA
Micropipetas 1-1000 µL	DLAB, Thermo Scientific	N/A	Rowland, CA, USA; Waltham, MA, USA
Plato caliente	Thermo Scientific	SP131325	Waltham, MA, USA
Potenciómetro	Hanna	J0087173	Woonsocket, RI, USA
Refrigerador	CIFII	N/A	París, FRA
Termobloque	Eppendorf	Thermo ST AT Plus	Enfield, CT, USA
Termociclador	Applied Biosystems	Veriti ENG-1326	Waltham, MA, USA
Ultracongelador	Froilabo	N/A	Meyzieu, FRA

5.2 Métodos

La estrategia general que se siguió para el desarrollo del presente proyecto se encuentra resumida en la Figura 8.

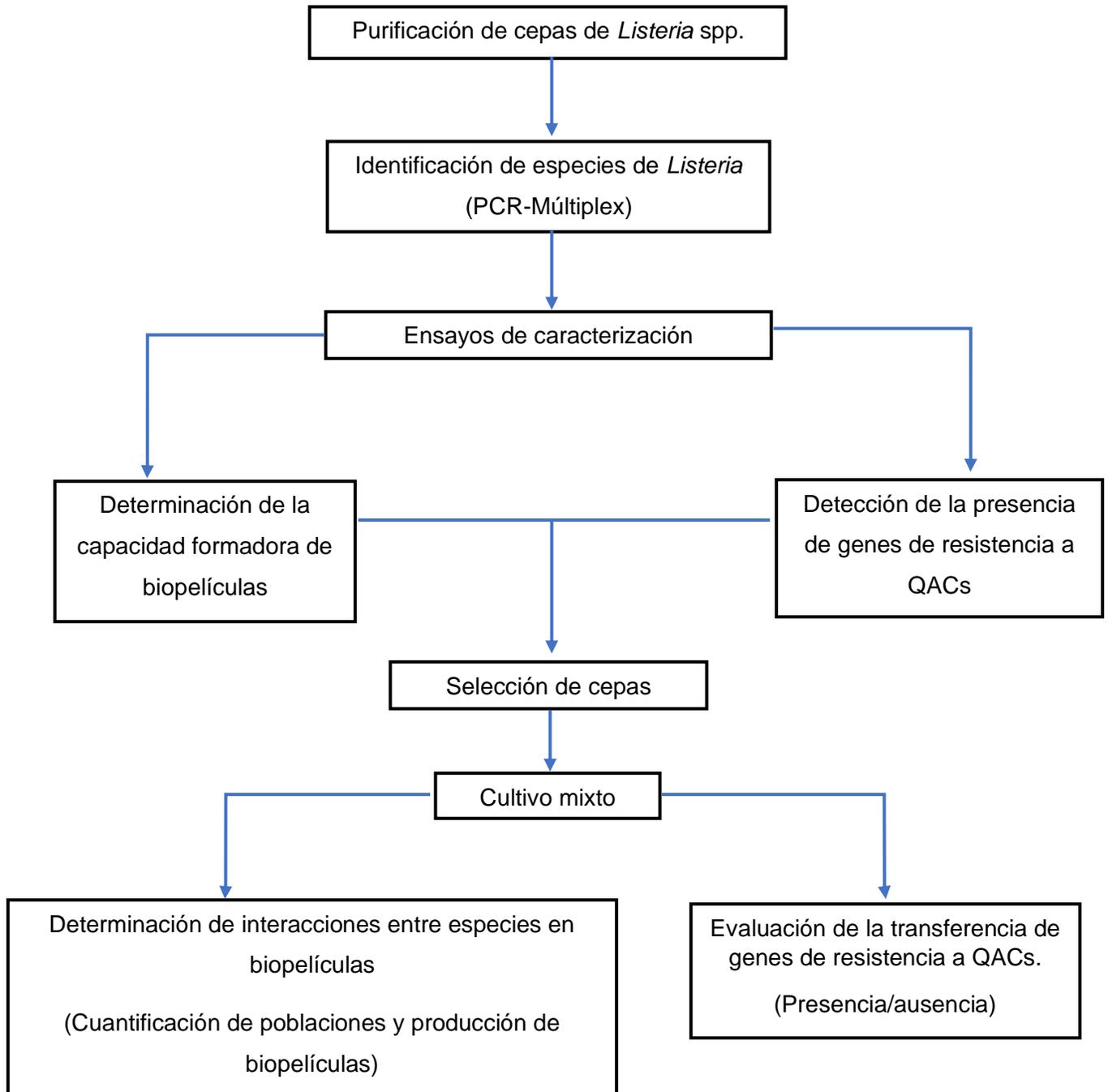


Figura 8. Estrategia general de trabajo

6. METODOLOGÍA

6.1 Identificación de especies del género *Listeria*

6.1.1 Activación de cepas de *Listeria*

Se emplearon un total de 119 suspensiones celulares de *Listeria* spp. obtenidas en un estudio previo realizado por el LECRIMA a partir de muestras ambientales colectadas en una planta procesadora de hortalizas congeladas. Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de placas de MOX y se conservaron en caldo soya tripticaseína (CST) adicionado de glicerol (15 %) a -70 °C. En 2019 se obtuvieron 59 viales y en 2021 60. Se tomó una alícuota de los viales evitando su total descongelación y se transfirió a caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) y se incubaron a 36 °C por 24 h. Al concluir el tiempo de incubación se realizaron diluciones decimales transfiriendo 1 mL a 9 mL de diluyente de peptona (DP) y se inocularon placas del medio cromogénico RLM con 100 µL de todas las diluciones mediante el método de extensión en superficie descrito por Camacho et al. (2009). Las placas se incubaron a 36 °C de 24 – 48 h. Se describió la morfología macroscópica de las diferentes colonias obtenidas, y se realizaron pases consecutivos a placas de agar soya tripticaseína (AST) hasta obtener un cultivo puro. Una vez alcanzado el nivel de purificación se procedió al almacenamiento en caldo soya tripticaseína con glicerol a -70°C.

6.1.2 Identificación de especies del género *Listeria*.

La identificación presuntiva de las especies de *Listeria* spp. se realizó cultivando las cepas puras en el agar RLM. El medio RLM permite distinguir las diferentes especies del género *Listeria* por la presencia de una fosfolipasa específica para fosfatidil inositol (PI-PLC) que genera la formación de colonias azul/verdosas y por la capacidad para fermentar el monosacárido xilosa (X) lo que hace virar el indicador del medio generándose halos amarillos alrededor de las colonias. Se realizó la activación en CSTEL incubando a 36 °C por 24 h sembrando posteriormente con asa calibrada a 0.01 mL mediante estría cruzada; las placas se incubaron a 36 °C

por 24-48 h. Posterior al periodo de incubación se realizó la lectura y registro de los resultados obtenidos acorde a lo que se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Coloración de las colonias para cepas de *Listeria* spp en el agar cromogénico RLM

Especie	PI-PLC	Xilosa	Coloración de colonias
<i>L. grayi</i>	-	-	Blancas
<i>L. innocua</i>	-	-	Blancas
<i>L. ivanovii</i>	+	+	Azul/verdosas con halo amarillo
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	Azules
<i>L. seeligeri</i>	-	+	Blancas con halo amarillo
<i>L. welshimeri</i>	-	+	Blancas con halo amarillo

Adicionalmente, la confirmación de las especies de *Listeria* se llevó a cabo mediante un método de PCR-Múltiplex estandarizado, a partir de lo descrito por Ryu et al., (2013) empleando los iniciadores de la Tabla 6.

Tabla 6. Iniciadores utilizados para PCR-Múltiplex

Especie	Primer	Secuencia (5-3)	Amplicón (PB)	Ref.
Género	prs-F	GCTGAAGAGATTGCGAAAGA AG	370	Douth et al., 2004
	prs-R	CAAAGAAACCTTGGATTTGCG G		
<i>L. grayi</i>	JOgrayi-F	GCGGATAAAGGTGTTCCGGT CAA	201	Ryu et al., 2013

	JOgrayi-R	ATTTGCTATCGTCCGAGGCTA GG		
<i>L. innocua</i>	lin0464-F	CGCATTATCGCCAAACTC	749	Liu et al., 2003
	lin0464-R	TCGTGACATAGACGCGATTG		
<i>L. ivanovii</i>	liv22-228-F	CGAATTCCTTATTCACTTGAG C	463	Liu et al., 2004
	liv22-228-R	GGTGCTGCGAACTTAACTCA		
<i>L. monocytogenes</i>	lomo1030-F	GCTTGTATTCACTTGGATTTG TCTGG	509	Ryu et al., 2013
	lomo1030-R	ACCATCCGCATATCTCAGCCCA ACT		
<i>L. seeligeri</i>	Iseelin-F	GTACCTGCTGGGAGTACATA	673	Ryu et al., 2013
	Iseelin-R	CTGTCTCCATATCCGTACAG		
<i>L. welshimeri</i>	lwe1801-F	CGTGGCACAATAGCAATCTG	281	
	lwe1801-R	GACATGCCTGCTGAACTAGA		

Previo a la estandarización se realizó un análisis informático de las secuencias de los iniciadores en la plataforma Blast para conocer si existían posibles interacciones entre ellas. En función de los resultados se optó por separarlos en dos mezclas de reacción (Tabla 7). Brevemente, las cepas de *Listeria* spp. y las cepas ATCC indicadas en apartado 5.1 se reactivaron colocando 10 µL en un tubo con 3 mL de CSTEL, y se incubaron a 36 °C por 24 h. Una vez concluida la incubación se transfirió 1 mL a un tubo Eppendorf estéril, se centrifugó por 3 min a 12000 g, se decantó el sobrenadante y se lavó adicionando SSI (1mL). Se repitió el procedimiento y finalmente se resuspendió en agua destilada estéril (1 mL). La suspensión se colocó en un termobloque a 95 °C por 15 min y se enfrió en hielo por 10 min.

En una campana de flujo laminar se preparó la mezcla de reacción siguiendo las especificaciones listadas en la Tabla 7. Posteriormente se transfirieron 18 μL de la mezcla de reacción a un tubo Eppendorf y se adicionaron 2 μL del ADN bacteriano. Se realizó una PCR con desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 90 s y extensión a 72 °C por 90 s, y una extensión final a 72°C por 5 min.

Tabla 7. Mezclas de reacción para PCR-Múltiplex de *Listeria* spp.

PCR Múltiplex – I		PCR Múltiplex – II	
Volumen (μL)	Componente	Volumen (μL)	Componente
2.8	Agua libre de nucleasas	3	Agua libre de nucleasas
9	Go Taq Green PCR Master mix	9	Go Taq Green PCR Master Mix
0.5	prs-F (10 μM)	0.5	prs-F (10 μM)
0.5	prs-R (10 μM)	0.5	prs-R (10 μM)
0.8	lmo1030-F	0.5	lin0464-F (10 μM)
0.8	lmo1030-R	0.5	lin0464-R (10 μM)
0.8	liv22-228-F (10 μM)	1.2	Iseelin-F (10 μM)
0.8	liv22-228-R (10 μM)	1.2	Iseelin-R (10 μM)
1	JO grayi-F (10 μM)	0.8	lwe1801-F (10 μM)
1	JO grayi-R (10 μM)	0.8	lwe1801-R (10 μM)

Al concluir la PCR, se llevó a cabo la separación del producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Sybr safe gel DNA stain (Invitrogen®). Las condiciones del corrimiento fueron de 50 V durante 60 min para favorecer la separación adecuada. Enseguida el gel se reveló en un

fotodocumentador y la identificación de las especies tuvo como base el peso molecular del amplicón que se generó (Tabla 6).

6.2 Caracterización de cepas de *Listeria* spp.

6.2.1 Determinación de la capacidad formadora de biopelículas

Para realizar la determinación de la capacidad para formar biopelículas de cepas de *Listeria* spp. se empleó el ensayo de tinción con cristal violeta (CV) en microplaca tomando como base la metodología descrita por O'Toole et al. (2011) realizando las modificaciones pertinentes.

Las suspensiones de las cepas de *Listeria* spp. se activaron en CSTEL a 36 °C por 24 h. A cada uno de los 96 pocillos de una microplaca de poliestireno se adicionó CST (180 µL) y se inocularon por triplicado con 20 µL (1×10^6 UFC/mL) de cada una de las suspensiones celulares. En cada microplaca se dejaron 24 pocillos sin inocular como controles. Las microplacas se incubaron a 35 °C por 72 h. A las 24, 48 y 72 h. El desarrollo del microorganismo se midió en un lector de microplacas, evaluando la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}).

Después de medir el desarrollo, se determinó la formación de biopelículas. Para descartar las células planctónicas se decantó el caldo. Se realizaron dos lavados con 200 µL de SSI, se adicionó metanol al 99 % (200 µL) y se dejó actuar por 15 min. Se removió el metanol y se adicionó una solución de CV (200 µL) en una concentración del 0.1 % (p/v) por 5 min; se decantó el colorante y para la remoción del exceso de este se llevaron a cabo otros dos lavados con SSI para posteriormente dejar secar la placa a temperatura ambiente.

El contenido de la placa se solubilizó con 200 µL de ácido acético glacial al 30 % y la formación de biopelículas se midió a 595 nm (DO_{595nm}). Las cepas se clasificaron en cada punto de medición como no formadoras de biopelícula, débilmente formadoras de biopelícula, moderadamente formadoras de biopelícula y fuertemente formadoras de biopelícula. Dicha clasificación estuvo regida por puntos de corte que se establecieron acorde al esquema de Stepanović et al. (2000) en

función de la media de los valores de DO_{595nm} y desviación estándar de 24 controles que eran pocillos con CST sin inocular en cada réplica (Tabla 8).

Tabla 8. Esquema de clasificación de la capacidad formadora de biopelículas.

Clasificación	Valores de Densidad Óptica (DO)
Nulo	$OD \geq DOC$
Débil	$DOC < OD \leq 2DOC$
Moderado	$2DOC < OD \leq 4DOC$
Fuerte	$4DOC < OD$

OD: Densidad óptica, DOC: Densidad óptica control = $X \text{ DOC} + 3$ (Desviación Estándar DOC), 2DOC: Doble de la densidad óptica control, 4DOC: Cuádruple de la densidad óptica control.

Una vez obtenida la dinámica de formación de biopelículas, las cepas se clasificaron en base al perfil de formación de biopelículas que presentaron según lo descrito por Lucero-Mejía et al. (2020) donde se distinguen tres comportamientos: 1) no se genera biopolímero, 2) la producción de biopolímero incrementa conforme transcurre el tiempo y 3) la producción de biopolímero alcanza un máximo y posteriormente ocurre un decremento (Figura 9).

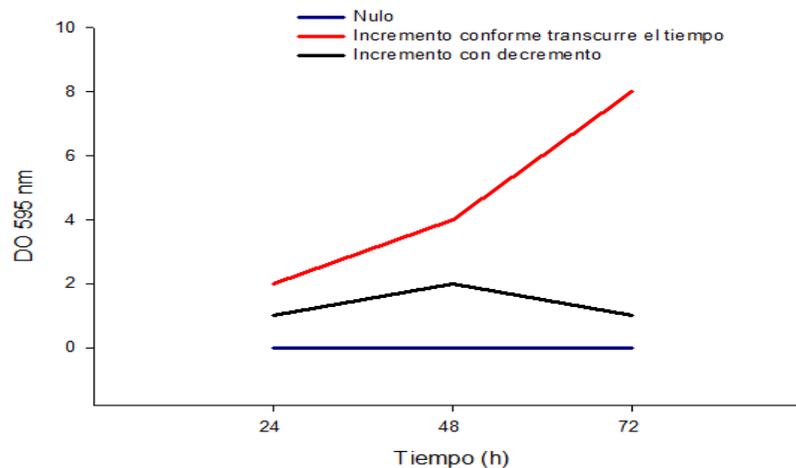


Figura 9. Perfiles de formación de biopelículas durante 72 h de incubación (Modificado de: Lucero-Mejía et al., 2020).

6.2.2 Detección de la presencia de genes de resistencia a QACs

Mediante un ensayo PCR punto final descrito por Møretrø et al. (2017b) se llevó a cabo la detección de genes involucrados con la resistencia a QACs. Se realizó el cultivo de las cepas en tubos con CSTEEL (3 mL) incubando a 36 °C por 24 h. Se transfirió 1 mL a un tubo Eppendorf y se realizaron dos lavados con SSI mediante centrifugación (12000 g por 3 min). Los paquetes celulares se resuspendieron en agua destilada estéril, y se calentaron en un termobloque por 15 min a 95 °C; enfriándose posteriormente en un congelador por 10 min.

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *qacH* fueron *qacH* fdw y *qacH* rev mientras que para el gen *bcrABC* se emplearon BcF y BcR (Tabla 9). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 20 µL donde 18 µL consistían en Gotaq Green Master Mix (Promega, México) con los cebadores en una concentración de 0.2 µM y 2 µL de ADN. Las condiciones de la reacción presentaron variaciones en función del gen a detectar. En el caso de *qacH* fueron 15 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 90 s para el alineamiento de los cebadores a 56 °C y 30 s de extensión a 72 °C, previos a una extensión final a 72 °C por 10 min. Para el gen *bcrABC* la temperatura de alineamiento de los iniciadores fue de 60 °C y el tiempo de extensión de 90 s.

Tabla 9. Primers empleados en la detección de genes de resistencia a QACs.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>qacH</i>	<i>qacH</i> fdw	ATG TCA TAT CTA TAT TTA GC	Müller et al., 2013
	<i>qacH</i> rev	TCA CTC TTC ATT AAT TGT AAT AG	
<i>bcrABC</i>	BcF	GAATGGATCCTTCAATTAGATCGAGGCACG	Elhanafi et al., 2010
	BcR	GTATGAATTCGTATAATCCGGATGCTGCCC	

La presencia de ambos genes se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Sybr safe gen DNA stain de manera individual debido a las diferencias en el tamaño del amplicón, por lo que fueron necesarias también diferentes condiciones de corrimiento. En el caso del gen *bcrABC* el corrimiento fue a 100 V por 35 min, mientras que para el gen *qacH* el tiempo se disminuyó a 15 min.

6.3 Evaluación del efecto sinérgico o antagónico sobre *Listeria monocytogenes* en biopelículas mixtas.

Una vez concluidos los ensayos de caracterización y en función de los resultados obtenidos, se aplicaron tres criterios para seleccionar las cepas para los experimentos de interacción (Tabla 10)

Tabla 10. Criterios de selección para ensayos de interacción con *L. monocytogenes*.

Criterio	Descripción
Presencia de genes de resistencia a QACs.	<i>qacH</i> y/o <i>bcrABC</i> están presentes
Especie	Especies no patógenas
Perfil de formación de biopelículas	-Incremento conforme transcurre el tiempo -Incremento con decremento

Tras aplicar estos criterios se seleccionaron 6 cepas aisladas en 2019 y 7 en 2021. El ensayo de interacción de cultivos mixtos en biopelículas formadas en superficies de acero inoxidable se llevó a cabo con la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 resistente a la rifampicina (R⁺) y cada una de las 13 cepas seleccionadas.

Superficies de acero inoxidable (1x1 cm) se colocaron dentro de tubos cónicos (15 mL), se agregó CST (2 mL) y se esterilizaron a 121 °C por 15 min. Se prepararon tres lotes de superficies y cada uno de los tubos se inocularon con 100 µL (1x10⁶ UFC/mL) de cada cepa a utilizar tanto de manera individual como en cultivo dual. Se incubaron a 35°C durante 4 h, se decantó el CST y se aplicaron dos lavados con

SSI estéril (2 mL). Las superficies del lote 1 se emplearon para estimar el porcentaje de adhesión, las del lote 2 para estimar la producción de polímeros y las superficies del lote 3 para dar seguimiento a las poblaciones durante el desarrollo de la biopelícula. A las superficies de los lotes 2 y 3 se les aplicó un lavado con CST y se colocaron sobre tapas de tubo cónico estériles dentro de un contenedor hermético ajustado con una solución saturada de K_2SO_4 a una humedad relativa del $95 \pm 2 \%$ y se incubaron a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 días. Tras este tiempo cada lote fue procesado según el propósito asignado.

6.3.1 Cuantificación de biopolímero en biopelículas mixtas.

A los 10 días de incubación, cada superficie de acero inoxidable se colocó en un tubo cónico (15 mL) donde se enjuagaron con agua destilada estéril (1 mL) y se tñieron con 2 mL de una solución de CV al 0.1 % (p/v) por 5 min. Después de la tinción se aplicaron otros dos enjuagues con agua destilada estéril para retirar el exceso de colorante. Las superficies lavadas se colocaron en un tubo limpio, se adicionó ácido acético glacial (1 mL) al 30 % y se homogeneizaron con un vórtex por 30 s. En una microplaca se colocaron 200 μL de cada muestra para medir la $DO_{595\text{nm}}$.

6.3.2 Cuantificación de células en biopelículas mixtas.

Las células de las especies no patógenas de *Listeria* y de *L. monocytogenes* se cuantificaron a las 4 h desde la inoculación para estimar el porcentaje de adhesión y a los 10 días de incubación.

Para ello, las superficies de acero inoxidable de manera individual se lavaron con SSI estéril (2 mL), se transfirieron a otro tubo estéril, se les añadió más SSI estéril (1 mL) y se homogeneizaron en un vórtex durante 30 s. A partir de la suspensión resultante se hicieron diluciones decimales seriadas y se sembraron por duplicado mediante extensión en superficie en placas de AST sin y con rifampicina para cuantificar las poblaciones de las cepas no patógenas de *Listeria* y de *L. monocytogenes* respectivamente. Finalmente, se estimó la densidad poblacional de cada una de las especies tanto en cultivo individual como en mixto.

6.4 Evaluación de la transferencia de genes de resistencia a QACs en biopelículas mixtas.

La evaluación de la transferencia del gen *bcrABC* se llevó a cabo a partir de las colonias obtenidas mediante el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2. En los ensayos de cultivo mixto (cepa no patógena de *Listeria* – cepa *L. monocytogenes* ATCC 19115) a partir del análisis de cada superficie de acero inoxidable se recuperaron con un asa todas las colonias de desarrollaron en placas de ASTR y que correspondían a la cepa de *L. monocytogenes* resistente a rifampicina. Las colonias se resuspendieron en agua destilada estéril (1 mL) para realizar la extracción del ADN siguiendo la metodología descrita previamente en el apartado 6.3

Finalmente se realizó el análisis mediante PCR según lo descrito en el apartado 6.2.2. La presencia del gen *bcrABC* en la cepa de *L. monocytogenes* en los cultivos mixtos después de 10 días de incubación, indicó que la transferencia tuvo lugar.

6.4.1 Evaluación de la resistencia fenotípica a los QACs.

En las cepas de *L. monocytogenes* que adquirieron el gen *bcrABC*, se realizó la evaluación fenotípica tomando como base la NMX-BB-040-CFSI-1999. Métodos generales de análisis – Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas, con algunas modificaciones. Brevemente el día del experimento se prepararon 50 mL del desinfectante Servi-Quirofenol® en concentraciones subletales (150 ppm, 100 ppm) a las sugeridas por el fabricante (1:50, 200 ppm).

Se preparó una suspensión en SSI (3 mL) estéril de células recuperando con un asa todas las colonias de las placas de ASTR y ajustando a un porcentaje de transmitancia de 3-5% a una longitud de onda de 580 nm, asociado con una concentración aproximada de 1×10^8 acorde a la escala de Mc-Farland. Una alícuota de la suspensión celular (100 μ L) se inoculó en 9.9 mL del desinfectante a las diferentes concentraciones con homogeneización constante durante 30 s. En seguida 1 mL se transfirió a caldo neutralizante a partir del cual se realizaron diluciones decimales seriadas y se cuantificaron las poblaciones sobrevivientes

mediante el método de Miles-Misra en placas de ASTR; las placas se incubaron a 35 ° C por 24 h. Se determinó el porcentaje de reducción de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{CV} \quad (1)$$

Donde:

S =Células sobrevivientes UFC/mL

CV= Cuenta viable inicial UFC/mL

En todos los casos se empleó como control la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 sin el gen *bcrABC* para poder detectar diferencias en cuanto a la resistencia/tolerancia al desinfectante empleado.

6.5 Diseño y análisis estadístico.

El ensayo de caracterización de la capacidad formadora de biopelículas en cepas de *Listeria* spp. se realizó en cuatro réplicas con triplicado de muestra en cada ocasión.

La determinación del efecto del cultivo mixto sobre la capacidad de adhesión, cambio de poblaciones y capacidad formadora de biopelículas de *L. monocytogenes* se llevó a cabo empleando un diseño experimental completamente aleatorizado con tres réplicas con duplicado de muestra en cada ocasión.

Para los ensayos de detección de la transferencia de genes de resistencia a QACs a *L. monocytogenes* también se realizaron tres réplicas con duplicado de muestra en cada ocasión.

Para evaluar la producción de biopelículas y los cambios en las poblaciones bacterianas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey.

En los ensayos con cultivos duales para la evaluación de la capacidad de adhesión y los cambios en las poblaciones los factores evaluados fueron: cultivo (individual y

mixto) y el factor cepa (*L. monocytogenes* y *Listeria* spp.) según fuera el caso. En relación con la producción de biopelículas el factor evaluado fue la cepa en tres niveles: *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. y mixto.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey para obtener la significancia estadística en cuanto a la producción de polímero y número de UFC según aplique para los distintos casos.

Se utilizó el software JMP 8.0.0 para el análisis estadístico y el Sigma Plot 10.0 para la construcción de los gráficos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Identificación de especies del género *Listeria*

De manera general, se logró identificar seis especies del género *Listeria* en los cultivos analizados (Figura 10). Las seis especies de *Listeria* evaluadas en el presente estudio se identificaron en las muestras del 2019, mientras que en las del 2021 solamente se encontraron cuatro. Cabe destacar, que en ninguna de la muestra se observó la presencia simultánea de dos o más especies del género.

En el año 2019 las especies más presentes fueron *L. monocytogenes* (59 %) y *L. ivanovii* (17 %). Para el año 2021 *L. monocytogenes* (67 %) siguió siendo la especie más prevalente, seguida de *L. innocua* (27 %) destacando la ausencia de *L. grayi* y *L. ivanovii*. Globalmente *L. monocytogenes* (63 %) y *L. innocua* (17 %) fueron las especies detectadas con mayor frecuencia, mientras que *L. welshimeri* y *L. seeligeri* se encontraron presentes únicamente en el 3 % de las muestras respectivamente.

Las especies no patógenas del género *Listeria* y *L. monocytogenes* tienen nichos ecológicos comunes, siendo uno de los principales motivos para emplear *Listeria* spp. como indicador potencial de contaminación con el patógeno en ambientes de producción de alimentos (Palaiodimou et al., 2021). El estudio del microbioma que se encuentran ligado a los entornos de producción de alimentos ha permitido distinguir dos tipos: a) residente. aquellos microorganismos que pueden establecerse, crecer y formar poblaciones que permanecen; generalmente son microorganismos no patógenos los cuales son evaluadas constantemente mediante métodos de monitoreo, aunque su identidad e impacto en la calidad y seguridad alimentaria es generalmente desconocida; b) transitoria. son aquellos grupos microbianos que logran ser detectados de forma ocasional o por coincidencia y que posteriormente dejan de estar presentes en el entorno evaluado (Møretrø et al., 2017a). Es posible que algunas de las especies del género *Listeria* se hayan integrado al componente residente del microbioma del entorno donde se realizó la evaluación, mientras que las especies que se ausentaron pudieran representar la

fracción transitoria, tal vez por la falta de expresión de mecanismos de respuesta al estrés que permitieran su supervivencia.

Previamente se ha descrito que *Listeria* spp. puede contaminar alimentos en diferentes etapas desde la producción al aire libre o al interior de plantas de procesamiento o empacadoras (Townsend et al., 2021). La etapa de recepción de la materia prima puede tornarse crítica, ya que los productos contaminados con *Listeria* spp. representan una fuente importante para el ingreso de la especie patógena a las plantas de producción. Dicho lo anterior, Magdovitz et al. (2021) reportaron una incidencia de *Listeria* spp. del 44 % y 17 % en productos crudos (zanahoria, maíz, espinacas, chícharos y ejotes) que llegaron a plantas procesadoras de vegetales congelados durante los años 2018 y 2019, respectivamente. Un análisis de vegetales crudos en Corea reportó una prevalencia del 5 % de *Listeria* spp., siendo *L. innocua* la única especie detectada en las muestras (Choi et al., 2001). La evaluación de productos hortofrutícolas crudos obtenidos en diferentes puntos de venta durante los años 2018 y 2019 en Inglaterra, evidenció la presencia de *L. monocytogenes* (10.3 %) y *Listeria* spp. (14.1 %) en vegetales, mientras que en frutas el porcentaje de positividad de ambas fue del 0.9 % (Willis et al., 2020).

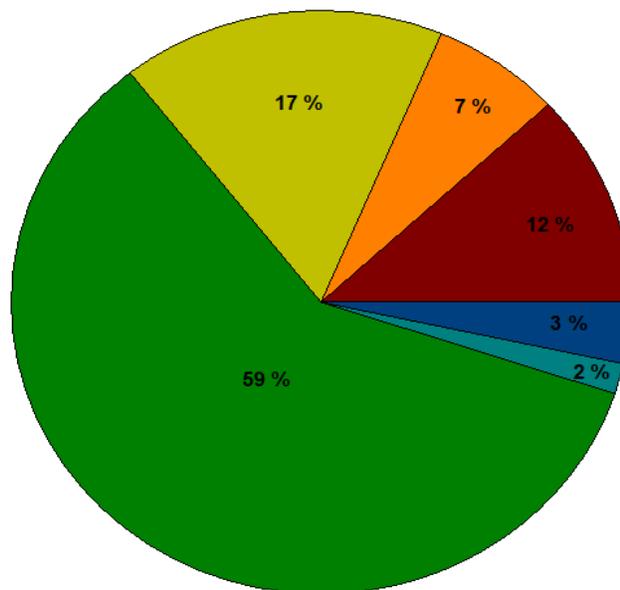
Estudios realizados en plantas procesadoras o de empaque de productos hortofrutícolas, demostraron que las superficies de contacto con alimentos tienen una menor presencia de las especies no patógenas del género *Listeria* y de *L. monocytogenes* respecto a las superficies de no contacto con alimentos (Truchado et al., 2022; Simonetti et al., 2021; Ruíz et al., 2021). En un estudio similar al contexto de este proyecto, en donde se llevó a cabo durante 23 meses un muestreo de vegetales congelados listos para el consumo y diferentes superficies de la cadena de su procesamiento, se encontró una prevalencia de *L. monocytogenes* del 1.20 %, y de *Listeria* spp. del 8.5 %. A pesar de la baja prevalencia del patógeno se sugirieron modificaciones a las medidas correctivas y se establecieron nuevos puntos de control para disminuir el riesgo de contaminación de los productos

(Aguado et al., 2004). A diferencia del estudio anterior, una evaluación que tuvo lugar en diferentes etapas de una línea productora de pimiento congelado en cubos y rodajas, arrojó una prevalencia del 27.8 % para *L. welshimeri*, 5.6 % para *L. innocua* y 4.6 % para *L. ivanovii*; destacando que no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* (Lee et al., 2007). En Polonia, se procesaron 213 muestras obtenidas del suelo, desagüe, bandas transportadoras y diferentes equipos en una planta procesadora de vegetales congelados, *L. monocytogenes* y *L. innocua* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia, representando en conjunto una prevalencia del 58 %, mientras que el resto de las *Listeria* spp. solo se detectaron en el 10 % de las muestras (Pappelbaum et al., 2008). Estos resultados contrastan con los hallazgos del presente estudio en donde las dos especies con mayor prevalencia (*L. monocytogenes* y *L. innocua*) fueron identificadas en el 80 % de las muestras, y las cuatro especies restantes (*L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) en el 20 %.

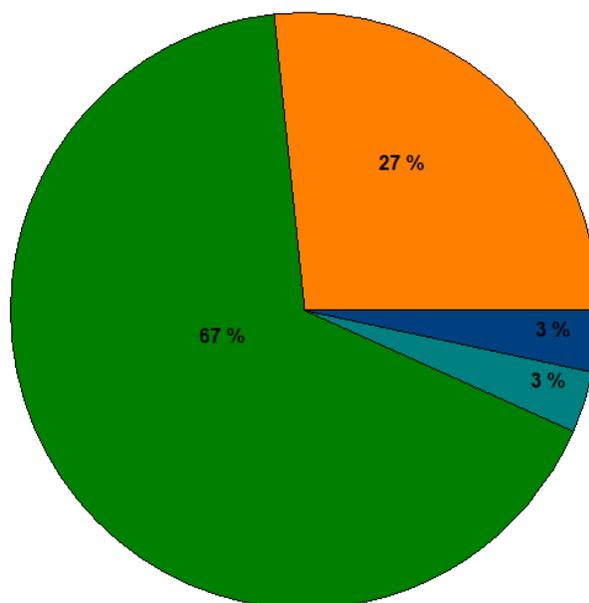
Estudios de la prevalencia de las especies de *Listeria* en otro tipo de alimentos se han realizado. En un estudio realizado en Marruecos, durante 2009 y 2015 realizó una evaluación microbiológica de productos lácteos, cárnicos (res, pollo), pasteles, ensaladas, harinas y mayonesas. Se detectó la presencia de *L. innocua* (5.2 %) y *L. monocytogenes* (1.5 %) en las muestras (Amajoud et al., 2018). En otro estudio llevado a cabo en Turquía se analizaron muestras de productos crudos de pollo y res; se encontró que las especies más prevalentes fueron *L. innocua* (35.5 %) y *L. monocytogenes* (26.6 %); en menor medida también fueron detectadas *L. seeligeri* (15.3 %), *L. grayi* (12.9 %), *L. welshimeri* (8.8 %) y *L. ivanovii* (4 %) (Arslan et al., 2018).

A las cepas les fue asignado el código MAVI, seguido de G (*L. grayi*), IV (*L. ivanovii*), INO (*L. innocua*), M (*L. monocytogenes*), S (*L. seeligeri*), W (*L. welshimeri*) y un número consecutivo según hubieran sido identificadas dentro de una misma especie. Por ejemplo: MAVI-IV1, la primera cepa de *L. ivanovii* identificada y así sucesivamente.

A)



B)



-  *Listeria grayi*
-  *Listeria innocua*
-  *Listeria ivanovii*
-  *Listeria monocytogenes*
-  *Listeria seeligeri*
-  *Listeria w elshimeri*

Figura 10. Especies de *Listeria* identificadas en cultivos provenientes de muestras colectadas en una planta procesadora de hortalizas congeladas. A) 2019, B) 2021

7.2 Caracterización de cepas de *Listeria*

7.2.1 Capacidad formadora de biopelículas

Una vez identificadas las especies de *Listeria*, se evaluó la capacidad de las 119 cepas para producir biopelículas durante un periodo de incubación de 72 h. En la Tabla A1 de la sección de anexos se reporta el inóculo empleado y la población recuperada a las 72 h (Log UFC/mL) y por otra parte los valores de la DO_{600nm} y DO_{595nm} obtenidos durante las mediciones se reportan en las Tablas A2 y A3 de la sección de anexos respectivamente.

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre la población recuperada a las 72 h y la DO_{595nm} a ese mismo tiempo (Figura 11). El valor de r^2 estimado con el presente análisis fue de 0.0003, lo cual permite dilucidar el hecho de que la producción de biopelícula no se encuentra directamente ligada a una mayor cantidad de biomasa, es decir que mientras una respuesta incrementa la otra sufre una disminución o no incrementan de manera simultánea y proporcional.

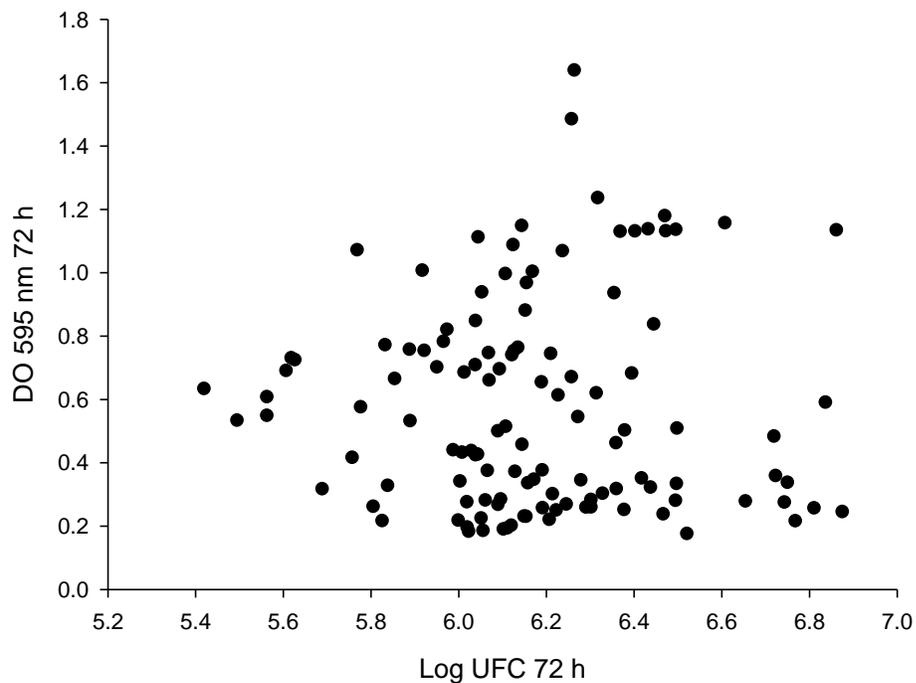


Figura 11. Correlación entre $DO_{595 nm}$ y LOG UFC (72 h).

Este resultado concuerda con lo descrito por Lucero-Mejía et al. (2020) en cepas de *Vibrio* spp. y previamente por Combrouse et al. (2013) para cepas de *L. monocytogenes* donde no se encontró correlación entre estas variables. Por otro lado, se ha encontrado correlación entre la capacidad para formar biopelículas y la producción de EPS (Maggio et al., 2021).

Se calculó el valor de DOC según lo descrito en la sección 6.2.1 y fue de 0.2915. Teniendo como base este valor se establecieron los criterios de clasificación de las cepas de *Listeria*: nula producción de biopelículas ($DO < 0.2915$), débil producción de biopelículas ($0.2915 > DO \leq 0.5831$), moderada producción de biopelículas ($0.5831 < DO \leq 1.662$) y fuerte producción de biopelículas ($1.662 > DO$). En la Tabla 11 se muestran los resultados de la clasificación de las cepas en función de la especie y del tiempo de incubación.

Independientemente de la especie, tras 24 h de incubación solamente el 1 % se clasificó como fuertemente formadoras de biopelículas, el 53 % como débilmente formadoras de biopelículas, el 27 % como moderadamente formadoras y el 19 % como no formadoras. A las 48 h ninguna cepa resultó ser fuerte formadora de biopelículas, hubo un incremento al 34 % de las cepas con moderada capacidad formadora de biopelículas, así como un decremento en la débil (49 %) y nula capacidad para formarlas (17 %). Finalmente, a las 72 h el 3 % se consideró como fuertemente formadoras de biopelículas, continuó prevaleciendo la capacidad moderada de formación de biopelículas (40 %), disminuyeron las débilmente formadoras (29 %) e incrementó el número de cepas no formadoras de biopelícula al 27 %.

Con relación a la especie e independientemente del tiempo de incubación el orden decreciente de producción de biopelículas fue: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Destaca el hecho de que ninguna cepa de *L. grayi* se consideró como moderada o fuertemente productora de biopelículas en los diferentes tiempos, mientras que solamente cepas de *L. monocytogenes* se consideraron como fuertemente productoras de biopelícula.

Tabla 11. Clasificación de cepas de *Listeria* spp. en función del nivel de producción de biopelículas.

Tiempo de incubación (h)	Especie	Nivel de producción de biopelículas ¹			
		Nulo	Débil	Moderado	Fuerte
24	<i>L. grayi</i>	1	6	0	0
	<i>L. innocua</i>	3	17	0	0
	<i>L. ivanovii</i>	0	9	1	0
	<i>L. monocytogenes</i>	17	28	29	1
	<i>L. seeligeri</i>	1	1	1	0
	<i>L. welshimeri</i>	1	2	1	0
Total		23	63	32	1
48	<i>L. grayi</i>	2	5	0	0
	<i>L. innocua</i>	1	12	7	0
	<i>L. ivanovii</i>	1	8	1	0
	<i>L. monocytogenes</i>	14	30	31	0
	<i>L. seeligeri</i>	1	2	0	0
	<i>L. welshimeri</i>	2	1	1	0
Total		21	28	40	0
72	<i>L. grayi</i>	6	1	0	0
	<i>L. innocua</i>	1	7	12	0
	<i>L. ivanovii</i>	8	2	0	0
	<i>L. monocytogenes</i>	13	23	35	4
	<i>L. seeligeri</i>	1	2	0	0
	<i>L. welshimeri</i>	3	0	1	0
Total		32	35	48	4

¹Número de cepas.

En la Figura 12 se muestra de manera gráfica la dinámica de formación de biopelículas durante 72 h a 35 °C de las seis especies de *Listeria* estudiadas. Las flechas rojas muestran la dinámica que siguió la formación de biopelículas dentro del grupo de cepas de cada especie. A medida que transcurrió el tiempo de incubación algunas especies (*L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) formaron biopelículas de manera temprana (24 h); sin embargo, al final de la incubación la cantidad de polímeros cuantificados disminuyó. Otras especies (*L. innocua* y *L. monocytogenes*) presentaron un incremento constante en el número de cepas productoras de biopelículas durante todo el almacenamiento.

Las cepas de *L. grayi* presentaron una disminución en la capacidad para formar biopelículas ocurriendo una transición de ser débilmente productoras a dejar de producirlas al concluir el periodo de incubación, con la excepción de la cepa MAVI-G1 cuya capacidad se mantuvo (Figura 12 A). Contrastando con estos resultados en Egipto, cepas de la misma especie aisladas de leche de diferentes bovinos presentaron una fuerte capacidad de adhesión al poliestireno (Osman et al., 2016).

Durante el periodo de incubación, en su mayoría las cepas de *L. innocua* incrementaron su capacidad para formar biopelículas conforme transcurrió el tiempo transitando de la débil producción hacia un nivel moderado de producción de biopelículas (Figura 12 B). Este comportamiento podría repercutir en complicaciones para limitar la presencia de esta bacteria en el entorno de producción. Algunos estudios han demostrado que esta especie presenta un patrón similar de formación de biopelículas que el observado en *L. monocytogenes* en ensayos realizados con cristal violeta (Costa et al., 2018). Lezzoum et al. (2019) reportaron que ambas especies tienen una fuerte capacidad para formar biopelículas sobre poliestireno tras 3 y 6 días de incubación a 37 °C en condiciones aeróbicas y microaerofílicas. De igual manera, en este mismo material, se describió que cepas de *L. innocua* presentan un incremento en la capacidad para formar biopelículas después de 72 h, aunque la producción es menor que la de cepas de *L. monocytogenes* (Zhou et al., 2011).

Nueve de las cepas de *L. ivanovii* evaluadas, alcanzaron durante las primeras 48 h el máximo de su capacidad para producir biopelículas, ocurriendo un cambio drástico a las 72 h. Solamente la cepa MAVI-IV2 mantuvo una débil producción de biopelículas durante el periodo de incubación (Figura 12 C). Un comportamiento similar se observó en cepas de esta especie que fueron comparadas contra algunas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en el mismo material, tras una incubación de 30 y 37 °C por 24 h (Real-Rocha et al., 2019). *L. ivanovii* ha demostrado capacidad para formar biopelículas en condiciones de pH ácidas (4-6), aunque esta capacidad puede verse afectada por variaciones en las concentraciones de NaCl presentes en el medio (Hasani et al., 2020). Previamente, algunos autores han referido el hecho de que la superficie puede tener un rol determinante en la capacidad formadora de biopelícula de esta especie, puesto que se encontró un mayor biovolumen en biopelículas formadas en superficies de grafeno y resina respecto a las formadas sobre vidrio y poliestireno (Rodríguez-Melcón et al., 2019).

Los cuatro niveles de producción de biopelículas se detectaron en las cepas de *L. monocytogenes* después de 24 h de incubación. A las 72 h de almacenamiento se incrementó la capacidad formadora de biopelículas en algunas cepas respecto a las 48 h de modo que el 50 % de las cepas tuvieron una capacidad de formación moderada/fuerte y solamente el 17 % fueron no formadoras (Figura 12 D).

En cuanto a los perfiles de formación de biopelícula el 73 % de las cepas incrementó su capacidad para formar biopelículas conforme transcurrió el tiempo; en el 17 % se detectó que alcanzaron un máximo en su producción de biopelículas a las 24 o 48 h y posteriormente ocurrió una disminución. Finalmente, el 10 % de las cepas de esta especie exhibieron capacidad para formar biopelículas. La gran capacidad para formar biopelículas que mostraron las cepas de *L. monocytogenes* coincide con datos reportados para cepas aisladas de carne, lácteos, agua, vegetales y sus respectivos ambientes de procesamiento que presentaron una moderada/fuerte capacidad formadora de biopelículas a temperaturas de incubación de 4, 25 y 37 °C (Kaptchouang et al., 2022). El serotipo puede influir en la capacidad para formar

biopelículas en cepas de *L. monocytogenes*. Algunas cepas obtenidas de muestras de humanos, animales y alimentos de los serotipos 1/2 a y 1/2 b en su mayoría tuvieron una capacidad fuerte/moderada para formar biopelículas a diferencia de cepas del serotipo 4b que en un 70 % se consideraron como débilmente formadoras de biopelículas (Doijad et al., 2015).

La capacidad para formar biopelículas en cepas de *L. seeligeri* (Figura 12 E) y *L. welshimeri* (Figura 12 F) fue baja al fluctuar generalmente entre nulos y débiles niveles de producción. Cepas de *L. seeligeri* aisladas de leche de vaca y bufalo mostraron una fuerte y débil adhesión al poliestireno respectivamente, y en ambos casos una moderada capacidad de adhesión al vidrio; mientras que cepas *L. welshimeri* tuvieron una fuerte adhesión al poliestireno, pero una débil hacia el vidrio (Osman et al., 2016).

Se ha reportado que algunos cambios en el ambiente influyen de manera importante sobre la capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Listeria spp.* Un ejemplo de lo anterior, es el hecho que la capacidad de *L. welshimeri* para formar biopelículas es más sensible a variaciones en el pH en comparación con *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (Hasani et al., 2020).

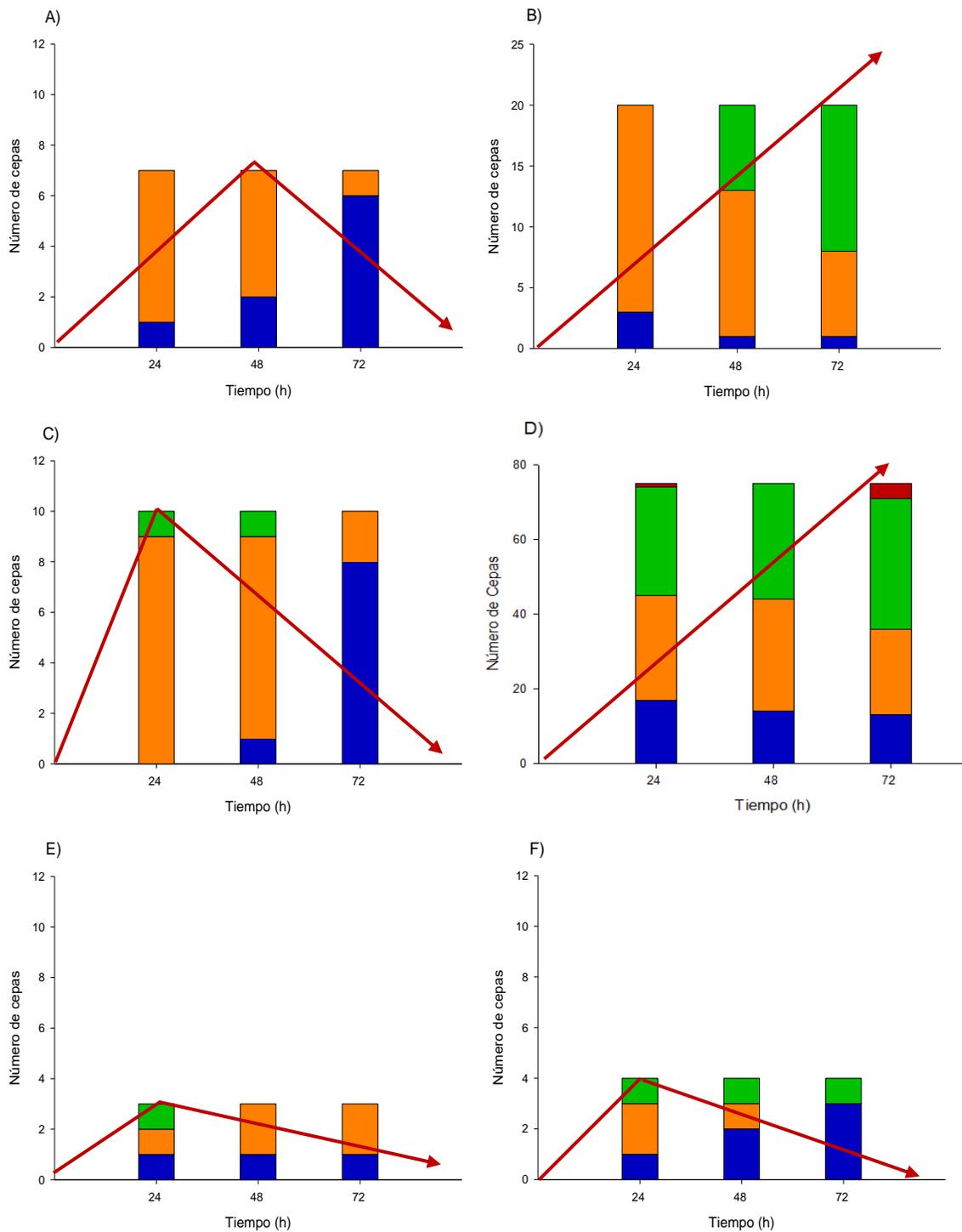


Figura 12. Dinámica de formación de biopelículas en cepas de *Listeria* spp. A) *L. grayi*, B) *L. innocua*, C) *L. ivanovii*, D) *L. monocytogenes*, E) *L. seeligeri*, F) *L. welshimeri*.

Nulo ■ **Débil** ■ **Moderado** ■ **Fuerte** ■

Las cepas también se clasificaron con base en el perfil de formación de biopelículas, (Tabla 12). El perfil más abundante fue el de incremento continuo conforme transcurre el tiempo (65 %), siendo *L. innocua* (19/20) y *L. monocytogenes* (55/75) las especies más asociadas. En contraparte, el 28 % de las cepas donde se concentraron mayormente las demás especies de *Listeria* spp (*L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*). tuvieron un incremento con posterior decremento y solamente el 7 % de las cepas (*L. monocytogenes* y *L. welshimeri*) no tuvieron la capacidad para formar biopelícula en ninguno de los tiempos evaluados.

Tabla 12. Perfil de formación de biopelículas en cepas de *Listeria* spp.

Perfil	Especie					
	LG	LINO	LIV	LM	LS	LW
Nulo	0	0	0	7	0	1
Incremento continuo	1	19	1	55	1	1
Incremento con posterior decremento	6	1	9	13	2	2

LG: *L. grayi*, LINO: *L. innocua*, LIV: *L. ivanovii*, LM: *L. monocytogenes*, LS: *L. seeligeri*, LW: *L. welshimeri*

Teniendo como base los perfiles de formación de biopelículas, concluyó que las estructuras que forman las especies *L. innocua* y *L. monocytogenes* presentaron una mayor estabilidad en la superficie de formación, lo que podría conducir a que persistan por más tiempo. Es probable que las biopelículas que forman estas dos especies permanezcan un mayor tiempo en la etapa de maduración, en la cual se inducen las rutas de síntesis de las sustancias poliméricas extra celulares (Flemming et al., 2016).

De igual forma, en la etapa de maduración ocurre la formación de una estructura altamente organizada y dependiendo de la cantidad de nutrientes presentes en el

medio se ha reportado una duración de 10 o incluso más días (Srey et al., 2013). La maduración hacia un biofilm diferenciado, el reclutamiento de otros microorganismos presentes en el entorno y el mantenimiento de las estructuras en un nivel tan alto de organización depende de un sistema intercelular de comunicación mediante señalizaciones químicas denominado como Quorum sensing (Saxena et al., 2019).

Las biopelículas generadas por cepas de *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* llegaron de manera temprana a la etapa de desprendimiento, lo cual conduciría a la dispersión dentro del entorno de producción con la subsecuente colonización de nuevos nichos. Otra posibilidad radica en el hecho que durante la etapa de maduración esté ocurriendo el desprendimiento y separación de células para que funjan de manera importante como fuente de células planctónicas (Rukavina et al., 2016).

Han sido descritos cuatro mecanismos de desprendimiento bacteriano en biopelículas: 1) abrasión, 2) pastoreo, 3) erosión y 4) desprendimiento (Petrova et al., 2016). Es probable que el último sea empleado por estas especies del género *Listeria* ya que involucra el desprendimiento de fragmentos intactos de biopelícula o incluso la propia biopelícula en su totalidad, pudiendo estar correlacionado con el hecho de que en la medición a las 72 h no fue posible detectar la producción de biopelículas en cepas de *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. Factores endógenos como la actividad enzimática asociada con la degradación de la biopelícula, la liberación de sustancias poliméricas extracelulares o a la síntesis y/o expresión de proteínas de unión a superficie pueden ser importantes en el desprendimiento (Kaplan et al., 2004). Algunas cuestiones fisiológicas son reguladas por Quorum sensing, incluida la dispersión de células planctónicas del biofilm mediante la inducción de factores de desensamble (Cappitelli et al., 2014).

7.2.2 Presencia/ausencia de genes de resistencia a QACS en cepas de *Listeria* spp.

En ninguna de las 119 cepas analizadas se detectó la presencia del gen *qacH*, lo cual probablemente esté relacionado con la ausencia del transposón Tn6188 al que se encuentra altamente asociado. Müller et al. (2013) realizaron la búsqueda de este gen en 91 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de animales, humanos, alimentos y de su entorno de producción; reportaron la presencia del gen en el 11 % de las cepas provenientes de las últimas dos fuentes de aislamiento. Müller et al. (2014) llevaron a cabo un ensayo similar al previamente descrito, y estudiaron 114 cepas no patógenas del género aisladas de diferentes entornos de producción de alimentos que incluyeron: *L. innocua* (55), *L. ivanovii* (10), *L. seeligeri* (42) y *L. welshimeri* (7); resultando que el gen *qacH* no fue detectado.

Recientemente Palaiodimou et al. (2021) detectaron el gen *qacH* tanto en cepas de *L. monocytogenes* como en cepas de *L. innocua*, y no fue detectado en cepas de *L. welshimeri*. Estos reportes sugieren que el gen *qacH* podría encontrarse mayormente ligado a cepas de *L. monocytogenes*. Sin embargo, es imprescindible que se realicen más estudios de detección del gen que incluyan a las especies no patógenas del género.

Por otro lado, el gen *bcrABC* se detectó en 55 cepas (46 %). Específicamente en cepas de *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* (Tabla 13). En un estudio similar realizado en Polonia, se detectó el gen en el 31 % (21/67) de las cepas de *L. innocua* y *L. welshimeri* obtenidas de alimentos, colectados en puntos de venta minorista y de ambientes de producción de alimentos (Korsak et al., 2019).

Tabla 13. Prevalencia del gen *bcrABC* en cepas de *Listeria* spp.

Especie	2019	2021	Total
	% ((+) / n) ¹		
<i>L. grayi</i>	43 (3/7)	0 (0/0)	43 (3/7)
<i>L. innocua</i>	50 (2/4)	44 (7/16)	45 (9/20)
<i>L. ivanovii</i>	40 (4/10)	0 (0/0)	40 (4/10)
<i>L. monocytogenes</i>	63 (22/35)	43 (17/40)	52 (39/75)
<i>L. seeligeri</i>	0 (0/1)	0 (0/2)	0 (0/3)
<i>L. welshimeri</i>	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/4)

¹El número entre paréntesis representa el número de cepas que tuvieron el gen entre el número total de cepas analizadas.

L. monocytogenes fue la especie con una mayor presencia del gen; en 2019 el 63 % de las cepas fueron portadoras y en 2021 el 43 %. Se ha reportado que esta especie puede presentar variaciones en la distribución del gen entre los diferentes serogrupos. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en Eslovaquia se aislaron 34 cepas en una planta procesadora de carne pertenecientes al serogrupo IIa y el gen estuvo presente en el 50 %; en contraste en cepas de los serotipos IIb (6), IIc (15) y 4B (22) el gen no se detectó. (Minarovičová et al., 2018). Otro trabajo interesante en el que se estudiaron 116 cepas de *L. monocytogenes* obtenidas de diferentes plantas procesadoras de alimentos y de muestras de humano durante un brote de listeriosis en 1998-1999, se encontró que el gen *bcrABC* estuvo presente en el 61 % de las cepas (Dutta et al., 2013). Bolten et al. (2022) reportaron la presencia del gen *bcrABC* en cepas de *L. innocua* (17 %), *L. monocytogenes* (21 %) y *L. welshimeri* (25 %), pero no fue detectado en cepas de *L. ivanovii*, *L. marthii* y *L. seeligeri*.

7.2.3 Riesgo de persistencia en cepas de *Listeria* spp.

Diferentes grupos microbianos exhiben capacidad de para persistir en los entornos de producción de los alimentos, al grado que algunos se consideran ya parte del microbioma presente en el mismo. El hecho de que microorganismos patógenos

presenten dicha capacidad representa un riesgo para la industria, ya que podría contribuir a la contaminación de los productos por distintos mecanismos, por lo que es oportuno diseñar medidas que permitan prevenir el establecimiento de estos microorganismos en las plantas procesadoras.

Lucero-Mejía et al. (2020) propuso un criterio cuantitativo en una escala de 0 a 11 para clasificar la capacidad productora de biopelículas en especies de *Vibrio* spp. Dicho criterio se basó en la dinámica de la producción de biopelículas durante 72 h, incluyó la cantidad de polímeros producidos (nulo, débil, moderado, fuerte) y el tiempo en el que se alcanza el máximo nivel de producción de biopelículas (temprano cuando ocurre a las 24 h y tardío a las 48-72 h).

Los valores numéricos asignados por el autor para los criterios mencionados fueron: a) Perfil de formación de biopelículas: nulo (0), incremento conforme transcurre el tiempo (1), incremento con posterior decremento teniendo en cuenta el nivel final de producción de biopelículas [nulo (5), débil (4) y moderado (3)]; b) Tiempo en el que se alcanzó el máximo nivel de producción de biopelículas: temprano (2) y tardío (1); c) Nivel de producción de biopelículas: nulo (0), débil (1), moderado (2) y fuerte (3).

Para cuantificar el riesgo potencial de persistencia de cepas del género *Listeria* en un ambiente de producción de alimentos, al criterio de Lucero-Mejía et al. (2020) se incorporó el riesgo que representa la presencia del gen *bcrABC*; se asignó un valor de 2 a su presencia por lo que el máximo valor en la escala de nivel de riesgo fue 10 (Tabla 14).

Los criterios establecidos se aplicaron a las 119 cepas estudiadas, con la finalidad de estimar el riesgo de persistencia dentro del entorno de producción de hortalizas congeladas, asociado a la presencia del gen de resistencia a QACs y a dinámicas de formación de biopelículas de cada una de las cepas.

Tabla 14. Escala de la evaluación semicuantitativa del riesgo de persistencia de cepas de *Listeria* spp. asociado a la producción de biopelículas y a la presencia del gen *bcrABC*.

Perfil de formación de biopelículas	Tiempo del máximo nivel de producción de biopelículas	Dinámica de producción de biopelículas			Nivel de riesgo asociado Gen <i>bcrABC</i>	
		24 h	48 h	72 h	Ausente	Presente
Incremento conforme transcurre el tiempo	Nulo	●	●	●	0	2
	Ta-D	●	●	●	3	5
	Ta-D	●	●	●	3	5
	Te-D	●	●	●	4	6
	Ta-M	●	●	●	4	6
	Ta-M	●	●	●	4	6
	Ta-M	●	●	●	4	6
	Te-M	●	●	●	5	7
	Ta-F	●	●	●	5	7
	Ta-F	●	●	●	5	7
Incremento con posterior decremento	Ta-M	●	●	●	6	8
	Ta-M	●	●	●	6	8
	Ta-D	●	●	●	6	8
	Ta-D	●	●	●	7	9
	Ta-D	●	●	●	7	9
	Ta-M	●	●	●	7	9
	Ta-M	●	●	●	7	9
	Te-D	●	●	●	8	10
	Ta-M	●	●	●	8	10
	Te-M	●	●	●	8	10
	Te-F	●	●	●	8	10

Modificado de Lucero-Mejía et al. (2020) Ta: tardío; Te: temprano; D: débil; M: moderado; F: fuerte. Nulo ● Débil ● Moderado ● Fuerte ●

El 75 % de las cepas portadoras del gen *bcrABC* se concentró en el perfil de incremento conforme transcurre el tiempo, mientras que el 20 % mostró un perfil de incremento con posterior decremento (Tabla 15). De forma similar, las cepas que

no tenían el gen exhibieron mayormente un incremento continuo (56 %) respecto al que tuvo un incremento con posterior decremento (34 %).

Tabla 15. Nivel de riesgo de persistencia en cepas de *Listeria* spp.

Nivel de riesgo	Especies no patógenas					Total % (n/N) ¹	Especie patógena	
	LG	LINO	LIV	LS	LW		LM	Total % (n/N) ¹
0	0	0	0	0	1	3 (1/44)	4	5 (4/75)
2	0	0	0	0	0	0 (0/44)	3	4 (3/75)
3	1	1	0	1	0	7 (3/44)	1	1 (1/75)
4	0	9	0	0	0	20 (9/44)	7	9 (7/75)
5	0	1	0	0	1	4 (2/44)	22	29(22/75)
6	0	8	1	0	0	20 (9/44)	17	23(17/75)
7	0	0	6	1	1	18 (8/44)	14	19(14/75)
8	3	1	0	1	1	14 (6/44)	3	4 (3/75)
9	2	0	2	0	0	9 (4/44)	4	5 (4/75)
10	1	0	1	0	0	4 (2/44)	0	0 (0/75)

LG: *L. grayi*, LINO: *L. innocua*; LIV: *L. ivanovii*; LM: *L. monocytogenes*. LS: *L. seeligeri*, LW: *L. welshimeri*. ¹El número entre paréntesis representa el número de cepas que correspondieron al nivel de riesgo respecto al total.

Para *L. grayi* y *L. ivanovii* se portadoras del gen *bcrABC* se estiman mayormente niveles de riesgo entre 9-10, debido a que tuvieron un comportamiento de incremento con posterior decremento y alcanzaron de manera temprana una débil producción de biopelículas que transitó hacia el nivel nulo. El riesgo para *L. innocua* se mantuvo entre 4-6, la mayoría (12/20) con un nivel de producción máximo considerado moderado entre las 48-72 h. Finalmente, en el caso de *L. monocytogenes* el nivel de riesgo estuvo concentrado en un rango de 4 a 6; la amplitud del rango refleja la heterogeneidad en los perfiles y niveles de producción de biopelículas entre las cepas de esta especie. Sin embargo, también se

encontraron algunas portadoras del gen *bcrABC* que no formaron biopelículas (3/39).

Dentro de los principales factores asociados a la capacidad de persistencia en cepas de *Listeria* spp. se encuentran la capacidad formadora de biopelícula y la resistencia/tolerancia a los desinfectantes empleados en los entornos de producción (Ferreira et al., 2014). Ambos factores se incluyeron en la clasificación que se propuso en este trabajo para cuantificar el riesgo que representa la presencia de las cepas de *Listeria* spp. en un ambiente de producción de alimentos. Si bien, la sola presencia del gen *bcrABC* no es indicativo de que este se esté expresando, al haberse identificado en las cepas analizadas representa un riesgo latente ya que la expresión del gen podría inducirse bajo ciertas condiciones, tal como el uso de QACs en concentraciones subletales. Cabe mencionar el hecho de que en diversos estudios existe un debate para encontrar el aporte real de la expresión de estos genes de tolerancia/resistencia a los QACs en la persistencia de *L. monocytogenes*, encontrándose algunos estudios donde se les considera importantes (Kovacevic et al., 2016; Martínez-Suárez et al., 2016) y otros donde solo se les ve como una respuesta adaptativa que favorece un incremento en la concentración mínima inhibitoria de estos desinfectantes y no tiene un rol determinante (Daeschel et al., 2022).

Un tercer mecanismo que podría estar implicado en la persistencia de las especies de *Listeria* spp. en el entorno de producción sería la formación de células persistentes. De manera general, cuando las células se encuentran en un estado latente sin división, incrementan considerablemente su capacidad de supervivencia ante las diferentes condiciones de estrés ambiental (Buchanan et al., 2017). Algunas de estas células ingresan a una fase de supervivencia a largo plazo, donde han demostrado tener una mayor tolerancia a la temperatura y la presión, además de haber sido descritos sin precisiones morfológicas y fisiológicas, cambios en la morfología que favorecen el ingreso y permanencia en dicha etapa (Wen et al., 2011).

Para *L. monocytogenes* se ha considerado a la diversidad de las cepas y a la heterogeneidad entre las poblaciones microbianas, factores asociados con la formación de células persistentes. Sin embargo, también se ha descrito que la presencia de algunos determinantes genéticos como plásmidos, profagos, transposones, sistemas SOS de respuesta, sistema toxina-antitoxina y mutaciones, pueden influir sobre esta respuesta (Abee et al., 2016). Algunos autores refieren el hecho de que esta formación de células persistentes no solamente ofrece una ventaja al patógeno para sobrevivir a las operaciones de limpieza y desinfección que se llevan a cabo en el entorno de producción de alimentos, sino que también podrían favorecer la evasión del sistema inmune durante la infección; lo cual podría explicar el hecho de que los síntomas de la listeriosis se presenten en ocasiones tras largos periodos de incubación (Knudsen et al., 2013).

7.3 Interacciones entre especies no patógenas del género *Listeria* con *L. monocytogenes* en biopelículas

De acuerdo con los criterios establecidos que incluyeron la presencia de genes de resistencia a QACs, la especie no patógena del género *Listeria* y el perfil de formación de biopelículas, se seleccionaron trece cepas, cuyas características se enlistan en la Tabla 16. Con estas cepas se llevaron a cabo los ensayos de interacción en cultivos mixtos.

Tabla 16. Cepas no patógenas de *Listeria* spp. portadoras del gen *bcrABC* seleccionadas para los ensayos de interacción.

Año	Especie	Código	Perfil de formación de biopelículas
2019	<i>L. grayi</i>	MAVI-G2	Incremento con decremento
		MAVI-INO2	
	<i>L. innocua</i>	MAVI-INO3	Incremento constante
		MAVI-IV2	
		MAVI-IV3	
<i>L. ivanovii</i>	MAVI-IV5	Incremento con decremento	
	MAVI-INO5		
2021	<i>L. innocua</i>	MAVI-INO6	Incremento constante
		MAVI-INO7	
		MAVI-INO8	
		MAVI-INO12	
		MAVI-INO13	
		MAVI-INO14	
		MAVI-INO14	

7.3.1 Cambios en la capacidad de adhesión de *L. monocytogenes* en cultivo mixto.

En términos generales la capacidad de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable en cultivos duales con cepas de *L. grayi*, *L. ivanovii* y *L. innocua* fue heterogénea en un rango de 3.14 – 3.98 Log UFC/mL (Figura 13).

De manera general e independientemente de la especie en los ensayos con las cepas del año 2019 *L. monocytogenes* mostró una adhesión similar en cultivo mixto que las cepas de *Listeria* spp., aunque para ambas en la mayoría de los casos esta fue menor en relación a la adhesión observada en sus cultivos puros (Figura 13 A). Por otro lado, con las cepas del año 2021 se observó que las especies no patógenas de *Listeria* presentaron en la mayoría de los casos una mayor adhesión en cultivo mixto que *L. monocytogenes*, siendo esta adhesión mayor que en sus cultivos individuales (Figura 13 B).

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para cada uno de los cultivos duales, y reveló que tanto la cepa (*Listeria* spp o *L. monocytogenes*), el cultivo (individual o dual) y su interacción en la mayoría de los casos tuvieron un efecto significativo sobre la capacidad de adhesión (Tabla A4, Anexos). Independientemente de la especie, en todos los cultivos duales de las cepas del 2019, tanto *L. monocytogenes* como *L. grayi*, *L. innocua*, y *L. ivanovii* redujeron su capacidad de adhesión en cultivo mixto ($p < 0.05$). En contraste, en los ensayos con las cepas del 2021, se observó que la adhesión fue similar sin importar el tipo de cultivo, o bien ocurrió un incremento en la adhesión al estar en cultivo mixto ($p < 0.05$).

Se ha documentado que existen tres tipos de factores que afectan de manera crítica la etapa de adhesión inicial de las bacterias a superficies: 1) factores inherentes a la superficie (hidrofobicidad, cargas electrostáticas y rugosidad), 2) factores ambientales (pH, temperatura, osmolaridad, presencia de nutrientes, composición de comunidades microbianas), y 3) factores propios del microorganismo (pilis, flagelos, transporte celular y comunicación intercelular) (Giaourious et al., 2014).

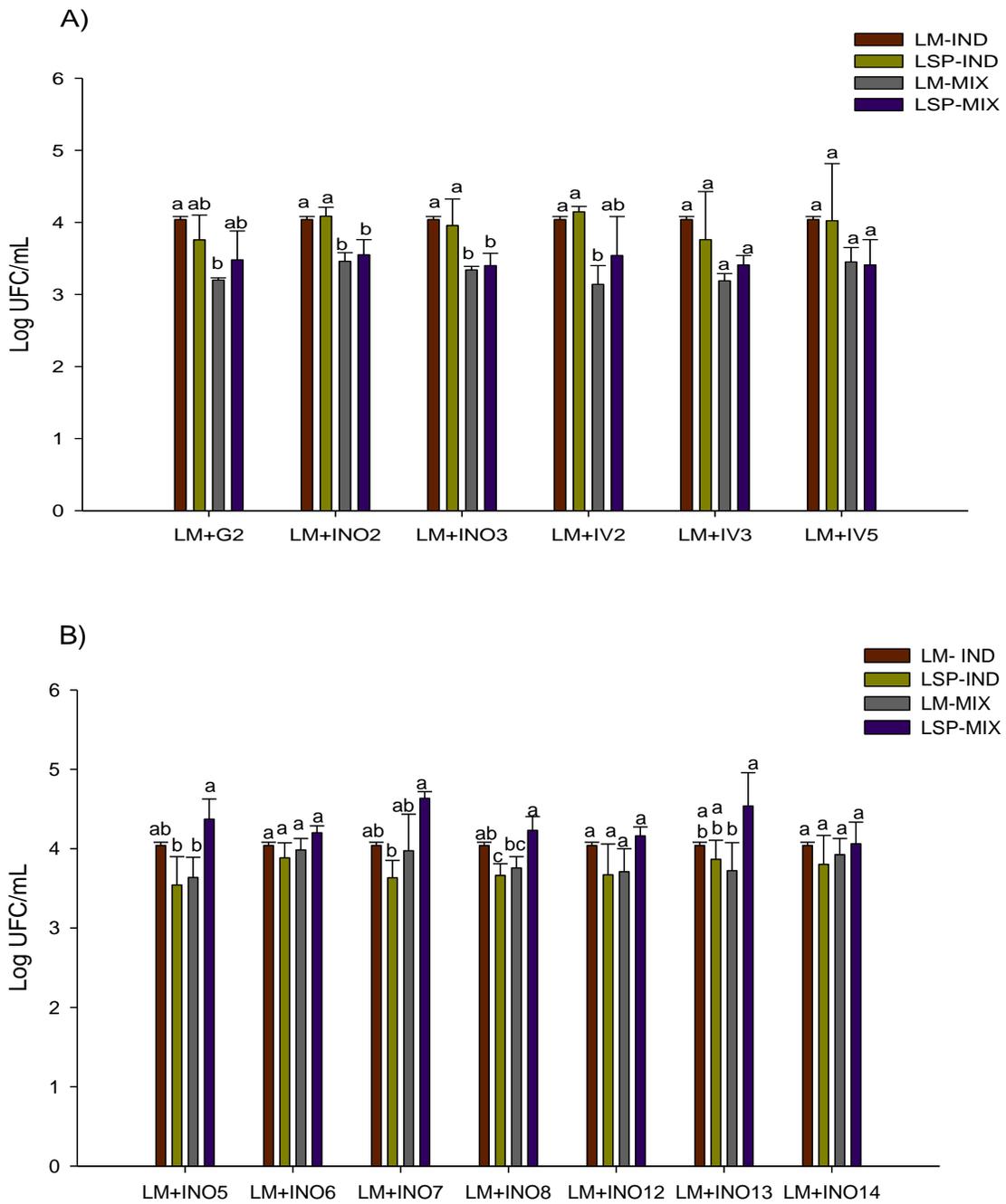


Figura 13. Adhesión a superficies de acero inoxidable de cepas de *Listeria* spp. en cultivo individual y mixto. A) 2019, B) 2021. G: *L. grayi*, INO: *L. innocua*, IV: *L. ivanovii*, LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115. IND: adhesión en cultivo individual, MIX: adhesión en cultivo mixto. Las barras representan el promedio de 6 datos. Dentro de cada cultivo dual letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La inhibición de la etapa de adhesión es una de las estrategias empleadas en la industria para evitar el establecimiento de *L. monocytogenes* en el entorno de producción de alimentos. El efecto de las especies no patogénicas del género *Listeria* sobre la adhesión del patógeno a superficies de acero inoxidable, no se ha investigado a profundidad, salvo el caso de *L. innocua* (Koo et al., 2014). En los resultados obtenidos en este trabajo se observó que la capacidad de adhesión de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 19115 disminuyó en los cultivos mixtos con cepas de *L. grayi*, *L. innocua* y *L. ivanovii*. Sin embargo, al haber heterogeneidad en los comportamientos entre las evaluaciones con cepas de una misma especie resultaría pertinente incrementar el número de cepas evaluadas de cada especie con el fin de poder establecer con mayor claridad el tipo de interacción (sinergismo/antagonismo) que ocurre entre las cepas en las primeras etapas de formación de biopelículas.

Bacterias de otros géneros han mostrado tener efecto sobre la adhesión de *L. monocytogenes*. He et al. (2019), evaluaron el efecto del probiótico *Enterococcus faecium* sobre la adhesión de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* y *L. monocytogenes* empleando ensayos de competencia y desplazamiento. Observaron que las mayores tasas de inhibición ocurrieron sobre *L. monocytogenes* tanto en competencia (53 %) como en desplazamiento (60.8 %). Fox et al. (2014), reportaron que bacterias del género *Janthinobacterium* ejercieron un efecto inhibitorio en la adhesión y formación de biopelículas de *L. monocytogenes* ocasionando cambios en el microbioma presente en los sistemas de desagüe pertenecientes a un entorno de producción de alimentos cárnicos.

En superficies de acero inoxidable Hascoët et al. (2021) en estudios realizados *in vitro*, encontraron que *Bacillus safensis* limita la adhesión de *L. monocytogenes*; también observaron que los serotipos 1/2 a, 1/2 c y 4b fueron más susceptibles que los 2a y 1/2 b, aunque el mecanismo por el que esto ocurre no fue del todo dilucidado. En el mismo tipo de superficie, una cepa de *Staphylococcus sciuri* tuvo la capacidad de disminuir la adhesión de *L. monocytogenes* en proporción variable en tres medios

de cultivo evaluados ya que los nutrientes presentes pueden verse involucrados en diferentes mecanismos de competencia (Leriche et al., 2000). En biopelículas preformadas sobre acero inoxidable, se demostró también que *Bacillus megaterium* y *Candida zeilanoidea* pueden disminuir la capacidad de adhesión de células de *L. monocytogenes* (Ripollés et al., 2022).

Como estrategia para controlar la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en los entornos de producción de alimentos, se ha estudiado ampliamente la aplicación de bacterias ácido lácticas y algunos de sus metabolitos. Rodríguez-López et al. (2018) evaluaron el efecto de bacteriocinas como la nisina, enterocina y sakacina para inhibir la capacidad de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de plástico y metal. Encontraron que estas moléculas podrían actuar de manera temprana inhibiendo el proceso de formación de biopelículas incluso previo a la adhesión reversible. La presencia de estos compuestos puede ser crítico en cuanto al efecto antagónico que ejercen algunas bacterias ácido lácticas sobre el patógeno. Winkelströter et al. (2011), evaluaron la influencia de un *Lactobacillus sakei* y su bacteriocina sobre la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable en cultivos mixtos, y concluyeron que ambos resultaron efectivos en disminuir la adhesión del patógeno a la superficie.

7.3.2 Evaluación de las poblaciones de *L. monocytogenes* en biopelículas mixtas.

Después de 10 días de incubación a 35 °C y a una HR > 95 %, se cuantificaron las poblaciones inmersas en biopelículas obtenidas mediante cultivos individuales y duales de *L. monocytogenes* y las cepas seleccionadas de *Listeria* no patógenas formadas sobre superficies de acero inoxidable (Figura 14). En todos los cultivos duales con las cepas no patógenas del género *Listeria* aisladas en 2019 (Figura 14 A) y 2021 (Figura 14 B), se observó que la población de *L. monocytogenes* se vio ligeramente disminuida con respecto al cultivo individual; sin embargo, dada la dispersión de los datos obtenidos, no en todos los casos la diferencia se consideró estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

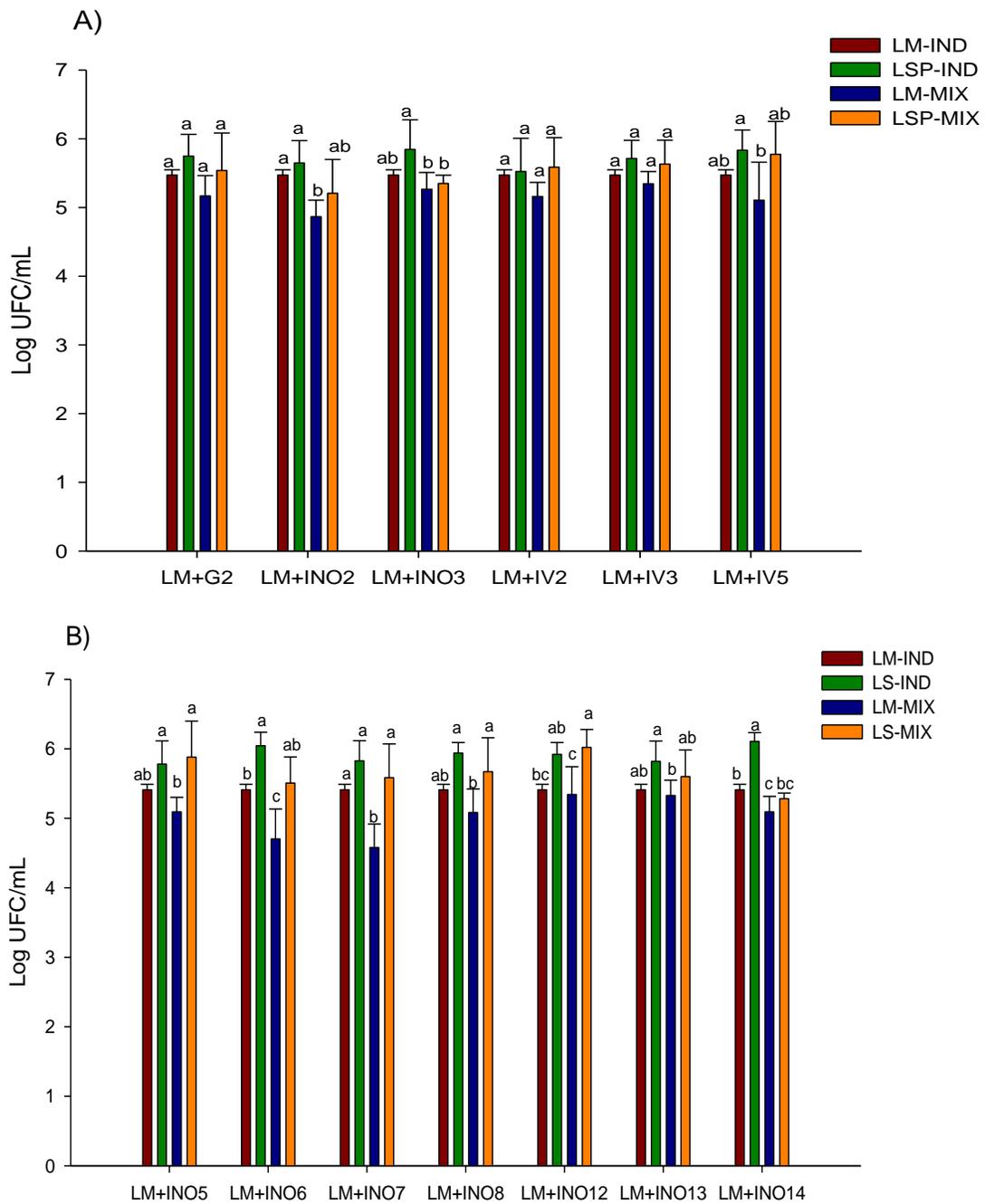


Figura 14. Poblaciones de cepas de *Listeria* spp. formadas sobre acero inoxidable en cultivo individual y mixto. A) 2019, B) 2021. G: *L. grayi*, INO: *L. innocua*, IV: *L. ivanovii*, LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115. IND: población en cultivo individual, MIX: población en cultivo mixto. Las barras representan el promedio de 5 datos. Dentro de cada cultivo dual letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se ha descrito previamente el efecto antagónico que puede ejercer *L. innocua* sobre *L. monocytogenes*, el cual se atribuye principalmente a mecanismos de competencia por nutrientes. Fgaier et al. (2014) emplearon un modelo matemático de interacciones alopatricas entre estas especies, y sin proponer evidencia mecanicista concluyeron que la interacción está determinada en mayor proporción por la producción de toxinas por parte de la especie no patogénica que se ve exacerbada conforme hay una mayor limitación de sustratos en el medio, lo cual implicaría que se trata de una interacción compleja que involucra más factores que solo los mecanismos de competencia. El hecho de que, en estudios realizados en nichos compartidos por estas dos especies, se reporte una mayor prevalencia de *L. innocua* respecto a la especie patógena, evidencia la necesidad de conocer más a profundidad su interacción (Zilelidou et al., 2018).

El ANOVA (Tabla A5, Anexos) para cada uno de los cultivos duales se evaluó el efecto del tipo de cultivo y la cepa sobre las poblaciones microbianas, reveló que los factores no fueron significativos en los cultivos duales con MAVI-G2 y MAVI-IV2. El factor cultivo fue significativo en los cultivos con MAVI-INO2 y MAVI-INO3 ($p < 0.05$). El factor cepa fue significativo en los cultivos con las cepas MAVI-IV3, MAVI-IV5, MAVI-INO5, MAVI-INO12 y MAVI-INO13 ($p < 0.05$). Los dos factores resultaron significativos en cultivos con MAVI-INO6 y MAVI-INO8; y la interacción entre los dos factores en cultivos duales desarrollados con MAVI-INO7 y MAVI-INO14 fue significativa ($p < 0.05$). Los únicos casos en los que se encontró significancia estadística entre la población del *L. monocytogenes* fueron los cultivos mixtos con las cepas de *L. innocua* MAVI-INO2, MAVI-INO6, MAVI-INO 7 y MAVI-INO14 (Figura 14)

Al no ser significativo el factor tipo de cultivo en la mayoría de los casos, puede sugerir que la presencia de cepas no patógenas del género *Listeria* no limitan el desarrollo de *L. monocytogenes*. Mientras que, el hecho de que la cepa resultara significativa, solamente es indicativo de la propia variabilidad inter-especies existente de manera natural.

Se han realizado estudios para evaluar las dinámicas microbianas de cepas de *L. monocytogenes* en cultivos duales y multiespecies (Fagerlund et al., 2021). Un estudio realizado para evaluar la interacción en cultivos duales entre *L. monocytogenes* y cepas que cotidianamente se encuentran en ambientes de producción de carne en biopelículas formadas sobre superficies de acero inoxidable a 35°C durante 72 h y en un entorno de humedad relativa ≥ 90 %, se observó que las especies de *Pseudomonas* ejercieron un efecto protector sobre el patógeno, mientras que las especies de *Bacillus* y *Candida zeylanoides* ocasionaron una reducción en la población dentro de la biopelícula de 4, 2 y 1 Log UFC/cm², respectivamente (Ripollés et al., 2022). En placas de poliestireno se estudiaron los cambios en las poblaciones de *L. innocua* en biopelículas formadas con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a 30 °C por 72 h. Se encontró que en el primer caso la cepa evaluada predominó, mientras que en el segundo presentó números ligeramente menores respecto a *L. innocua* (Kocot et al., 2020).

En biopelículas formadas sobre tubos de polipropileno se observó que cepas de *Leuconostoc mesenteroides* obtenidas de kimchi, redujeron las poblaciones de cepas de *L. monocytogenes* de los serotipos ½ a y 4b en un rango de 1 a 2 Log UFC (Shao et al., 2020). Agustín et al. (2018), evaluaron las poblaciones de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en biopelículas duales formadas sobre acero inoxidable con levaduras presentes comúnmente en los ambientes de producción de jugo de manzana. La población del patógeno en cultivos mixtos se mantuvo similar respecto a la de la biopelícula formada de manera individual, con la excepción del cultivo con *Candida krusei* donde se observó un aumento aproximado de 1 Log UFC. También observaron que la población de *L. innocua* disminuyó en presencia de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida kefyr* e incrementó al ser cultivada con *Candida krusei* y *Candida tropicalis*.

En un estudio realizado por Heir et al. (2018), se evaluaron los cambios en la población de *L. monocytogenes* al formar biopelículas mixtas en acero inoxidable por 9 días a 12 °C con cepas de *L. innocua* aisladas del ambiente de producción de

salmón y con un coctel de bacterias Gram negativas diseñado con especies que normalmente prevalecían en dicho entorno. Observaron que *L. innocua* desarrolló más que *L. monocytogenes* durante los primeros días y que conforme transcurrió el tiempo las poblaciones se comportaron de manera similar. Las cepas Gram negativas también restringieron el desarrollo a pesar de que fue incrementando con el tiempo. En este mismo estudio, también llevaron a cabo experimentos con cultivos mixtos para determinar si la inhibición selectiva de *L. monocytogenes* por cepas de *L. innocua* era general o solo era una característica inherente a algunas cepas de esta especie. Encontraron que solamente 2 de las 5 cepas estudiadas disminuyeron la población de *L. monocytogenes*. La disminución se exacerbó cuando se incubaron con las bacterias Gram negativas. Simulando el mismo entorno y utilizando las mismas condiciones y tipo de superficie Langsrud et al. (2016) evaluaron las poblaciones de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en cultivo dual, observando un incremento en ambas poblaciones conforme transcurrió el tiempo. Por otra parte, en cultivo mixto con microbiota se encontró que *Listeria* spp. representó una fracción mínima del número total de células obtenidas de la biopelícula, y se encontró un mayor número de *L. innocua* respecto a *L. monocytogenes*.

En el presente estudio se observó que solamente 4 de las 9 cepas de *L. innocua* evaluadas disminuyeron la población de *L. monocytogenes* en biopelículas formadas en cultivo dual, y que a pesar de que en la mayoría de los casos (5/9) desarrolló más la especie no patógena no hubo un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*. Esto podría sugerir que *L. innocua* tuvo un mejor aprovechamiento de los nutrientes, sin llegar a condiciones limitantes tales que favorecieran la activación de otros mecanismos de interacción dentro de la propia biopelícula.

En los cultivos mixtos entre *L. monocytogenes* y *L. grayi* y *L. ivanovii* al no haberse encontrado diferencia entre sus poblaciones cuando estaban en cultivo mixto, se podría sugerir que está ocurriendo una interacción neutra, en la que ambas especies pueden verse beneficiadas.

7.3.3 Cambios en la capacidad formadora de biopelículas de *L. monocytogenes* y las especies no patógenas de *Listeria* en cultivo mixto.

En la evaluación de la capacidad para formar biopelículas sobre superficies de acero inoxidable la cantidad de polímeros producidos por la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 osciló entre 0.69 y 0.48. Para las cepas no patógenas de *Listeria* aisladas en el año 2019, la DO osciló entre 0.31-0.90 para *L. grayi*, entre 0.32-0.62 para *L. innocua* y entre 0.69-0.28 para *L. ivanovii* (Figura 15 A). En los ensayos con las cepas de *L. innocua* del año 2021 la DO estuvo entre valores de 0.64-0.17 (Figura 15 B).

La cantidad de biopolímeros producidos por *L. monocytogenes* en presencia de las cepas de *Listeria* no patógenas del año 2019 fue similar en el cultivo individual y mixto en la mayoría de los casos (4/6) ($p < 0.05$). En contraste, en los ensayos con cepas del año 2021, en la mayoría de los casos (6/7) la producción de biopolímeros se redujo en el cultivo mixto ($p < 0.05$). En la Tabla A6 de la sección de anexos se encuentra registrado el ANOVA. El método con cristal violeta empleado para determinar la capacidad formadora de biopelículas es fácil y práctico, pero tiene una alta variabilidad, lo cual puede influir en los resultados ya que los tratamientos presentan una alta dispersión.

El desarrollo de biopelículas mixtas entre especies del género *Listeria* se ha estudiado de forma limitada. Hasani et al. (2020) evaluaron en superficies de poliestireno los cambios en la formación de biopelículas en cultivos duales de una cepa de *L. monocytogenes* considerada como fuertemente productora y dos cepas de *L. innocua* débilmente productoras. Observaron una disminución en la producción de biopelículas que osciló entre el 17 % y el 39 % con respecto a lo obtenido en el cultivo individual. Costa et al. (2018), reportaron que cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* tuvieron una capacidad similar para formar biopelículas sobre poliestireno en cultivo individual. En otro estudio también realizado sobre poliestireno con estas mismas especies, pero en cultivos duales,

obtuvieron valores similares de producción de biopelículas que en el cultivo individual de cada especie (Lezzoum et al., 2019).

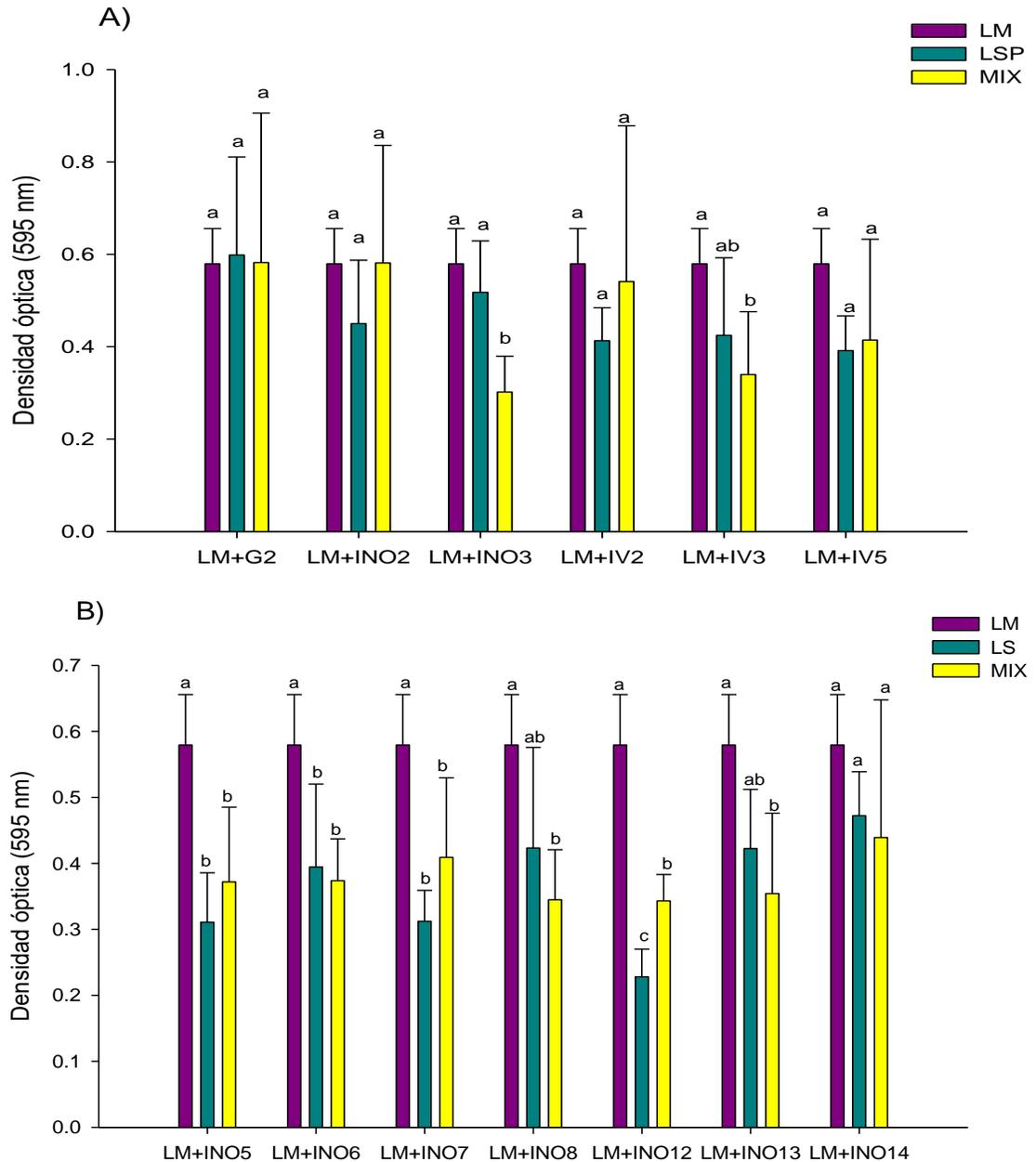


Figura 15. Capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Listeria* spp. sobre superficies de acero inoxidable en cultivo individual y mixto. A) 2019, B) 2021. G: *L. grayi*, INO: *L. innocua*, IV: *L. ivanovii*, LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115 y producción de biopelículas, LS: producción de biopelículas de cepas de *Listeria* spp., MIX: producción de

biopelículas en cultivo mixto. Las barras representan el promedio de 6 datos. Dentro de cada cultivo dual letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos mostraron que principalmente las cepas de *L. innocua*, son las que influyen en la capacidad de adhesión, el decremento en la población y la cantidad de biopelículas que forma *L. monocytogenes*. Sin embargo, el comportamiento no fue homogéneo entre todas las cepas de esta especie. Los mecanismos de competencia entre *L. innocua* y *L. monocytogenes* se podrían estar presentando incluso previo a la formación de biopelículas limitando la capacidad de adhesión. Sin embargo, no ha sido del todo descrito el comportamiento de *L. monocytogenes* y *L. innocua* interactuando sobre superficies de acero inoxidable. En este estudio se observó que, en los cultivos individuales, el 44 % de los ensayos de interacción con *L. innocua* esta produjo una menor cantidad de biopelículas respecto al patógeno. Por otro lado, en los ensayos con *L. grayi* y *L. ivanovii* la producción de biopelículas fue semejante. Esta diversidad podría deberse al efecto que ejerce el tipo de superficie sobre la capacidad de formación de biopelículas, tal como se ha descrito para cepas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Rodríguez-Melcón et al., 2019). Aunque también se debe de tener en cuenta el tipo de interacción que ocurre entre los microorganismos evaluados y la capacidad que presentan para formar biopelículas de manera individual, ya que si la cepa de *L. monocytogenes* es fuertemente productora de biopelícula y no está siendo antagonizada los niveles de biopelícula pueden continuar normales o incrementar, a diferencia de si estuviera ocurriendo una disminución en su población y la cepa de *Listeria* spp. no presentara una gran capacidad para formar estas estructuras resultaría lógica la reducción en la capacidad formadora de biopelículas.

La capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas en cultivos mixtos con algunos otros patógenos transmitidos por los alimentos también ha sido evaluada. Durante una incubación a 25 °C por 60 días se observó que *E. coli* o las posibles moléculas con efecto antimicrobiano generadas por esta hacia el medio, no

ejercieron efecto alguno sobre la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* (Grandi et al., 2018). Interacciones con *Salmonella* no han demostrado tener un rol importante sobre la capacidad de formación de biopelículas y resistencia a la desinfección de *L. monocytogenes* (Kostakioti et al., 2013). La formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. enterica* en cultivo individual y mixto fue evaluada por Almeida et al. (2011). En el cultivo dual de *L. monocytogenes* con *E. coli*, la producción de biopolímeros incrementó considerablemente conforme transcurrió el tiempo, aunque se consideró que la mayor cantidad de sustancias poliméricas extracelulares provenían de *E. coli* ya que en el cultivo individual presentó una mayor concentración de polímero respecto al de *L. monocytogenes*. Cuando *L. monocytogenes* se cultivó con *S. enterica* el incremento en la biomasa fue ligero durante el periodo de incubación. Por otro lado, estudios ha demostrado que puede haber interacciones de cooperación y competencia entre *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus*, siempre que esta última no tenga la capacidad para generar compuestos antimicrobianos (Pérez-Alonso et al., 2020).

Se ha descrito que los compuestos antimicrobianos generados por bacterias ácido lácticas pueden ejercer un efecto negativo sobre la formación de biopelículas por especies de *Listeria* spp. Real-Rocha et al. (2019) evaluaron el efecto de bacteriocinas generadas por diferentes especies del género *Enterococcus* sobre la producción de biopelículas a 30 y 37 °C por cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*. Los autores describieron que hubo disminución en la biomasa. Para *L. monocytogenes* la reducción fue mayor a 37 °C en un rango del 87-64 %, mientras que a 30 °C el rango estuvo entre 80-64 %. Para *L. innocua* y *L. ivanovii* los rangos de reducción fueron mayores a 30 °C y oscilaron entre el 85-50 % y el 80-87%, respectivamente. A 37 °C el rango de reducción de *L. innocua* fue del 46-66 % y para *L. ivanovii* del 75-85%. En otro estudio se reportó la inhibición total de la capacidad de cepas de *L. monocytogenes* para formar biopelículas sobre

superficies de poliestireno en presencia de bacteriocinas producidas por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Camargo et al., 2016).

En otros estudios se evaluó el efecto de la presencia de algunos grupos microbianos sobre la formación de biopelículas en contextos específicos. Maggio et al. (2021) simuló el entorno de producción de lácteos para evaluar la formación de biopelículas en cultivos duales de *L. monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados que obtuvieron respecto a la concentración de biomasa sobre la superficie de poliestireno fueron muy heterogéneos y no fue posible concluir sobre el efecto del cultivo mixto. En otro estudio se simuló el ambiente de una empresa productora de pollo; inoculando cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones en jugo de pollo como medio de cultivo. Se observaron que en algunos de los cultivos se favorecía la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*, aunque en términos generales esta fue menor en comparación con la obtenida al emplearse un medio de cultivo convencional sin el jugo de pollo (Dong et al., 2022).

Una vez inmersas en estas estructuras una minoría de las cepas de *L. innocua* lograron disminuir la población del patógeno en biopelículas formadas en cultivo dual, y en contraste la mayoría de los cultivos duales mostraron una menor producción de biopelículas respecto a la que generó *L. monocytogenes* en cultivo individual. Con todo el panorama expuesto, se podría sugerir que *L. innocua* puede ejercer un efecto antagónico sobre *L. monocytogenes*, sin embargo, tampoco es tan drástico ya que en ninguno de los ensayos realizados en este proyecto ocurrió la inhibición.

Por otro lado, para las especies *L. grayi* y *L. ivanovii* solo se observaron efectos sobre la adhesión y la producción de biopelículas en pocos casos. El hecho de que no haya un efecto sobre la población de *L. monocytogenes* al encontrarse en una biopelícula mixta puede ser indicativo de una interacción de tipo neutra, las cuales son las más abundantes en la naturaleza y dejan entre ver que ambas especies pueden coexistir sin limitar el desarrollo de la otra.

7.4 Transferencia de genes de resistencia QACS en biopelículas mixtas.

Los ensayos para evaluar la capacidad de las cepas de *Listeria* no patógenas portadoras del gen *bcrABC* para transferirlo a la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no portadora con resistencia a rifampicina, se llevaron a cabo en biopelículas formadas en cultivo mixto sobre superficies de acero inoxidable. En un ensayo preliminar se observó que el tiempo mínimo para que ocurriera la transferencia fue de 10 días; por lo tanto, este tiempo se estableció para todos los ensayos (Anexos, Tabla A7). A los 10 días se desprendieron las células de las superficies de acero inoxidable y se cultivaron en placas de ASTR; posteriormente, a partir de estas placas se recuperaron todas las colonias que desarrollaron y se realizó la detección del gen *bcrABC* en la cepa de *L. monocytogenes*.

El 17 % (13/78) de los ensayos de transferencia del gen *bcrABC* a la cepa de *L. monocytogenes* fueron exitosos (Tabla 17). *L. innocua* fue la única especie que logró transferir el gen, aunque solo tres de las cepas probadas lo hicieron en diferentes porcentajes de transferencia.

Tabla 17. Porcentaje de transferencia del gen *bcrABC* de cepas de *Listeria spp.* a *L. monocytogenes*

Año	Especie	Cepa	Transferencia % (+/n) ¹
2019	<i>Listeria grayi</i>	MAVI-G2	0 (0/6)
		MAVI-INO2	50 (3/6)
	<i>Listeria innocua</i>	MAVI-INO3	0 (0/6)
		MAVI-IV2	0 (0/6)
		MAVI-IV3	0 (0/6)
		MAVI-IV5	0 (0/6)
2021	<i>Listeria innocua</i>	MAVI-INO5	0 (0/6)
		MAVI-INO6	0 (0/6)
		MAVI-INO7	0 (0/6)
		MAVI-INO8	83 (5/6)

MAVI-INO12	0 (0/6)
MAVI-INO13	83 (5/6)
MAVI-INO-14	0 (0/6)

¹(+/n): Ocasiones en que ocurrió la transferencia, respecto al total de ensayos realizados.

Desde hace muchos años se ha reconocido a la transferencia horizontal de genes como la base de la recombinación genética entre individuos que pueden o no estar conectados. En el contexto de este trabajo la transferencia entre bacterias de un mismo género, pero de diferente especie puede reconocerse como transferencia horizontal. Tradicionalmente, existen tres mecanismos que permiten el intercambio de ADN entre microorganismos: 1) Transformación, 2) Transducción y 3) Conjugación (Hall et al., 2017). La célula receptora tiene un rol determinante en que ocurran los primeros dos mecanismos de recombinación homóloga, mientras que la conjugación está en función de la célula donadora que logra identificar un receptor adecuado para transferir el material genético (Frost et al., 2010). Naturalmente la transformación corresponde al proceso de captación de ADN circundante en el ambiente proveniente de una célula donadora, mediante su unión específica a proteínas de unión al ADN presentes a nivel membranal, posteriormente una de las cadenas es degradada por una nucleasa y la otra se une a proteínas específicas previo a su recombinación homóloga mediada por la proteína RecA (Mandigan et al., 2015c).

En el proceso de transducción es un bacteriófago el que se encarga de la transferencia del ADN entre células bacterianas, pudiendo ser un proceso generalizado donde cualquier gen que se encuentre en el cromosoma de la célula donadora puede ser transferido y otro denominado transducción generalizada que permite el intercambio de manera eficiente y selectiva de pequeñas regiones del cromosoma (Chen et al., 2009).

Finalmente, el proceso de conjugación requiere del contacto entre células para que ocurra el intercambio del material genético; el proceso ocurre cuando la célula donadora expresa un multicomponente macromolecular a nivel membranal

denominado como plásmido conjugativo que proporciona el enlace físico que permite el movimiento del ADN de donador a receptor (Hall et al., 2017). Algunos autores refieren incluso que la formación de biopelículas representa un entorno factible para que ocurra la conjugación bacteriana (Tong et al., 2021).

Generalmente en cuanto a la dispersión de elementos genéticos asociados con la resistencia/tolerancia a los desinfectantes de diferentes tipos se considera que el principal mecanismo empleado es la conjugación, aunque la posibilidad de que estos elementos puedan ser movilizados entre células mediante transducción o de manera más simple por la sola transformación merece ser objeto de estudios en los años venideros con el fin de entender adecuadamente como se propaga la resistencia a desinfectantes entre los diferentes grupos microbianos (Mc-Carlie et al., 2020; Tong et al., 2021).

Korsak et al. (2019), reportaron la capacidad de cepas de *L. welshimeri* para transferir el plásmido PLIS1 portador de los genes *bcrABC* y *cadA2* con una alta frecuencia a cepas receptoras de *L. monocytogenes*. También se ha reportado una frecuencia de transferencia de estos genes en el rango de 10^5 - 10^6 desde cepas de *L. monocytogenes* a cepas de *E. coli*, con lo cual se aportó evidencia del posible intercambio de genes de resistencia a desinfectantes entre bacterias Gram negativas y Gram positivas (Xu et al., 2016). Utilizando cepas no patógenas del género *Listeria* portadoras de los genes *bcrABC*, *cadA1* y *cadA2*, Katharios et al. (2012) realizaron la evaluación de la transferencia entre cepas no patógenas y hacia *L. monocytogenes*. Describieron que la transferencia entre cepas no patógenas fue mejor a 25 °C que a 37 °C, mientras que el patógeno mostró una adquisición similar en ambas condiciones. El rango de transferencia para las cepas donadoras de *L. welshimeri* y *L. innocua* fue de 10^7 - 10^9 , en mayor o menor proporción entre las cepas receptoras del patógeno.

En función de lo previamente expuesto, se considera que el posible mecanismo empleado por las cepas de *L. innocua* para transferir el gen *bcrABC* puede ser la conjugación. Lo anterior considerando que el gen de resistencia se encuentra

altamente asociado al plásmido PLM80 y al no haber ocurrido la transferencia con todas las cepas portadoras del mismo, se podría suponer que el gen se haya integró al genoma después de varias generaciones reproductivas, lo cual podría limitar su transferencia específica. Aunque, para fortalecer esta conclusión sería necesario realizar análisis más minuciosos a nivel genómico (secuenciación) que permitieran establecer diferencias en la ubicación o estructura del gen *bcrABC* en cepas de las diferentes especies de *Listeria* spp.

7.4.1 Expresión fenotípica del gen *bcrABC* asociado a la resistencia a QACs. Los ensayos de interacción con las cepas en las que se detectó la transferencia fueron repetidos bajo las condiciones previamente descritas. Tras 10 días, las poblaciones de *L. monocytogenes* ATCC 19115 fueron recuperadas en placas de ASTR y resuspendidas en SSI estéril para poder llevar a cabo el ensayo de prueba de contacto directo con el desinfectante. Las células en suspensión de *L. monocytogenes* que adquirieron el gen *bcrABC* se recuperaron y se expusieron a una concentración de QACs (150 ppm, 100 ppm) durante 30 segundos con agitación constante, y al final se cuantificaron las células sobrevivientes.

En ninguno de los ensayos de interacción, las células de *L. monocytogenes* que adquirieron el gen *bcrABC* a partir de cepas de *L. innocua* exhibieron de manera fenotípica una respuesta de tolerancia/resistencia a concentraciones subletales del desinfectante Servi-Quirofenol® (QACs) (Tabla 18). Cabe mencionar que este ensayo solo se realizó con las cepas de *L. monocytogenes* a las que previamente se les confirmó la presencia del gen *bcrABC* mediante PCR.

Tabla 18. Poblaciones en cepas de *L. monocytogenes* receptoras del gen *bcrABC* expuestas a QACs.

Ensayo de interacción ¹	Tratamiento	Poblaciones (Log UFC/ mL)	
		Inicial	Final
LM 19115 (Control)	150 ppm	2.4 x 10 ⁹	< LD ²
LM+INO2		1.2 x 10 ⁷	
LM+INO8		5.0 x 10 ⁶	
LM+INO13		1.4 x 10 ⁷	
LM 19115 (Control)	100 ppm	2.4 x 10 ⁹	< LD
LM+INO2		1.2 x 10 ⁷	
LM+INO8		5.0 x 10 ⁶	
LM+INO13		1.4 x 10 ⁷	

¹Ensayo de interacción a partir del cual se recuperaron las células de *L. monocytogenes* que recibieron el gen *bcrABC*.² Menor al límite de detección de acuerdo a las técnicas empleadas (1000 UFC/mL)

Los resultados coinciden con lo reportado en la literatura, ya que en raras ocasiones ha sido descrito el hecho de que las bacterias del género *Listeria* desarrollen resistencia adquirida hacia los desinfectantes incluidos los QACs (Luque-Sastre et al., 2018).

Recientemente, se atribuyó un incremento en la adaptación a bajas concentraciones de cloruro de benzalconio en cepas de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. a mutaciones no sinónimas en *fepR*, un represor local de la actividad de bombas de flujo de la familia MATE FepA (Bolten et al., 2022). En contra parte, la resistencia a este tipo de compuestos se ha visto asociada a un incremento en la expresión de elementos reguladores, pudiendo ser inducidos por la exposición previa a QACs o

al propio estrés que generan estos compuestos en los microorganismos (Martínez-Suárez et al., 2016).

En un estudio se realizó la evaluación de la expresión del gen *bcrABC* y otros cuatro genes mediante RT-qPCR en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y del entorno de producción de alimentos previamente expuestas a concentraciones subletales de cloruro de benzalconio. Se observó que en 4 de 6 cepas evaluadas hubo una menor expresión del gen *bcrABC*, mientras que en las otras dos no se detectó su expresión (Tamburro et al., 2014). De igual manera se evaluó la expresión de *bcrABC* utilizando cloruro de benzalconio en cuatro concentraciones subletales (0, 0.12, 0.25, 0.50 µg /ml) de cloruro de benzalconio sobre una cepa de *L. monocytogenes*, encontrando una mayor expresión en la concentración más alta (Minarovičová et al., 2018).

Møretør et al. (2017b), reportaron que cepas de *L. monocytogenes* no portadoras de los genes *bcrABC* o *qacH* exhibieron una menor concentración mínima inhibitoria (MIC) de cloruro de benzalconio (≤ 5 ppm), mientras que las cepas que si los tenían presentaron una MIC de 10-13 ppm y 5-12 ppm, respectivamente. En este mismo estudio los autores concluyeron que la presencia de concentraciones residuales de los QACs después de los procesos de desinfección podría ofrecer una ventaja para el desarrollo en cepas portadoras. La presencia de estos genes no es garantía de que ocurran fallas en la desinfección, derivado de la diferencia en los niveles de expresión entre los diferentes microorganismos. A pesar de ello se considera un riesgo latente en la persistencia y probablemente en la aparición de resistencia cruzada hacia QACs y antibióticos (Chapman et al., 2002).

8. CONCLUSIONES

1. Seis especies del género *Listeria* estuvieron presentes en el entorno de producción de hortalizas congeladas. Las más abundantes fueron *L. monocytogenes* y *L. innocua*, cuyas biopelículas fueron más estables y permanecieron hasta las 72 h. Esta característica puede influir en la persistencia de las cepas en el entorno de producción, involucrándose en el hecho de que hayan sido detectadas en muestras de los dos años evaluados.
2. Las especies menos abundantes fueron *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii*. Las cuatro especies en la mayoría de los casos exhibieron una dispersión temprana de sus biopelículas, es decir tienen poca estabilidad, lo cual podría estar asociado al establecimiento de nuevos nichos dentro del entorno de producción.
3. El gen *bcrABC* asociado a la resistencia a QACs se identificó en cepas de *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*, lo cual podría conducir a tratamientos de desinfección no efectivos si el gen lograra expresarse.
4. En relación a la capacidad de persistencia de las cepas de *Listeria* spp. y con base al criterio semi-cuantitativo para estimar el riesgo que se desarrolló, es estimó que algunas cepas de *L. grayi* y *L. ivanovii* tienen características que pueden favorecer su establecimiento dentro del entorno de producción con mayor facilidad respecto a *L. monocytogenes*.
5. Dada la heterogeneidad de los comportamientos en las dinámicas de producción de biopelículas, podrían estudiarse otros factores como la capacidad de formación de células persistentes y la presencia/expresión de sistemas de respuesta a estrés que pueden influir en la persistencia. Al integrarlos en el criterio propuesto se podría estimar con mayor certeza esta capacidad.
6. Los ensayos de interacción de cepas de *L. grayi*, *L. innocua* y *L. ivanovii* con *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable, demostraron que la capacidad de adhesión del patógeno se ve reducida. Lo anterior, podría

limitar la formación de biopelículas de la especie patógena desde etapas tempranas.

7. La población de *L. monocytogenes* embebida en la biopelícula y la cantidad de biopolímeros producidos en las biopelículas mixtas con *L. innocua* fue menor respecto a las biopelículas individuales, sugiriendo un posible efecto antagonico. Por otro lado, las cepas de *L. grayi* y *L. ivanovii* no exhibieron ningún efecto sobre la población de *L. monocytogenes* al estar en cultivo mixto, por lo que se considera que el tipo de interacción que tiene lugar es neutra.
8. Cepas de *L. innocua* transfirieron el gen *bcrABC* a *L. monocytogenes*, aunque este no se expresó de manera fenotípica bajo las condiciones experimentales, siendo necesarias más pruebas para corroborar el rol que puede tener el gen en la persistencia del patógeno una vez adquirido y determinar si resulta crítico.
9. El hecho de que las especies no patógenas del género *Listeria* puedan coexistir en una biopelícula con *L. monocytogenes*, podría contribuir a su persistencia, a pesar de no verse exacerbados los factores de persistencia estudiados durante los ensayos de interacción.

9. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS.

Caracterizar la resistencia fenotípica a QACs en todas las cepas que resultaron portadoras del gen *bcrABC*, y así lograr establecer si la presencia de este gen es una respuesta determinante en la resistencia/tolerancia a dichos desinfectantes o no ofrecen ventaja alguna.

Incrementar el número de cepas de las especies *L. grayi* y *L. ivanovii* para obtener una visión más amplia y confiable del tipo de interacción que tienen con *L. monocytogenes* en biopelículas.

Realizar ensayos de interacción entre cepas no patógenas del género *Listeria* y *L. monocytogenes* en biopelículas utilizando algún extracto de vegetales como fuente de materia orgánica en lugar de los medios convencionales, con el fin de estimar con mayor precisión el comportamiento dentro del entorno de producción de hortalizas congeladas.

Aumentar el número de cepas para realizar en los ensayos de interacción (cultivos triples o cuádruples) para observar las respuestas previamente evaluadas en presencia de un mayor número de microorganismos.

Llevar a cabo un análisis de secuenciación en cepas portadoras del gen *bcrABC* para tener con certeza la ubicación del mismo dentro del genoma bacteriano, y así poder elucidar de mejor manera el mecanismo de transferencia.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee, T., Koomen, J., Metselaar, K. I., Zwietering, M. H., & Den Besten, H. M. W. (2016). Impact of pathogen population heterogeneity and stress-resistant variants on food safety. *Annual review of food Science and Technology*, 7, 439-456.
- Acker, H. V., P. V. Dijck, and T. Coenye. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology* 22 (6):326–33. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.001.
- Aguado, V., Vitas, A. I., & Garcia-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 341-347.
- Agustín, M. D. R., & Brugnoli, L. (2018). Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12499.
- Alía, A., Andrade, M. J., Rodríguez, A., Martín, I., Pérez-Baltar, A., Medina, M., & Córdoba, J. J. (2020). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in deboning and slicing areas of Spanish dry-cured ham processing. *LWT-Food Science and Technology*, 128, 109498.
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2011). Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PloS one*, 6(3), e14786.
- Amajoud, N., Leclercq, A., Soriano, J. M., Bracq-Dieye, H., El Maadoudi, M., Senhaji, N. S., & Abrini, J. (2018). Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. *Food Control*, 84, 436-441.
- Arslan, S., & Baytur, S. (2019). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat. *Journal of Food Safety*, 39(1), e12578.

- Bahrami, A., Baboli, Z. M., Schimmel, K., Jafari, S. M., & Williams, L. (2020). Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products. *Trends in Food Science & Technology*, *96*, 61-78.
- Baranowska M, Chojnowski W, Nowak H (2014) Disinfection in dairy plants. *Nauki Inżynieryjskie i Technologie* 4(15):9–22
- Bolten, S., Harrand, A. S., Skeens, J., & Wiedmann, M. (2022). Nonsynonymous Mutations in *fepR* Are Associated with Adaptation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. to Low Concentrations of Benzalkonium Chloride but Do Not Increase Survival of *L. monocytogenes* and Other *Listeria* spp. after Exposure to Benzalkonium Chloride Concentrations Recommended for Use in Food Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, e00486-22.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, *35*(1), 386-391.
- Bragg, R. R., Meyburgh, C. M., Lee, J. Y., & Coetzee, M. (2018). Potential treatment options in a post-antibiotic era. *Infectious Diseases and Nanomedicine III*, 51-61.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, *75*, 1-13.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 1-10.
- Camargo, A. C., de Paula, O. A. L., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2016). In vitro evaluation of bacteriocins activity against *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *178*(6), 1239-1251.

- Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6(1), 29-42.
- Carrillo Zeledón, G., Redondo Solano, M., & Arias Echandi, M. L. (2010). Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(2), 175-178.
- Carrillo, L., Audisio, M. C., & Bejarano, N. (2007). Manual de Microbiología de los Alimentos. *San salvador de Jujuy. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias SS Jujuy. Argentina.*
- Casp Vanaclocha, A., & Abril Requena, J. (2003). Escaldado. En Casp, A. & Abril J. (Eds.), *Procesos de conservación de alimentos*. (2.ª ed., pp 185-189) Grupo editorial Mundi-Prensa.
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). *Listeria (Listeriosis)* Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html#:~:text=La%20listeriosis%20es%20una%20infecci%C3%B3n,260%20mueren%20por%20la%20enfermedad> Consultado el 10/11/22.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of listeriosis linked to frozen vegetables Final update (2016). Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html> Consultado el 23/08/22.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). National Outbreak Reporting System (NORS). (2018). Disponible en: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>

- Chapman, H. D., & Johnson, Z. B. (2002). Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995 to 2000. *Poultry Science*, 81(3), 356-364.
- Chen, J., & Novick, R. P. (2009). Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *science*, 323(5910), 139-141.
- Chiara, M., Caruso, M., D'Erchia, A. M., Manzari, C., Fraccalvieri, R., Goffredo, E., & Parisi, A. (2015). Comparative genomics of *Listeria* sensu lato: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. *Genome biology and evolution*, 7(8), 2154-2172.
- Choi, Y. C., Cho, S. Y., Park, B. K., Chung, D. H., & Oh, D. H. (2001). Incidence and characterization of *Listeria* spp. from foods available in Korea. *Journal of food protection*, 64(4), 554-558.
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guerardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. (2013). Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1120-1131.
- Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., & Brito, L. (2018). *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 477-483.
- Cui, H., Li, H., Abdel-Samie, M. A., Surendhiran, D., & Lin, L. (2020). Anti-*Listeria monocytogenes* biofilm mechanism of cold nitrogen plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102571.
- Daeschel, D., Pettengill, J. B., Wang, Y., Chen, Y., Allard, M., & Snyder, A. B. (2022). Genomic analysis of *Listeria monocytogenes* from US food processing environments reveals a high prevalence of QAC efflux genes but limited evidence of their contribution to environmental persistence. *BMC genomics*, 23(1), 1-14.

- de Grandi, A. Z., Pinto, U. M., & Destro, M. T. (2018). Dual-species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on stainless steel surface. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 1-9.
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V. & Chakraborty, T. (2015). Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PloS one*, 10(9), e0137046.
- Dong, Q., Sun, L., Fang, T., Wang, Y., Li, Z., Wang, X., & Zhang, H. (2022). Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Simulated Chicken Processing Environment. *Foods*, 11(13), 1917.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822.
- Dutta, V., Elhanafi, D., & Kathariou, S. (2013). Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 79(19), 6067-6074.
- Elhanafi, D., Dutta, V., & Kathariou, S. (2010). Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 8231-8238.
- Fagerlund, A., Langsrud, S., & Mørretrø, T. (2021). Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. *Current Opinion in Food Science*, 37, 171-178.
- Feehily, C., Finnerty, A., Casey, P. G., Hill, C., Gahan, C. G., O'Byrne, C. P., & Karatzas, K. A. G. (2014). Divergent evolution of the activity and regulation of the glutamate decarboxylase systems in *Listeria monocytogenes* EGD-e and 10403S: roles in virulence and acid tolerance. *PloS one*, 9(11), e112649.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology,

strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150-170.

- Fgaier, H., Kalmokoff, M., Ells, T., & Eberl, H. J. (2014). An allelopathy-based model for the *Listeria* overgrowth phenomenon. *Mathematical Biosciences*, 247, 13-26.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Food and Drug Administration (FDA) (2012). *Listeria monocytogenes*. En Chen, Y. (Eds.), *Bad Bug Book Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*. (2^a ed., pp 99-103) *Silver Spring, MD, USA*.
- Food and Drug Administration (FDA) (2017). Detection of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. En Hitchins D. A., Jinneman, K. y Chi, Y. (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual (BAM)* Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Fox, E. M., Solomon, K., Moore, J. E., Wall, P. G., & Fanning, S. (2014). Phylogenetic profiles of in-house microflora in drains at a food production facility: comparison and biocontrol implications of *Listeria*-positive and-negative bacterial populations. *Applied and environmental microbiology*, 80(11), 3369-3374.
- Frost, L. S., & Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future microbiology*, 5(7), 1057-1071.
- García Panadero, I., Pardo, J. E., Álvarez-Ortí, M., & Rabadán, A. (2019). *El sistema APPCC como herramienta para reducir el riesgo de aparición de Listeria monocytogenes en vegetales congelados*. Escuela Técnica de

Ingenieros Agrónomos y de Montes. Disponible en:

<https://zaguan.unizar.es/record/84419/files/3357.pdf>

- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., & Simões, M. (2015). Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 841.
- Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A., & Chakravorty, D. (2013). Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(2), 191-206.
- Godínez-Oviedo, A. (2014). Incidencia y distribución de *Listeria monocytogenes* en una planta procesadora de hortalizas congeladas: Impacto de las características del patógeno en su capacidad para prevalecer en el ambiente. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/578>
- Gómez-Sánchez, A. I., Cerón-Carrillo, T. G., Rodríguez-Martínez, V., & Vázquez-Aguilar, M. M. (2007). Aspectos tecnológicos de la congelación en alimentos. En *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, (1ª ed., pp 80-96) UDLAP.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., & Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 136.
- Hall, J. P., Brockhurst, M. A., & Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1735), 20160424.
- Hasani, E., Labidi, S., Mohácsi-Farkas, C., & Kiskó, G. (2020). Comparison of biofilm formation between non-pathogenic *Listeria* strains under different stress conditions. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*.73-80.
- Hascoët, A. S., Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huamán, B. R., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). In Vitro Preformed Biofilms of *Bacillus safensis* Inhibit the

Adhesion and Subsequent Development of *Listeria monocytogenes* on Stainless-Steel Surfaces. *Biomolecules*, 11(3), 475.

- He, Y., Xu, X., Zhang, F., Xu, D., Liu, Z., Tao, X., & Wei, H. (2019). Anti-adhesion of probiotic *Enterococcus faecium* WEFA23 against five pathogens and the beneficial effect of its S-layer proteins against *Listeria monocytogenes*. *Canadian journal of microbiology*, 65(3), 175-184.
- Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., & Langsrud, S. (2018). *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 46-55.
- Hernández-Navarrete, M. J., Celorrio-Pascual, J. M., Moros, C. L., & Bernad, V. M. S. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 681-688. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Jagadeesan, B., Schmid, V. B., Kupski, B., McMahon, W., & Klijn, A. (2019). Detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in pooled test portion samples of processed dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 30-39.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Johansson, J., & Freitag, N. E. (2019). Regulation of *Listeria monocytogenes* virulence. *Gram-Positive Pathogens*, 836-850. Wiley Online Library
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Kaptchouang Tchatchouang, C. D., Fri, J., Montso, P. K., Amagliani, G., Schiavano, G. F., Manganyi, M. C., & Ateba, C. N. (2022). Evidence of Virulent Multi-Drug Resistant and Biofilm-Forming *Listeria* Species Isolated from Various Sources in South Africa. *Pathogens*, 11(8), 843.

- Katharios-Lanweremeyer, S., Rakic-Martinez, M., Elhanafi, D., Ratani, S., Tiedje, J. M., & Kathariou, S. (2012). Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Applied and environmental microbiology*, 78(21), 7549-7556.
- Kim, M., Weigand, M. R., Oh, S., Hatt, J. K., Krishnan, R., Tezel, U., & Konstantinidis, K. T. (2018). Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Applied and environmental microbiology*, 84(17).
- Knudsen, G. M., Ng, Y., & Gram, L. (2013). Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 79(23), 7390-7397.
- Kocaman, N., & Sarimehmetoglu, B. (2016). Stress responses of *Listeria monocytogenes*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63, 421-427.
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2020). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments. *LWT-Food science and Technology*, 118, 108736.
- Koo, O. K., Ndahetuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, 39, 135-138.
- Korsak, D., Chmielowska, C., Szuplewska, M., & Bartosik, D. (2019). Prevalence of plasmid-borne benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC and cadmium resistance cadA genes in nonpathogenic *Listeria* spp. isolated from food and food-processing environments. *International journal of food microbiology*, 290, 247-253.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the

postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.

- Kovacevic, J., Ziegler, J., Walecka-Zacharska, E., Reimer, A., Kitts, D. D., & Gilmour, M. W. (2016). Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Applied and environmental microbiology*, 82(3), 939-953.
- Krämer, R., & Jung, K. (2009). Comunicación entre células en biopelículas de bacterias Gram positivas. En Heillman, C. y Gotz, F. (Eds.) Señalización bacteriana, (3ª ed., pp 7-13). John Wiley & Sons.
- Langsrud, S., Moen, B., Møretrø, T., Løype, M., & Heir, E. (2016). Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of applied microbiology*, 120(2), 366-378.
- Lee, S., Cetinkaya, F., & Soyutemiz, G. E. (2007). Occurrence of *Listeria* species in the processing stages of frozen pepper. *Journal of food safety*, 27(2), 134-147.
- Leriche, V., & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of applied microbiology*, 88(4), 594-605.
- Lezzoum-Atek, S., Bouayad, L., & Hamdi, T. M. (2019). Influence of some parameters on the ability of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Escherichia coli* to form biofilms. *Veterinary World*, 12(3), 459.
- Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., & Lawrence, M. L. (2003). Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 205-210.
- Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., & Lawrence, M. L. (2004). PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Veterinary microbiology*, 101(2), 83-89.
- Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse, P. D., & Wilkinson, B. J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to

growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1697-1705.

- Lucero-Mejía, J. E., Romero-Gómez, S. D. J., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). A new classification criterion for the biofilm formation index: a study of the biofilm dynamics of pathogenic *Vibrio* species isolated from seafood and food contact surfaces. *Journal of Food Science*, 85(8), 2491-2497.
- Lundén, J.; Autio, T.; Markkula, A.; Hellström, S.; Korkeala, H. (2003) Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*. 82,265–272.
- Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L. I., Li, F., & Fanning, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology spectrum*, 6(4), 6-4.
- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T. R., Palencia, R. C., Almeida, G., & Teixeira, P. (2016). Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: a focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiology*, 57, 103-108.
- Magdovitz, B. F., Gummalla, S., Garren, D., Thippareddi, H., Berrang, M. E., & Harrison, M. A. (2021). Prevalence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* on raw produce arriving at frozen food manufacturing facilities. *Journal of Food Protection*, 84(11), 1898-1903.
- Maggio, F., Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Valbonetti, L., Pomilio, F., & Paparella, A. (2021). Interactions between *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* in dual-species biofilms under simulated dairy processing conditions. *Foods*, 10(1), 176.
- Mandigan M., Martinko J., Dunplan P., Clarck D. (2015a). Crecimiento y control microbiano. En Brock: Biología de los microorganismos (14.^a ed., pp 185-185). Pearson.

- Mandigan M., Martinko J., Dunplan P., Clarck D. (2015b). Ecosistemas microbianos. En Brock: Biología de los microorganismos (14.^a ed., pp 648 - 651). Pearson.
- Mandigan M., Martinko J., Dunplan P., Clarck D. (2015c). Genética de Bacteria y Archaea. En Brock: Biología de los microorganismos (14.^a ed., pp 318 -326). Pearson.
- Martínez-Rivera, S. (2014). Capacidad deterioradora y de formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas aisladas de una planta procesadora de jamón cocido rebanado y su interacción con *Listeria monocytogenes*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/602>
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in microbiology*, 7, 638.
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A Review. *Pathogens*, 9(7), 528.
- Mc Carlie, S., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*, 48, 100672.
- Mendoza Martínez, E., & Calvo Carrillo, M. D. L. C. (2010). Frutas y Hortalizas. En *Bromatología: composición y propiedades de los alimentos* (1.^a ed., pp 263-277). Mc Graw-Hill.
- Minarovičová, J., Veghova, A., Mikulášová, M., Chovanova, R., Šoltýs, K., Drahovska, H., & Kaclikova, E. (2018). Benzalkonium chloride tolerance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing facility is related to presence of plasmid-borne bcrABC cassette. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(10), 1913-1923.
- Moravkova, M., Verbikova, V., Michna, V., Babak, V., Cahlikova, H., Karpiskova, R., & Kralik, P. (2017). Detection and quantification of *Listeria*

monocytogenes in ready-to-eat vegetables, frozen vegetables and sprouts examined by culture methods and real-time PCR. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(11), 832-837.

- Møretrø, T., Langsrud, S. (2017a). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022-1041.
- Møretrø, T., Schirmer, B. C., Heir, E., Fagerlund, A., Hjemli, P., & Langsrud, S. (2017b). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215-224.
- Müller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., & Schmitz-Esser, S. (2013). Tn 6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS one*, 8(10), e76835.
- Müller, A., Rychli, K., Zaiser, A., Wieser, C., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). The *Listeria monocytogenes* transposon Tn 6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS microbiology letters*, 361(2), 166-173.
- NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis. Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas. Disponible en: <https://docplayer.es/83776476-Nmx-bb-040-scfi-1999-metodos-generales-de-analisis-determinacion-de-la-actividad-antimicrobiana-en-productos-germicidas.html>
- Olivares, R. (2009). *Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. *Medwave*, 9(06).
- Oliveira, M. M. M. D., Brugnera, D. F., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2010). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 97-106.

- Ordoñez Pereda, J. A., Cambero Rodríguez, M. I., & Cabeza Briales, M. C. (2017). Higienización de alimentos listos para el consumo mediante electrones acelerados. *Salud (i) Ciencia*, 22(5), 476-477.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Listeriosis. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO/OPS). (2018). Diagnóstico e Investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en: <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo0/modulo0a.html>
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287.
- Osman, K. M., Samir, A., Abo-Shama, U. H., Mohamed, E. H., Orabi, A., & Zolnikov, T. (2016). Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. *BMC microbiology*, 16(1), 1-13.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), e2437.
- Palaiodimou, L., Fanning, S., & Fox, E. M. (2021). Genomic insights into persistence of *Listeria* species in the food processing environment. *Journal of applied microbiology*, 131(5), 2082-2094.
- Pappelbaum, K., Grif, K., Heller, I., Wuerzner, R., Hein, I., Ellerbroek, L., & Wagner, M. (2008). Monitoring hygiene on-and at-line is critical for controlling *Listeria monocytogenes* during produce processing. *Journal of food protection*, 71(4), 735-741.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 31, 1–61.

- Pereira, S.A.; Alves, A.; Ferreira, V.; Teixeira, C.M. (2018). The Impact of Environmental Stresses in the Virulence Traits of *Listeria monocytogenes* Relevant to Food Safety. En: *Listeria monocytogenes* (Capítulo 7; pp. 89–108) IntechOpen.
- Pérez-Alonso, V. P., Harada, A. M. M., & Kabuki, D. Y. (2020). Competitive and/or cooperative interactions of *Listeria monocytogenes* with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 11, 177.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current opinion in microbiology*, 30, 67-78.
- Real-Rocha, K., Perini, H. F., de Souza, C. M., Schueler, J., Tosoni, N. F., Furlaneto, M. C., & Furlaneto-Maia, L. (2019). Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 1-11.
- Reglamento de la Comisión Europea (RCE). (2005) Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32005R2073&qid=149380167202>
- Ripolles-Avila, C., Guitan-Santamaria, M., Pizarro-Giménez, K., Mazaheri, T., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2022). Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*: Unraveling their ecological interactions. *Food Microbiology*, 105, 104026.
- Rodríguez-Blanco, A., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2012). Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2619-2626.
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., & López Cabo, M. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes*

biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6), 85.

- Rodríguez-Melcón, C., Cápita, R., Rodríguez-Jerez, J. J., Martínez-Suarez, J. V., & Alonso-Calleja, C. (2019). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(4), 262-268.
- Ruíz-Llacsahuanga, B., Hamilton, A., Zaches, R., Hanrahan, I., & Critzer, F. (2021). Prevalence of *Listeria* species on food contact surfaces in Washington State apple packinghouses. *Applied and environmental microbiology*, 87(9), e02932-20.
- Rukavina, Z., & Vanić, Ž. (2016). Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics*, 8(2), 18.
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659-664.
- Sapers, G. M., Gorny, J. R., & Yousef, A. E. (2005). Contaminación microbiológica de frutas y vegetales. En Gorny J. (Eds.), *Microbiology of fruits and Vegetables*. (2^a ed., pp 3 – 33) CRC Taylor & Francis Press.
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2019). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian journal of microbiology*, 59(1), 3-12.
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro sur*, 37(1), 1-8.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2016). Casi la totalidad de las verduras mexicanas congeladas van al extranjero. México. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/casi-la-totalidad-de-las-verduras-mexicanas-congeladas-van-al-extranjero>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). Panorama Agroalimentario 2021. Conectando conocimiento ancestral y

moderno para lograr la autosuficiencia alimentaria. México. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021

- Shao, X., Fang, K., Medina, D., Wan, J., Lee, J. L., & Hong, S. H. (2020). The probiotic, *Leuconostoc mesenteroides*, inhibits *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Food Safety*, 40(2), e12750.
- Simonetti, T., Peter, K., Chen, Y., Jin, Q., Zhang, G., LaBorde, L. F., & Macarasin, D. (2021). Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* in three commercial tree fruit packinghouses. *Frontiers in Microbiology*, 12, 652708.
- Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N., & Paluszak, Z. (2018). Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*, 21(1), 23-33.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Szymczak, B., Szymczak, M., & Trafiałek, J. (2020). Prevalence of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods in the West Pomeranian region of Poland: Correlations between the contamination level, serogroups, ingredients, and producers. *Food microbiology*, 91, 103532.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*, 12(3), 227-232.
- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T. J., Pontello, M., Amar, C. F. L., & Sammarco, M. L. (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 40, 31-39.

- Tigreros, J. A., Londoño, S. P., Girón, J. M., & Santos, L. E. O. (2021). Diferentes métodos de escaldado y su aplicación en frutas y verduras. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 8(1), 50-63.
- Tong, C., Hu, H., Chen, G., Li, Z., Li, A., & Zhang, J. (2021). Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research*, 195, 110897.
- Townsend, A., Strawn, L. K., Chapman, B. J., & Dunn, L. L. (2021). A systematic review of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. *Foods*, 10(6), 1427.
- Truchado, P., Gil, M. I., Querido-Ferreira, A. P., Capón, C. L., Álvarez-Ordoñez, A., & Allende, A. (2022). Frozen Vegetable Processing Plants Can Harbour Diverse *Listeria monocytogenes* Populations: Identification of Critical Operations by WGS. *Foods*, 11(11), 1546.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de Infectología*, 30(4), 407-416.
- Wen, J., Deng, X., Li, Z., Dudley, E. G., Anantheswaran, R. C., Knabel, S. J., & Zhang, W. (2011). Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the long-term-survival phase. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 5966-5972.
- Willis, C., McLauchlin, J., Aird, H., Amar, C., Barker, C., Dallman, T., & Sadler-Reeves, L. (2020). Occurrence of *Listeria* and *Escherichia coli* in frozen fruit and vegetables collected from retail and catering premises in England 2018–2019. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108849.
- Winkelströter, L. K., Gomes, B. C., Thomaz, M. R., Souza, V. M., & De Martinis, E. C. (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 22(8), 1404-1407.

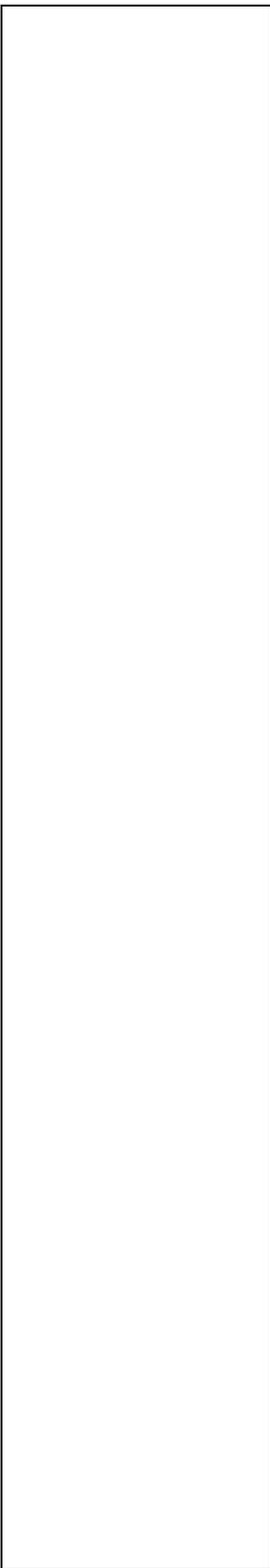
- Xu, D., Nie, Q., Wang, W., Shi, L., & Yan, H. (2016). Characterization of a transferable bcrABC and cadAC genes-harboring plasmid in *Listeria monocytogenes* strain isolated from food products of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 117-122.
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Wang, N., Yang, Z., & He, G. (2020). Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-16.
- Zhou, Q., Feng, F., Wang, L., Feng, X., Yin, X., & Luo, Q. (2011). Virulence regulator PrfA is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. *Current microbiology*, 63(2), 186-192.
- Zilelidou, E. A., & Skandamis, P. N. (2018). Growth, detection and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *International Journal of Food Microbiology*, 277, 10-25.

11. ANEXOS

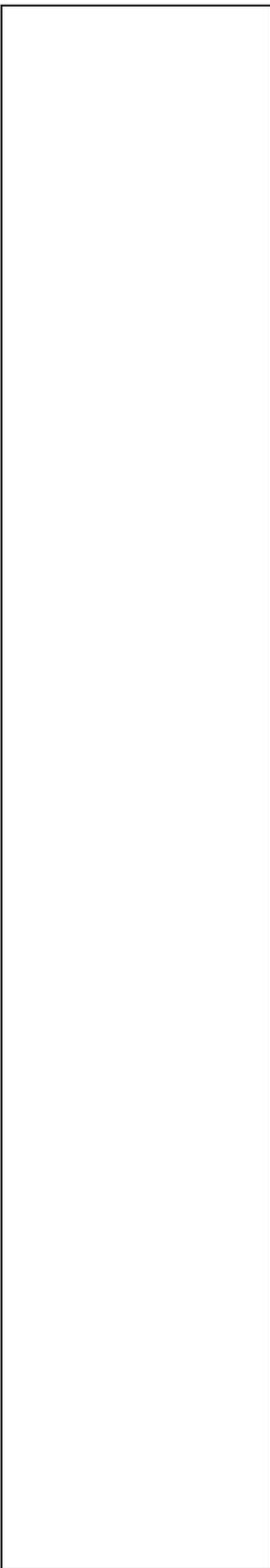
Tabla A1. Inóculo y población a las 72 h (Log UFC/mL) empleados y obtenidos en ensayos de caracterización por capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Listeria*.

Especie	Cepa	Inóculo (Log UFC/mL)	Población 72 h (Log UFC/mL)
<i>Listeria grayi</i>	MAVI-G1	6.59 ± 0.43	6.75 ± 0.52
	MAVI-G2	6.12 ± 0.11	6.06 ± 0.14
	MAVI-G3	6.19 ± 0.20	6.25 ± 0.10
	MAVI-G4	6.17 ± 0.21	6.10 ± 0.29
	MAVI-G5	6.22 ± 0.25	6.02 ± 0.26
	MAVI-G6	5.98 ± 0.14	6.47 ± 0.17
	MAVI-G7	6.07 ± 0.09	6.21 ± 0.06
<i>Listeria innocua</i>	MAVI-INO1	6.97 ± 0.12	6.72 ± 0.57
	MAVI-INO2	6.36 ± 0.51	6.36 ± 0.11
	MAVI-INO3	6.32 ± 0.20	6.13 ± 0.13
	MAVI-INO4	6.23 ± 0.14	6.17 ± 0.06
	MAVI-INO5	6.38 ± 0.34	6.09 ± 0.21
	MAVI-INO6	6.16 ± 0.33	5.92 ± 0.11
	MAVI-INO7	6.04 ± 0.38	5.56 ± 0.30
	MAVI-INO8	6.22 ± 0.15	5.89 ± 0.99
	MAVI-INO9	6.47 ± 0.18	6.19 ± 1.68
	MAVI-INO10	6.61 ± 0.46	5.50 ± 0.61
	MAVI-INO11	6.23 ± 0.24	5.42 ± 0.29
	MAVI-INO12	6.39 ± 0.22	5.76 ± 0.65
	MAVI-INO13	6.67 ± 0.19	6.14 ± 0.24
	MAVI-INO14	6.40 ± 0.19	5.62 ± 0.58
	MAVI-INO15	6.76 ± 0.10	6.15 ± 0.13

	MAVI-INO16	6.43 ± 0.21	5.81 ± 0.45
	MAVI-INO17	6.52 ± 0.22	6.05 ± 0.08
	MAVI-INO18	6.49 ± 0.16	6.52 ± 0.23
	MAVI-INO19	6.65 ± 0.37	5.84 ± 0.44
	MAVI-INO20	6.71 ± 0.21	5.77 ± 0.37
<i>Listeria ivanovii</i>	MAVI-IV1	6.73 ± 0.25	6.50 ± 0.35
	MAVI-IV2	6.08 ± 0.23	6.22 ± 0.33
	MAVI-IV3	6.09 ± 0.40	6.29 ± 0.11
	MAVI-IV4	6.29 ± 0.35	6.38 ± 0.45
	MAVI-IV5	6.08 ± 0.08	6.15 ± 0.33
	MAVI-IV6	6.34 ± 0.23	6.15 ± 0.21
	MAVI-IV7	6.14 ± 0.17	6.11 ± 0.18
	MAVI-IV8	6.15 ± 0.18	6.05 ± 0.37
	MAVI-IV9	5.94 ± 0.17	6.19 ± 0.21
	MAVI-IV10	6.30 ± 0.07	6.22 ± 0.17
<i>Listeria monocytogenes</i>	MAVI-LM1	7.12 ± 0.15	6.84 ± 0.62
	MAVI-LM2	7.05 ± 0.40	6.33 ± 0.70
	MAVI-LM3	7.12 ± 0.15	6.07 ± 0.55
	MAVI-LM4	6.99 ± 0.15	6.74 ± 0.62
	MAVI-LM5	6.44 ± 0.20	6.77 ± 0.44
	MAVI-LM6	6.36 ± 0.16	6.88 ± 0.19
	MAVI-LM7	6.64 ± 0.08	6.81 ± 0.54
	MAVI-LM8	6.73 ± 0.09	6.50 ± 0.32
	MAVI-LM9	6.72 ± 0.46	6.42 ± 0.25
	MAVI-LM10	6.72 ± 0.25	6.09 ± 0.20
	MAVI-LM11	6.60 ± 0.13	6.30 ± 0.20
	MAVI-LM12	6.55 ± 0.20	6.44 ± 0.19
	MAVI-LM13	6.67 ± 0.26	6.16 ± 0.14
	MAVI-LM14	6.79 ± 0.36	6.27 ± 0.12



MAVI-LM15	6.83 ± 0.47	6.00 ± 0.09
MAVI-LM16	6.67 ± 0.26	5.56 ± 0.30
MAVI-LM17	6.65 ± 0.15	6.32 ± 0.65
MAVI-LM18	6.87 ± 0.36	6.01 ± 0.50
MAVI-LM19	6.50 ± 0.17	6.50 ± 0.27
MAVI-LM20	6.57 ± 0.24	6.72 ± 0.12
MAVI-LM25	6.43 ± 0.10	6.30 ± 0.16
MAVI-LM29	6.51 ± 0.13	5.61 ± 0.47
MAVI-LM32	6.36 ± 0.45	5.97 ± 0.23
MAVI-LM33	6.36 ± 0.35	6.11 ± 0.13
MAVI-LM34	6.23 ± 0.05	6.28 ± 0.13
MAVI-LM35	6.26 ± 0.06	6.26 ± 0.32
MAVI-LM36	6.32 ± 0.29	6.38 ± 0.46
MAVI-LM37	6.26 ± 0.12	6.03 ± 0.26
MAVI-LM38	6.13 ± 0.08	5.99 ± 0.41
MAVI-LM39	6.68 ± 0.43	6.27 ± 0.45
MAVI-LM40	6.49 ± 0.37	6.04 ± 0.31
MAVI-LM41	6.60 ± 0.12	6.11 ± 0.12
MAVI-LM42	6.27 ± 0.37	6.09 ± 0.17
MAVI-LM43	6.40 ± 0.23	6.36 ± 0.31
MAVI-LM44	6.38 ± 0.19	6.40 ± 0.14
MAVI-LM45	6.75 ± 0.25	5.63 ± 0.49
MAVI-LM46	6.60 ± 0.51	6.01 ± 0.69
MAVI-LM47	6.68 ± 0.35	5.89 ± 0.42
MAVI-LM48	6.65 ± 0.20	6.04 ± 0.05
MAVI-LM49	6.74 ± 0.37	6.07 ± 0.27
MAVI-LM50	6.77 ± 0.11	6.86 ± 0.05
MAVI-LM51	6.70 ± 0.35	6.26 ± 0.47
MAVI-LM52	6.55 ± 0.27	6.50 ± 0.08



MAVI-LM53	6.65 ± 0.32	6.43 ± 0.34
MAVI-LM54	6.98 ± 0.17	6.61 ± 0.19
MAVI-LM55	6.58 ± 0.23	6.47 ± 0.44
MAVI-LM56	6.67 ± 0.22	6.40 ± 0.30
MAVI-LM57	6.52 ± 0.18	6.32 ± 0.21
MAVI-LM58	6.64 ± 0.22	6.37 ± 0.52
MAVI-LM59	6.79 ± 0.12	6.47 ± 0.21
MAVI-LM60	6.65 ± 0.06	6.24 ± 0.46
MAVI-LM61	6.26 ± 0.11	6.45 ± 0.17
MAVI-LM62	7.04 ± 0.07	6.15 ± 0.13
MAVI-LM63	6.89 ± 0.17	6.14 ± 0.10
MAVI-LM64	6.65 ± 0.21	6.04 ± 0.05
MAVI-LM65	6.57 ± 0.21	5.97 ± 0.48
MAVI-LM66	6.74 ± 0.30	6.13 ± 0.17
MAVI-LM67	6.73 ± 0.22	6.05 ± 0.13
MAVI-LM68	6.75 ± 0.20	6.16 ± 0.16
MAVI-LM69	6.88 ± 0.10	6.04 ± 0.25
MAVI-LM70	6.74 ± 0.23	6.21 ± 0.12
MAVI-LM71	6.80 ± 0.20	5.78 ± 0.60
MAVI-LM72	6.72 ± 0.11	5.83 ± 0.38
MAVI-LM73	6.80 ± 0.14	6.17 ± 0.33
MAVI-LM74	6.51 ± 0.17	6.19 ± 0.16
MAVI-LM75	6.69 ± 0.19	6.23 ± 0.16
MAVI-LM76	6.51 ± 0.22	6.12 ± 0.31
MAVI-LM77	6.58 ± 0.13	5.69 ± 0.12
MAVI-LM78	6.47 ± 0.18	5.95 ± 0.07
MAVI-LM79	6.58 ± 0.11	6.07 ± 0.23
MAVI-LM80	6.73 ± 0.16	5.83 ± 0.18
MAVI-LM81	6.65 ± 0.15	6.06 ± 0.08

	MAVI-LM82	6.63 ± 0.26	6.00 ± 0.01
	MAVI-LM83	6.66 ± 0.24	6.10 ± 0.37
	MAVI-LM84	6.62 ± 0.23	6.02 ± 0.03
<i>Listeria seeligeri</i>	MAVI-S1	6.20 ± 0.12	6.12 ± 0.25
	MAVI-S2	6.73 ± 0.26	5.92 ± 0.11
	MAVI-S3	6.54 ± 0.32	6.13 ± 0.25
<i>Listeria welshimeri</i>	MAVI-W1	6.99 ± 0.12	6.66 ± 0.27
	MAVI-W2	6.13 ± 0.18	6.02 ± 0.09
	MAVI-W3	6.34 ± 0.08	6.36 ± 6.21
	MAVI-W4	6.74 ± 0.24	5.86 ± 0.37

Tabla A2. Valores de densidad óptica a 600 nm de cepas de *Listeria* spp. aisladas de una planta procesadora de hortalizas congeladas.

Especie	Cepa	DO 600 nm		
		24 h	48 h	72 h
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 700545	0.2251 ± 0.02	0.2193 ± 0.01	0.1806 ± 0.01
	MAVI-G1	0.4942 ± 0.07	0.7866 ± 0.28	0.5082 ± 0.11
	MAVI-G2	1.4193 ± 0.13	1.5909 ± 0.03	1.6534 ± 0.09
	MAVI-G3	1.4592 ± 0.15	1.5784 ± 0.06	1.6428 ± 0.05
	MAVI-G4	1.4071 ± 0.14	1.6146 ± 0.04	1.6457 ± 0.05
	MAVI-G5	1.4715 ± 0.11	1.5902 ± 0.06	1.6177 ± 0.04
	MAVI-G6	1.4721 ± 0.11	1.6474 ± 0.05	1.6285 ± 0.07
	MAVI-G7	1.3324 ± 0.03	1.6033 ± 0.03	1.6888 ± 0.10
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	0.1614 ± 0.01	0.1542 ± 0.02	0.1445 ± 0.04
	MAVI-INO1	0.4751 ± 0.06	0.4000 ± 0.11	0.3917 ± 0.02
	MAVI-INO2	1.5249 ± 0.07	1.6471 ± 0.06	1.6261 ± 0.06
	MAVI-INO3	1.5890 ± 0.06	1.6900 ± 0.07	1.7718 ± 0.09
	MAVI-INO4	1.3231 ± 0.11	1.6008 ± 0.03	1.4887 ± 0.45
	MAVI-INO5	0.2422 ± 0.25	0.4540 ± 0.44	0.5761 ± 0.54
	MAVI-INO6	0.2090 ± 0.26	0.1412 ± 0.01	0.2452 ± 0.34
	MAVI-INO7	0.1315 ± 0.01	0.1504 ± 0.01	0.1452 ± 0.03
	MAVI-INO8	0.1281 ± 0.01	0.1301 ± 0.01	0.3031 ± 0.45
	MAVI-INO9	0.1565 ± 0.02	0.2620 ± 0.43	0.2165 ± 0.29
	MAVI-INO10	0.1677 ± 0.02	0.1491 ± 0.01	0.2579 ± 0.33
	MAVI-INO11	0.1955 ± 0.22	0.1358 ± 0.01	0.2109 ± 0.31
	MAVI-INO12	0.1370 ± 0.01	0.1515 ± 0.01	0.1399 ± 0.04
	MAVI-INO13	0.2775 ± 0.02	0.3146 ± 0.08	0.3312 ± 0.04
	MAVI-INO14	0.1483 ± 0.01	0.1931 ± 0.04	0.1412 ± 0.06
	MAVI-INO15	0.3068 ± 0.05	0.2669 ± 0.03	0.2092 ± 0.03
MAVI-INO16	0.2639 ± 0.02	0.3572 ± 0.10	0.2842 ± 0.13	

	MAVI-INO17	0.1583 ± 0.03	0.1758 ± 0.02	0.1672 ± 0.04
	MAVI-INO18	0.3872 ± 0.05	0.4209 ± 0.04	0.3703 ± 0.07
	MAVI-INO19	0.2471 ± 0.11	0.2689 ± 0.10	0.2068 ± 0.08
	MAVI-INO20	0.3107 ± 0.04	0.3065 ± 0.02	0.3004 ± 0.03
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	0.1605 ± 0.04	0.2333 ± 0.12	0.2451 ± 0.13
	MAVI-IV1	0.3090 ± 0.10	0.2826 ± 0.18	0.2605 ± 0.14
	MAVI-IV2	1.4665 ± 0.07	1.6001 ± 0.02	1.7296 ± 0.14
	MAVI-IV3	1.5138 ± 0.11	1.6664 ± 0.10	1.6462 ± 0.06
	MAVI-IV4	1.3845 ± 0.11	1.6200 ± 0.07	1.7122 ± 0.11
	MAVI-IV5	1.2889 ± 0.09	1.4265 ± 0.03	1.6001 ± 0.18
	MAVI-IV6	1.3015 ± 0.12	1.4345 ± 0.22	1.5057 ± 0.19
	MAVI-IV7	1.3399 ± 0.14	1.6027 ± 0.25	1.6605 ± 0.25
	MAVI-IV8	1.4336 ± 0.19	1.6046 ± 0.10	1.7213 ± 0.08
	MAVI-IV9	1.4166 ± 0.19	1.5755 ± 0.12	1.6476 ± 0.09
	MAVI-IV10	0.3090 ± 0.22	0.2826 ± 0.27	0.2605 ± 0.53
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	0.2054 ± 0.03	0.2725 ± 0.05	0.2593 ± 0.13
	MAVI-LM1	0.3878 ± 0.14	0.5290 ± 0.26	0.2853 ± 0.12
	MAVI-LM2	0.5240 ± 0.02	0.7247 ± 0.04	0.4799 ± 0.11
	MAVI-LM3	0.3770 ± 0.12	0.3807 ± 0.21	0.3527 ± 0.13
	MAVI-LM4	0.4941 ± 0.03	0.5806 ± 0.05	0.4839 ± 0.06
	MAVI-LM5	1.2321 ± 0.20	1.3412 ± 0.09	1.5297 ± 0.16
	MAVI-LM6	1.3205 ± 0.33	1.5340 ± 0.31	1.4651 ± 0.28
	MAVI-LM7	1.1701 ± 0.28	1.1606 ± 0.33	1.3792 ± 0.42
	MAVI-LM8	0.8616 ± 0.38	1.0543 ± 0.40	1.1441 ± 0.48
	MAVI-LM9	1.4216 ± 0.18	1.6227 ± 0.13	1.7193 ± 0.31
	MAVI-LM10	1.0871 ± 0.28	1.1703 ± 0.20	1.2751 ± 0.37
	MAVI-LM11	0.9939 ± 0.42	0.9970 ± 0.35	1.5608 ± 0.48
	MAVI-LM12	1.2415 ± 0.34	1.5086 ± 0.36	1.3858 ± 0.31
	MAVI-LM13	1.3065 ± 0.42	1.4163 ± 0.43	1.3759 ± 0.45

MAVI-LM14	1.0582 ± 0.35	1.2065 ± 0.46	1.5868 ± 0.55
MAVI-LM15	0.8687 ± 0.39	0.9145 ± 0.48	0.6268 ± 0.31
MAVI-LM16	0.5625 ± 0.22	0.5702 ± 0.26	0.2841 ± 0.20
MAVI-LM17	0.4804 ± 0.15	0.7714 ± 0.47	0.8708 ± 0.45
MAVI-LM18	0.7174 ± 0.39	0.9975 ± 0.46	1.1375 ± 0.33
MAVI-LM19	0.7361 ± 0.31	1.0448 ± 0.41	1.2957 ± 0.41
MAVI-LM20	0.5899 ± 0.03	1.0363 ± 0.30	1.1270 ± 0.18
MAVI-LM25	0.5603 ± 0.03	0.7150 ± 0.13	1.3207 ± 0.32
MAVI-LM29	0.3142 ± 0.13	0.2665 ± 0.16	0.3790 ± 0.30
MAVI-LM32	0.3126 ± 0.13	0.2944 ± 0.19	0.3412 ± 0.25
MAVI-LM33	0.2402 ± 0.01	0.2782 ± 0.29	0.4216 ± 0.39
MAVI-LM34	0.5386 ± 0.04	0.9230 ± 0.26	1.3062 ± 0.34
MAVI-LM35	1.5066 ± 0.08	1.5359 ± 0.12	1.6453 ± 0.21
MAVI-LM36	1.4310 ± 0.09	1.5644 ± 0.08	1.6273 ± 0.10
MAVI-LM37	1.4898 ± 0.05	1.5481 ± 0.07	1.6101 ± 0.09
MAVI-LM38	1.4963 ± 0.07	1.5844 ± 0.06	1.6692 ± 0.08
MAVI-LM39	1.5276 ± 0.04	1.5683 ± 0.05	1.7108 ± 0.13
MAVI-LM40	1.4351 ± 0.05	1.6083 ± 0.07	1.7237 ± 0.08
MAVI-LM41	1.5046 ± 0.05	1.5414 ± 0.04	1.5697 ± 0.13
MAVI-LM42	1.4907 ± 0.04	1.5591 ± 0.05	1.5579 ± 0.19
MAVI-LM43	1.5376 ± 0.06	1.4771 ± 0.20	1.6322 ± 0.06
MAVI-LM44	1.5235 ± 0.04	1.4991 ± 0.37	1.6772 ± 0.11
MAVI-LM45	0.2624 ± 0.20	0.3039 ± 0.28	0.2209 ± 0.07
MAVI-LM46	0.3129 ± 0.13	0.2449 ± 0.05	0.2563 ± 0.03
MAVI-LM47	0.2429 ± 0.07	0.3309 ± 0.37	0.2330 ± 0.02
MAVI-LM48	0.2828 ± 0.06	0.4297 ± 0.46	0.2491 ± 0.03
MAVI-LM49	0.2461 ± 0.11	0.1861 ± 0.06	0.2116 ± 0.06
MAVI-LM50	0.2020 ± 0.01	0.2439 ± 0.03	0.2689 ± 0.07
MAVI-LM51	0.1699 ± 0.01	0.2009 ± 0.02	0.2140 ± 0.06

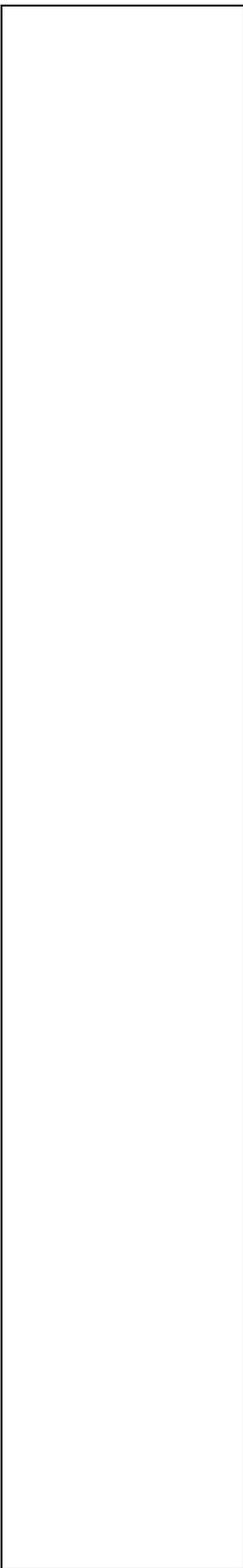
MAVI-LM52	0.2776 ± 0.19	0.3087 ± 0.19	0.3627 ± 0.30
MAVI-LM53	0.1569 ± 0.01	0.1903 ± 0.02	0.2112 ± 0.05
MAVI-LM54	0.1652 ± 0.01	0.2172 ± 0.03	0.3815 ± 0.43
MAVI-LM55	0.1555 ± 0.01	0.1987 ± 0.03	0.2618 ± 0.20
MAVI-LM56	0.1596 ± 0.01	0.2209 ± 0.03	0.2304 ± 0.03
MAVI-LM57	0.1642 ± 0.01	0.2024 ± 0.02	0.2262 ± 0.04
MAVI-LM58	0.1684 ± 0.01	0.2297 ± 0.02	0.2450 ± 0.07
MAVI-LM59	0.1713 ± 0.01	0.2146 ± 0.02	0.2183 ± 0.03
MAVI-LM60	0.1802 ± 0.01	0.1848 ± 0.06	0.2468 ± 0.02
MAVI-LM61	0.1674 ± 0.01	0.3004 ± 0.26	0.1683 ± 0.04
MAVI-LM62	0.2287 ± 0.01	0.3569 ± 0.09	0.3420 ± 0.30
MAVI-LM63	0.1653 ± 0.01	0.2158 ± 0.02	0.2258 ± 0.02
MAVI-LM64	0.1954 ± 0.01	0.2380 ± 0.03	0.2563 ± 0.03
MAVI-LM65	0.1899 ± 0.01	0.2356 ± 0.04	0.3606 ± 0.41
MAVI-LM66	0.1986 ± 0.02	0.2443 ± 0.11	0.2729 ± 0.03
MAVI-LM67	0.1982 ± 0.03	0.2102 ± 0.01	0.2569 ± 0.04
MAVI-LM68	0.1656 ± 0.01	0.2080 ± 0.02	0.2289 ± 0.02
MAVI-LM69	0.1951 ± 0.01	0.2432 ± 0.01	0.1930 ± 0.03
MAVI-LM70	0.3129 ± 0.07	0.2674 ± 0.03	0.3995 ± 0.29
MAVI-LM71	0.2174 ± 0.02	0.2405 ± 0.03	0.2374 ± 0.02
MAVI-LM72	0.2138 ± 0.03	0.2401 ± 0.03	0.2578 ± 0.04
MAVI-LM73	0.2130 ± 0.03	0.2274 ± 0.01	0.2220 ± 0.06
MAVI-LM74	0.3337 ± 0.23	0.3246 ± 0.25	0.5022 ± 0.45
MAVI-LM75	0.3502 ± 0.28	0.2565 ± 0.06	0.4486 ± 0.25
MAVI-LM76	0.2825 ± 0.03	0.3200 ± 0.23	0.4023 ± 0.25
MAVI-LM77	0.3016 ± 0.14	0.4598 ± 0.35	0.3755 ± 0.39
MAVI-LM78	0.2414 ± 0.14	0.3534 ± 0.29	0.3106 ± 0.26
MAVI-LM79	0.3392 ± 0.23	0.3702 ± 0.27	0.2711 ± 0.05
MAVI-LM80	0.2297 ± 0.02	0.3691 ± 0.35	0.4541 ± 0.47

	MAVI-LM81	0.2055 ± 0.18	0.1558 ± 0.04	0.1597 ± 0.03
	MAVI-LM82	0.2819 ± 0.23	0.2887 ± 0.29	0.3729 ± 0.40
	MAVI-LM83	0.1755 ± 0.02	0.2342 ± 0.24	0.3654 ± 0.43
	MAVI-LM84	0.1831 ± 0.02	0.2143 ± 0.02	0.2049 ± 0.03
<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	0.2590 ± 0.07	0.3416 ± 0.19	0.3561 ± 0.26
	MAVI-S1	1.3444 ± 0.16	1.6053 ± 0.03	1.6553 ± 0.09
	MAVI-S2	0.2323 ± 0.02	0.5237 ± 0.43	0.1980 ± 0.04
	MAVI-S3	0.2567 ± 0.05	0.1844 ± 0.05	0.1435 ± 0.05
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 43550	0.1655 ± 0.01	0.1652 ± 0.04	0.1744 ± 0.06
	MAVI-W1	0.4671 ± 0.03	0.6248 ± 0.10	0.5193 ± 0.06
	MAVI-W2	1.3489 ± 0.11	1.4322 ± 0.26	1.5128 ± 0.26
	MAVI-W3	0.3126 ± 0.02	0.2621 ± 0.02	0.2525 ± 0.03
	MAVI-W4	0.2432 ± 0.03	0.2771 ± 0.04	0.2545 ± 0.04

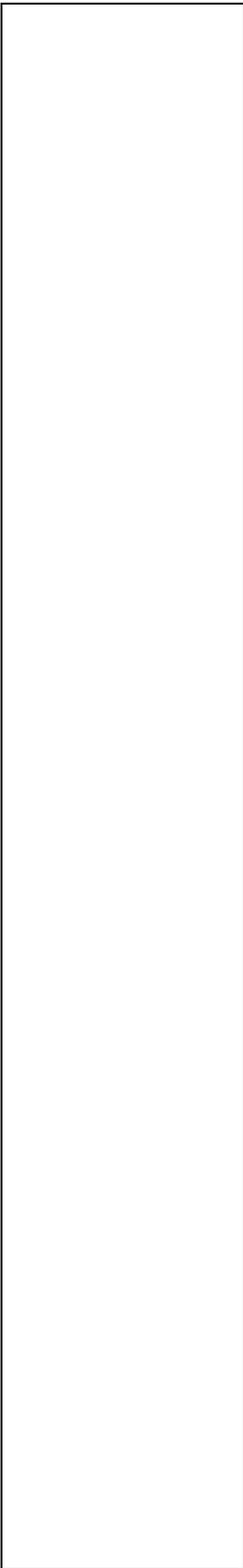
Tabla A3. Valores de densidad óptica a 595 nm de cepas de *Listeria* spp. aisladas de una planta procesadora de hortalizas congeladas.

Especie	Cepa	DO 595 nm		
		24 h	48 h	72 h
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 700545	0.1501 ± 0.04	0.1416 ± 0.02	0.1547 ± 0.04
	MAVI-G1	0.2376 ± 0.04	0.2615 ± 0.02	0.3363 ± 0.07
	MAVI-G2	0.3586 ± 0.07	0.3221 ± 0.18	0.2800 ± 0.08
	MAVI-G3	0.3369 ± 0.09	0.2485 ± 0.05	0.2677 ± 0.10
	MAVI-G4	0.3155 ± 0.12	0.2652 ± 0.05	0.2834 ± 0.13
	MAVI-G5	0.3292 ± 0.07	0.2870 ± 0.04	0.2744 ± 1.02
	MAVI-G6	0.3985 ± 0.11	0.3003 ± 0.10	0.2364 ± 0.04
	MAVI-G7	0.3224 ± 0.05	0.2873 ± 0.07	0.2193 ± 0.05
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	0.7157 ± 0.14	0.6794 ± 0.13	0.5699 ± 0.26
	MAVI-INO1	0.3629 ± 0.09	0.4055 ± 0.12	0.4817 ± 0.12
	MAVI-INO2	0.4141 ± 0.12	0.3016 ± 0.12	0.3162 ± 0.15
	MAVI-INO3	0.3636 ± 0.10	0.3585 ± 0.08	0.3706 ± 0.29
	MAVI-INO4	0.3475 ± 0.05	0.3315 ± 0.06	0.3458 ± 0.20
	MAVI-INO5	0.5067 ± 0.11	0.6399 ± 0.13	0.6943 ± 0.37
	MAVI-INO6	0.5091 ± 0.08	0.8035 ± 0.33	1.0059 ± 0.19
	MAVI-INO7	0.3357 ± 0.05	0.4762 ± 0.11	0.6063 ± 0.12
	MAVI-INO8	0.2826 ± 0.07	0.5092 ± 0.08	0.5304 ± 0.10
	MAVI-INO9	0.2824 ± 0.10	0.4140 ± 0.27	0.3752 ± 0.23
	MAVI-INO10	0.3200 ± 0.19	0.4287 ± 0.23	0.5319 ± 0.30
	MAVI-INO11	0.3150 ± 0.11	0.5491 ± 0.09	0.6324 ± 0.17
	MAVI-INO12	0.4332 ± 0.13	0.5992 ± 0.12	0.7625 ± 0.31
	MAVI-INO13	0.5129 ± 0.13	0.5237 ± 0.16	0.7294 ± 0.38
	MAVI-INO14	0.4099 ± 0.10	0.5888 ± 0.18	0.7528 ± 0.63
MAVI-INO15	0.5444 ± 0.17	0.8450 ± 0.43	0.8797 ± 0.29	

	MAVI-INO16	0.5410 ± 0.06	0.2161 ± 0.08	0.2604 ± 0.09
	MAVI-INO17	0.5581 ± 0.19	0.8496 ± 0.11	1.1108 ± 0.22
	MAVI-INO18	0.2488 ± 0.08	0.4280 ± 0.31	0.6636 ± 0.54
	MAVI-INO19	0.3085 ± 0.06	0.4922 ± 0.18	0.7518 ± 0.35
	MAVI-INO20	0.5072 ± 0.10	0.6296 ± 0.23	0.9348 ± 0.43
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	0.3118 ± 0.05	0.2785 ± 0.05	0.2685 ± 0.07
	MAVI-IV1	1.0102 ± 0.52	0.6766 ± 0.53	0.5075 ± 0.32
	MAVI-IV2	0.3573 ± 0.11	0.4260 ± 0.21	0.3000 ± 0.09
	MAVI-IV3	0.3625 ± 0.11	0.3024 ± 0.07	0.2578 ± 0.07
	MAVI-IV4	0.3903 ± 0.11	0.2883 ± 0.06	0.2501 ± 0.05
	MAVI-IV5	0.4239 ± 0.28	0.4022 ± 0.33	0.2287 ± 0.07
	MAVI-IV6	0.3245 ± 0.10	0.3171 ± 0.06	0.2293 ± 0.06
	MAVI-IV7	0.3247 ± 0.08	0.3014 ± 0.04	0.1922 ± 0.05
	MAVI-IV8	0.3443 ± 0.08	0.3259 ± 0.07	0.2234 ± 0.07
	MAVI-IV9	0.3769 ± 0.11	0.4379 ± 0.15	0.2560 ± 0.10
	MAVI-IV10	0.3444 ± 0.08	0.3991 ± 0.13	0.2488 ± 0.07
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	0.9953 ± 0.27	1.0658 ± 0.33	0.6865 ± 0.30
	MAVI-LM1	0.6573 ± 0.71	0.5999 ± 0.62	0.5890 ± 0.61
	MAVI-LM2	0.2789 ± 0.09	0.2583 ± 0.05	0.3014 ± 0.19
	MAVI-LM3	0.7457 ± 0.79	0.5794 ± 0.64	0.6589 ± 0.65
	MAVI-LM4	0.3071 ± 0.08	0.2892 ± 0.08	0.2736 ± 0.07
	MAVI-LM5	0.2354 ± 0.06	0.2327 ± 0.04	0.2148 ± 0.08
	MAVI-LM6	0.2776 ± 0.10	0.2512 ± 0.11	0.2436 ± 0.15
	MAVI-LM7	0.3504 ± 0.05	0.2287 ± 0.08	0.2553 ± 0.11
	MAVI-LM8	0.2544 ± 0.07	0.2974 ± 0.10	0.2792 ± 0.03
	MAVI-LM9	0.2665 ± 0.09	0.3827 ± 0.19	0.3497 ± 0.13
	MAVI-LM10	0.2662 ± 0.05	0.3158 ± 0.12	0.2664 ± 0.04
	MAVI-LM11	0.4594 ± 0.79	0.3722 ± 0.13	0.2815 ± 0.10
	MAVI-LM12	0.2138 ± 0.10	0.3028 ± 0.13	0.3207 ± 0.12



MAVI-LM13	0.2692 ± 0.07	0.3001 ± 0.14	0.3346 ± 0.09
MAVI-LM14	0.2454 ± 0.08	0.5176 ± 0.50	1.6374 ± 1.61
MAVI-LM15	0.4244 ± 0.25	0.3765 ± 0.16	0.3401 ± 0.15
MAVI-LM16	0.4166 ± 0.32	0.4017 ± 0.14	0.5473 ± 0.21
MAVI-LM17	0.5226 ± 0.30	0.4287 ± 0.14	0.6186 ± 0.21
MAVI-LM18	0.3517 ± 0.27	0.4346 ± 0.19	0.4312 ± 0.12
MAVI-LM19	0.2361 ± 0.03	0.2867 ± 0.06	0.3324 ± 0.09
MAVI-LM20	0.2234 ± 0.02	0.4002 ± 0.18	0.3576 ± 0.13
MAVI-LM25	0.4017 ± 0.21	0.3688 ± 0.14	0.2585 ± 0.07
MAVI-LM29	0.9099 ± 0.34	0.8739 ± 0.29	0.6891 ± 0.31
MAVI-LM32	0.9065 ± 0.31	0.9302 ± 0.28	0.8192 ± 0.31
MAVI-LM33	0.9857 ± 0.32	1.0446 ± 0.20	0.9949 ± 0.15
MAVI-LM34	0.3646 ± 0.17	0.4527 ± 0.17	0.3438 ± 0.08
MAVI-LM35	0.3185 ± 0.06	0.5094 ± 0.37	0.6695 ± 0.40
MAVI-LM36	0.3769 ± 0.08	0.5183 ± 0.16	0.5013 ± 0.16
MAVI-LM37	0.3121 ± 0.08	0.4024 ± 0.17	0.4362 ± 0.16
MAVI-LM38	0.3308 ± 0.11	0.3340 ± 0.05	0.4389 ± 0.17
MAVI-LM39	0.3380 ± 0.08	0.3122 ± 0.06	0.5433 ± 0.31
MAVI-LM40	0.3155 ± 0.09	0.2861 ± 0.05	0.4250 ± 0.19
MAVI-LM41	0.4213 ± 0.15	0.4251 ± 0.11	0.5130 ± 0.28
MAVI-LM42	0.3921 ± 0.13	0.3218 ± 0.07	0.4988 ± 0.28
MAVI-LM43	0.4066 ± 0.10	0.3649 ± 0.09	0.4609 ± 0.16
MAVI-LM44	0.5403 ± 0.32	0.5324 ± 0.21	0.6810 ± 0.41
MAVI-LM45	0.7869 ± 0.32	0.8399 ± 0.32	0.7233 ± 0.29
MAVI-LM46	0.6608 ± 0.35	0.6851 ± 0.40	0.6842 ± 0.39
MAVI-LM47	0.8595 ± 0.26	0.8207 ± 0.37	0.7564 ± 0.18
MAVI-LM48	0.7626 ± 0.25	0.8547 ± 0.44	0.7073 ± 0.21
MAVI-LM49	0.5587 ± 0.28	0.7938 ± 0.55	0.7458 ± 0.56
MAVI-LM50	0.9226 ± 0.22	0.9038 ± 0.14	1.1330 ± 0.18



MAVI-LM51	1.1210 ± 0.16	0.9472 ± 0.39	1.4838 ± 0.48
MAVI-LM52	0.9416 ± 0.32	0.8715 ± 0.30	1.1348 ± 0.55
MAVI-LM53	1.0680 ± 0.20	0.9110 ± 0.31	1.1363 ± 0.34
MAVI-LM54	1.0973 ± 0.36	0.9255 ± 0.17	1.1556 ± 0.44
MAVI-LM55	0.9928 ± 0.15	0.9066 ± 0.15	1.1779 ± 0.22
MAVI-LM56	1.0485 ± 0.32	0.9722 ± 0.26	1.1297 ± 0.34
MAVI-LM57	0.9434 ± 0.24	0.8756 ± 0.22	1.2347 ± 0.46
MAVI-LM58	1.2674 ± 0.63	0.9755 ± 0.27	1.1287 ± 0.35
MAVI-LM59	1.0953 ± 0.25	0.9336 ± 0.31	1.1299 ± 0.24
MAVI-LM60	1.0729 ± 0.17	0.8447 ± 0.52	1.0669 ± 0.23
MAVI-LM61	1.0985 ± 0.19	1.0155 ± 0.27	0.8358 ± 0.37
MAVI-LM62	0.4597 ± 0.13	0.6412 ± 0.11	0.4558 ± 0.19
MAVI-LM63	0.9466 ± 0.26	1.0765 ± 0.15	1.1467 ± 0.48
MAVI-LM64	0.7973 ± 0.27	0.9678 ± 0.16	0.8466 ± 0.17
MAVI-LM65	0.8059 ± 0.30	0.9839 ± 0.16	0.7809 ± 0.20
MAVI-LM66	0.8869 ± 0.49	1.0339 ± 0.33	1.0867 ± 0.28
MAVI-LM67	0.6860 ± 0.20	0.9432 ± 0.29	0.9372 ± 0.24
MAVI-LM68	0.8441 ± 0.32	0.9314 ± 0.18	0.9664 ± 0.26
MAVI-LM69	0.4638 ± 0.18	0.4818 ± 0.25	0.4231 ± 0.41
MAVI-LM70	0.4147 ± 0.11	0.5124 ± 0.17	0.7431 ± 0.83
MAVI-LM71	0.7418 ± 0.23	0.7602 ± 0.21	0.5746 ± 0.15
MAVI-LM72	0.9224 ± 0.23	0.9047 ± 0.24	0.7707 ± 0.17
MAVI-LM73	0.9748 ± 0.21	1.1326 ± 0.29	1.0020 ± 0.32
MAVI-LM74	0.4533 ± 0.18	0.3627 ± 0.04	0.6530 ± 0.51
MAVI-LM75	0.2734 ± 0.17	0.6344 ± 0.35	0.6119 ± 0.38
MAVI-LM76	0.3467 ± 0.09	0.2908 ± 0.05	0.7390 ± 1.26
MAVI-LM77	0.3498 ± 0.12	0.2908 ± 0.06	0.3159 ± 0.13
MAVI-LM78	0.4708 ± 0.15	0.5108 ± 0.23	0.7004 ± 0.40
MAVI-LM79	0.3789 ± 0.05	0.4044 ± 0.17	0.3739 ± 0.14

	MAVI-LM80	0.2370 ± 0.10	0.2882 ± 0.32	0.2150 ± 0.09
	MAVI-LM81	0.2454 ± 0.13	0.1890 ± 0.04	0.1843 ± 0.08
	MAVI-LM82	0.2808 ± 0.08	0.2342 ± 0.07	0.2169 ± 0.08
	MAVI-LM83	0.2402 ± 0.05	0.1876 ± 0.08	0.1889 ± 0.05
	MAVI-LM84	0.2889 ± 0.08	0.2085 ± 0.08	0.1951 ± 0.09
<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	0.1919 ± 0.05	0.1417 ± 0.02	0.1342 ± 0.02
	MAVI-S1	0.3079 ± 0.14	0.2921 ± 0.06	0.2007 ± 0.06
	MAVI-S2	0.5995 ± 0.11	0.3809 ± 0.14	0.4147 ± 0.24
	MAVI-S3	0.2237 ± 0.08	0.2812 ± 0.09	0.3262 ± 0.10
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 43550	1.3280 ± 0.20	1.4275 ± 0.31	1.1594 ± 0.46
	MAVI-W1	0.3095 ± 0.08	0.2704 ± 0.03	0.2773 ± 0.12
	MAVI-W2	0.3034 ± 0.08	0.3257 ± 0.10	0.1818 ± 0.05
	MAVI-W3	0.1615 ± 0.07	0.1506 ± 0.02	0.1743 ± 0.05
	MAVI-W4	0.7777 ± 0.17	0.8173 ± 0.23	1.0703 ± 0.40

Tabla A4. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluación de capacidad de adhesión en cultivo mixto (4 h, 35 °C)

Ensayo de Interacción	Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
LM+G2	Cepa	1	0.0001	0.0019	0.9663
	Cultivo	1	0.9408	13.3922	0.0064 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.2465	3.5094	0.0979
LM+INO2	Cepa	1	0.0108	0.5679	0.4727
	Cultivo	1	0.9520	50.0631	0.0001 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.0021	0.1122	0.7463
LM+INO3	Cepa	1	0.0008	0.0194	0.8927
	Cultivo	1	1.1907	27.6961	0.0008 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.0192	0.4466	0.5228
LM+IV2	Cepa	1	0.1850	2.0407	0.1910
	Cultivo	1	1.7252	19.0298	0.0024 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.0690	0.7612	0.4084
LM+IV3	Cepa	1	0.0033	0.0281	0.8711
	Cultivo	1	1.1163	9.3984	0.0154 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.1925	1.6210	0.2387
LM+IV5	Cepa	1	0.0027	0.0136	0.9102
	Cultivo	1	1.1041	5.5421	0.0464 ¹
	Cultivo:Cepa	1	>0.0001	0.0002	0.9900
LM+INO5	Cepa	1	0.0385	0.6011	0.4604
	Cultivo	1	0.1240	1.9350	0.2017
	Cultivo:Cepa	1	1.1532	17.9906	0.0028 ^{1,2}
LM+INO6	Cepa	1	0.0021	0.1295	0.7283
	Cultivo	1	0.0432	2.6222	0.1440
	Cultivo:Cepa	1	0.1121	6.8063	0.0312 ^{1,2}

LM+INO7	Cepa	1	0.0444	0.6610	0.4397
	Cultivo	1	0.6302	9.3804	0.0155
	Cultivo:Cepa	1	0.8694	12.9408	0.0070 ^{1,2}
LM+INO8	Cepa	1	0.0052	0.2716	0.6164
	Cultivo	1	0.0520	2.7123	0.1382
	Cultivo:Cepa	1	0.5504	20.7045	0.0007 ^{1,2}
LM+INO12	Cepa	1	0.0033	0.0545	0.8213
	Cultivo	1	0.0147	0.2403	0.6371
	Cultivo:Cepa	1	0.5125	8.3793	0.0201 ^{1,2}
LM+INO13	Cepa	1	0.2976	3.3060	0.1065
	Cultivo	1	0.0850	0.9441	0.3597
	Cultivo:Cepa	1	0.7450	8.2740	0.0206 ^{1,2}
LM+INO14	Cepa	1	0.0147	0.2286	0.6453
	Cultivo	1	0.0120	0.1871	0.6767
	Cultivo:Cepa	1	0.0936	1.4562	0.2620

1 significativo estadísticamente ($p < 0.05$), 2 Interacción entre factores significativa no se analiza el efecto de los factores parentales. LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115, G: *L. grayi*, IV: *L. ivanovii*, INO: *L. innocua*

Tabla A5. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluación de poblaciones en cultivo mixto (10 días, 35 °C)

Ensayo de Interacción	Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
LM+G2	Cepa	1	0.5252	4.2803	0.0551
	Cultivo	1	0.3294	2.6848	0.1208
	Cultivo:Cepa	1	0.0107	0.0879	0.7706
LM+INO2	Cepa	1	0.3363	3.2539	0.0901
	Cultivo	1	1.3727	13.2795	0.0022 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.0337	0.3264	0.5757
LM+INO3	Cepa	1	0.2627	3.9659	0.0638
	Cultivo	1	0.6136	9.2634	0.0077 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.1045	1.5778	0.2271
LM+IV2	Cepa	1	0.2841	2.4263	0.1389
	Cultivo	1	0.0768	0.6560	0.4299
	Cultivo:Cepa	1	0.1747	1.4922	0.2396
LM+IV3	Cepa	1	0.3481	6.0495	0.0257 ¹
	Cultivo	1	0.0539	0.9382	0.3472
	Cultivo:Cepa	1	0.0025	0.0437	0.8371
LM+IV5	Cepa	1	1.3330	8.4584	0.0103 ¹
	Cultivo	1	0.2272	1.4416	0.2474
	Cultivo:Cepa	1	0.1184	0.7515	0.3988
LM+INO5	Cepa	1	1.5125	14.1193	0.0017 ¹
	Cultivo	1	0.1008	0.9412	0.3464
	Cultivo:Cepa	1	0.2880	2.6885	0.1206
LM+INO6	Cepa	1	2.3736	25.9907	0.0001 ¹
	Cultivo	1	2.1320	23.3457	0.0002 ¹
	Cultivo:Cepa	1	0.0661	0.7241	0.4074
LM+INO7	Cepa	1	2.3256	21.1627	0.0003

	Cultivo	1	1.6245	14.7826	0.0014
	Cultivo:Cepa	1	0.5248	4.7763	0.0441 ^{1,2}
LM+INO8	Cepa	1	1.3833	14.5818	0.0015 ¹
	Cultivo	1	0.5445	5.7394	0.0292
	Cultivo:Cepa	1	0.0180	0.1897	0.6690
LM+INO12	Cepa	1	1.5848	24.1417	0.0002 ¹
	Cultivo	1	0.0011	0.0171	0.8975
	Cultivo:Cepa	1	0.0661	1.0073	0.3305
LM+INO13	Cepa	1	0.4805	6.6741	0.0200 ¹
	Cultivo	1	0.1620	2.2502	0.1531
	Cultivo:Cepa	1	0.0064	0.0900	0.7680
LM+INO14	Cepa	1	0.8528	42.5997	<0.0001
	Cultivo	1	1.8180	90.8114	<0.0001
	Cultivo:Cepa	1	0.2486	12.4198	0.0028 ^{1,2}

1 significativo estadísticamente ($p < 0.05$), 2 Interacción entre factores significativa no se analiza el efecto de los factores parentales. LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115, G: *L. grayi*, IV: *L. ivanovii*, INO: *L. innocua*

Tabla A6. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluación de producción de biopolímeros en cultivo mixto (10 días 35 °C)

Ensayo de Interacción	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
LM+G2	2	0.0010	0.0103	0.9898
LM+INO2	2	0.0499	1.2038	0.3338
LM+INO3	2	0.2122	13.0914	0.0010 ¹
LM+IV2	2	0.0757	0.9105	0.4284
LM+IV3	2	0.1473	4.2081	0.0412 ¹
LM+IV5	2	0.1047	2.6586	0.1107
LM+INO5	2	0.1978	12.2069	0.0013 ¹
LM+INO6	2	0.1279	7.4644	0.0078 ¹
LM+INO7	2	0.1827	12.1164	0.0013 ¹
LM+INO8	2	0.1423	6.1277	0.0147 ¹
LM+INO12	2	0.3202	51.9760	<0.0001 ¹
LM+INO13	2	0.1332	6.9401	0.0099 ¹
LM+INO14	2	0.0536	1.4942	0.2634

1 significativo estadísticamente ($p < 0.05$) LM: *L. monocytogenes* ATCC 19115, G: *L. grayi*, IV: *L. ivanovii*, INO: *L. innocua*

Tabla A7. Ensayo preliminar de formación de biopelículas en cultivo mixto sobre superficies de acero inoxidable.

Cepas	Inóculo (Log UFC/mL)	Poblaciones		Transferencia	
		Tiempo (Días)	Log UFC /mL	Tiempo (Días)	Detección <i>bcrABC</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	6.79	1	3.71	1	NO
		4	4.17		
		7	4.90	4	NO
		10	4.60		
<i>Listeria innocua</i> MAVI-INO2	6.12	1	3.85	7	NO
		4	3.81		
		7	5.50	10	SI
		10	5.07		